

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЦИТОСТАТИКОВ В 3D-УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В СРАВНЕНИИ С МОНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРОЙ

© 2021 г. Е. В. Кудан^{1, *}, С. П. Кудан², С. Ш. Каршиева^{1, 3}, Ю. Д. Хесуани¹,
В. А. Миронов^{1, 4}, Е. А. Буланова¹

¹Лаборатория биотехнологических исследований “3Д Биопринтинг Солюшенс”, Москва, 115409 Россия

²Школа №1568 им. Пабло Неруды, Москва, 127221 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115478 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва 119991 Россия

*E-mail: koudan1980@gmail.com

Поступила в редакцию 28.12.2020 г.

После доработки 19.01.2021 г.

Принята к публикации 21.01.2021 г.

Селективный скрининг лекарственных средств с использованием моделей *in vitro* на основе монослойных 2D-культур широко используется в фармакологии, однако впоследствии полученные данные не всегда хорошо коррелируют с результатами клинических исследований. В связи с этим все большее распространение получают 3D-модели, отражающие все виды межклеточных взаимодействий и взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом, позволяющие адекватнее моделировать специфическую архитектуру ткани. Одной из таких моделей являются трехмерные сфероиды. В настоящей работе проведена оценка антипролиферативной и цитотоксической активности препаратов цисплатина, доксорубицина, фторурацила и этопозида на клеточных линиях Vero CCL-81 и HEK293 в условиях 2D- (монослойная культура) и 3D-культивирования (сфероиды). Сравнительный анализ антипролиферативной (IC₅₀) и цитотоксической (CC₅₀) активности цитостатиков для этих двух методов культивирования показал, что антипролиферативная активность была выше в условиях 2D-, в то время как цитотоксичность эффективнее выявлялась в условиях 3D-культивирования. Пониженная антипролиферативная активность препаратов в 3D-условиях может быть объяснена большей устойчивостью клеток к действию агентов благодаря физиологическим условиям культивирования. При этом более выраженное проявление цитотоксических эффектов в условиях 3D по сравнению с 2D позволяет предположить, что использование сфероидов будет способствовать выявлению ранней токсичности на стадии доклинических исследований *in vitro*. Наши данные показали, что при тестировании лекарственных средств необходимо учитывать тип клеток, скорость их пролиферации, а в случае сфероидов дополнительно подбирать их оптимальный диаметр для клеток каждого типа.

Ключевые слова: сфероиды, монослой, лекарственные препараты, антипролиферативная активность, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S0041377121030068

Многие перспективные кандидаты на лекарственные средства отсеиваются на стадии клинических исследований из-за несовершенства существующих тест-систем доклинического скрининга *in vitro*, использующих исключительно монослойные культуры (Brajša et al., 2016a; Fang, Eglén, 2017). При культивировании в 2D-условиях клетки вынуждены адаптироваться к плоской поверхности, при-

обретая уплощенную распластанную форму, нехарактерную для клеток в живом организме. Кроме того, в монослойной культуре отсутствует большая часть видов межклеточных контактов и контактов клеток с внеклеточным матриксом. Это приводит к нарушению клеточного метаболизма, кинетики клеточного цикла и влияет на функциональность клеток. Например, гепатоциты, культивируемые в монослое, теряют признаки биохимической специализации за один цикл репликации, при этом в составе сфероидов остаются в дифференцированном состоянии длительное время (Thomas et al., 2005; Jasmund et al., 2007). В настоящее время появляется все больше

Принятые сокращения: CC₅₀ – концентрация препарата, при которой наблюдается гибель 50% клеток (cytotoxic concentration); IC₅₀ – концентрация препарата, которая вызывает снижение количества живых метаболически активных клеток на 50% (inhibitory concentration).

исследований, посвященных созданию трехмерных моделей, более точно отражающих архитектуру тканей и органов (Pampaloni et al., 2007; Baker, Chen, 2012; Bissell, 2017).

Среди 3D-структур можно выделить два основных типа: 1) трехмерные структуры на основе каркасов из биополимеров (коллагена, матригеля, фибрина и т.п.), содержащие внутри клетки; 2) сфероиды, представляющие собой шарообразные агрегаты, сформированные одним или несколькими типами клеток (Langhans, 2018). В последнее время стремительно развиваются методики получения органоидов, представляющих собой микроструктуры, спонтанно образуемые при культивировании в слое гидрогеля кусочков тканей, эмбриональных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (Lancaster, Knoblich, 2014; Fatehullah et al., 2016).

Обсуждая возможность использования 3D-структур в качестве моделей для доклинического скрининга, следует помнить о ряде требований, предъявляемых к *in vitro* моделям. Они должны быть относительно недорогими, простыми, хорошо воспроизводимыми, т.е. стандартизованными; их создание не должно занимать много времени. С этой точки зрения очевидно, что сфероиды являются наиболее перспективными 3D-структурами для создания *in vitro* моделей. Использование трехмерных каркасов из биополимеров не позволяет унифицировать и масштабировать процесс производства 3D-структур, а также не подразумевает автоматическую количественную оценку образцов.

Формирование органоидов является очень длительным и дорогостоящим процессом и не может быть использовано на начальных стадиях доклинического скрининга. В противоположность этому формирование сфероидов в большинстве случаев занимает 24 ч и происходит в многоруночных культуральных планшетах, совместимых с любыми автоматическими системами дозирования, визуализации и анализа (Monjaret et al., 2016; Eke et al., 2016). Варьирование первоначального количества клеток в сфероиде позволяет влиять на диаметр сфероида и скорость пролиферации клеток внутри сфероида (Koudan et al., 2020). Известно, что расстояние, на которое возможно проникновение кислорода и питательных веществ, составляет 100–150 мкм (Kinney et al., 2014). Это означает, что для эффективного проникновения лекарственных препаратов и красителей в сфероид, а также отсутствия некроза в центре сфероида, его диаметр не должен превышать 200–250 мкм. Также не менее важным параметром является скорость пролиферации клеток в сфероиде. Особенно это важно при тестировании цитостатиков, действие которых основано на подавлении пролиферации клеток.

Известно, что не все типы клеток пролиферируют внутри сфероидов (Koudan et al., 2020). Для настоящей работы были выбраны клеточные линии Vero CCL-81 и HEK293, сохраняющие способность к пролиферации в условиях 3D-культивирования. В работе исследована антипролиферативная и цитотоксическая активность цисплатина, доксорубицина, фторурацила и этопозида на монослойной культуре и в сфероидах, сформированных из клеточных линий Vero CCL-81 и HEK293. Сравнительный анализ активности цитостатиков в условиях 2D и 3D показал, что сфероиды оптимального диаметра, состоящие из пролиферирующих клеток, могут являться отличным дополнением к существующим 2D-моделям для тестирования лекарственных средств *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Формирование сфероидов. В работе использовали клетки линий HEK293 и Vero CCL-81 (из коллекции АТСС). Клетки культивировали в среде DMEM (Gibco, США), содержащей 2 mM L-глутамин (Панэко, Россия) и 1-кратный раствор антибиотика-антимикотика (Gibco, США) с добавлением 10% (v/v) фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) при 37°C и 5% CO₂. Для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена (Панэко, Россия) и 0.25% раствор трипсина–ЭДТА (Gibco, США).

Сфероиды получали с помощью агарозных форм и с помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием. Оба метода используют один и тот же принцип формирования сфероидов, а именно: в условиях неадгезивной поверхности клетки не прикрепляются и не распластаются на субстрате, а взаимодействуют друг с другом, устанавливая межклеточные контакты и образуя сфероиды.

Формирование сфероидов с помощью агарозных форм проводили с использованием микро-молдов для создания агарозных форм (Microtissues, США) согласно протоколу производителя. Готовили 2%-ный раствор агарозы (Хеликон, Россия) в фосфатно-солевом буферном растворе (Gibco, США). Вносили в микро-молды для создания агарозных форм по 450 мкл расплавленной агарозы. После застывания агарозы (~4 мин) переворачивали микро-молды и извлекали образовавшиеся агарозные формы. Готовили суспензию клеток в культуральной среде с концентрацией 337000 кл./мл. В каждую агарозную форму, содержащую 256 ячеек, вносили по 190 мкл суспензии. Таким образом, итоговая концентрация составляла 250 клеток на ячейку или 250 клеток на сфероид. Агарозные формы с клетками помещали в ячейки 12-луночных планшетов, содержащие культуральную среду, и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч для формирования сфероидов.

Для формирования сфероидов с помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием использовали планшеты фирмы Corning (США). Готовили суспензию клеток в культуральной среде с концентрацией 2500 кл./мл. В каждую ячейку планшета вносили по 100 мкл суспензии. Для формирования сфероидов планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч.

Изучение кинетики роста сфероидов. Для формирования сфероидов нами был использован метод их получения при помощи агарозных форм, так как он позволяет получить большее количество статистических данных для анализа по сравнению с методом формирования в планшетах. Сфероиды получали с помощью агарозных форм согласно процедуре, описанной выше. Для формирования сфероидов использовали следующие концентрации клеток: 2000, 1000, 500 и 250 клеток на сфероид. Для изучения кинетики роста тканевых сфероидов проводили оценку их диаметров на протяжении 7 сут. Для этого фотографировали сфероиды во временных точках 1, 2, 3, 4 и 7 сут с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония).

Оценка жизнеспособности клеток с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D и путем измерения диаметров сфероидов. С помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием сформировали сфероиды с первоначальной концентрацией 250 клеток на 1 сфероид. Для формирования монослоя с такой же концентрацией клеток в каждую ячейку 96-луночных культуральных планшетов с плоским дном посадили по 250 клеток. Через 24 ч к клеткам в монослое и к сфероидам добавили препараты в тестируемых концентрациях (10⁻³–10⁻⁸ М для цисплатина, доксорубина и этопозиды (Эбеве Фарма, Австрия) и 10⁻²–10⁻⁷ М для фторурацила (Тева, Нидерланды), шаг разбавления 3.16) и культивировали в течение 72 ч. Через 72 ч фотографировали сфероиды с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония) для последующего расчета диаметров сфероидов, после чего в каждую лунку планшетов добавляли CellTiter-Glo 3D (Promega, США) в соотношении 1 : 1 по объему и инкубировали на протяжении 30 мин (для клеток) или 90 мин (для сфероидов).

Тест-система CellTiter-Glo 3D включает в себя белок-люциферазу, его субстрат люциферин и лизирующий буфер. В присутствии клеточного АТФ люцифераза катализирует окисление люциферина в возбужденный оксильюциферин. Переход оксильюциферина из возбужденного состояния в основное сопровождается испусканием люминесценции, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству молекул клеточного АТФ в растворе, то есть количеству

живых метаболически активных клеток. Люминесценцию оксильюциферина измеряли с помощью мультифункционального ридера Victor X3 (Perkin Elmer, США), далее абсолютные значения люминесценции нормализовали следующим образом: сигнал люминесценции клеток или сфероидов, необработанных цитостатиками, принимали за 100% жизнеспособности. Относительную жизнеспособность рассчитывали как процентное отношение сигналов люминесценции обработанных и необработанных цитостатиками клеток или сфероидов. Для каждого цитостатика рассчитывали IC₅₀ – концентрацию, при которой относительная жизнеспособность равна 50%.

Объем сфероидов пропорционален количеству живых клеток в сфероиде и может служить показателем жизнеспособности сфероидов. Расчет диаметров сфероидов проводили в программе ImageJ 1.48v software (NIH, Bethesda, MD). Объем сфероидов (V, мкм³) рассчитывали по формуле: $V = 1/6\pi d^3$, где d – диаметр сфероидов. При нормализации за 100% принимали объем сфероидов, необработанных цитостатиками. Относительный объем сфероидов рассчитывали как процентное отношение объемов обработанных и необработанных цитостатиками сфероидов. Для каждого цитостатика рассчитывали IC₅₀ – концентрацию, при которой относительный объем сфероидов равен 50%.

Оценка жизнеспособности клеток с помощью резазурина. С помощью агарозных форм, содержащих 256 углублений и помещенных в ячейки 12-луночных планшетов (по 1 форме в каждую ячейку), формировали сфероиды с первоначальной концентрацией 250 клеток на 1 сфероид. Для формирования монослоя с такой же концентрацией клеток в каждую ячейку 12-луночных планшетов рассеивали по 64000 клеток (256 × 250 клеток). Через 24 ч к клеткам в монослое и к сфероидам добавляли препараты в тестируемых концентрациях и культивировали в течение 72 ч.

Для оценки жизнеспособности клеток использовали натриевую соль резазурина (Sigma, США). Резазурин представляет собой нетоксичный краситель, который восстанавливается за счет аэробного дыхания метаболически активных клеток до флуоресцирующего резорфина, интенсивность флуоресценции которого прямо пропорциональна количеству живых клеток. Во все лунки добавляли 0.02%-ный раствор натриевой соли резазурина в питательной среде в соотношении 1:10 по объему и инкубировали на протяжении 6 ч (для клеток) или 18 ч (для сфероидов). Интенсивность флуоресценции резорфина измеряли с помощью мультифункционального ридера Victor X3 (Perkin Elmer, США), длина волны возбуждения составляла 555 нм, длина волны испускания составляла 580 нм, далее абсолютные значения флуоресценции

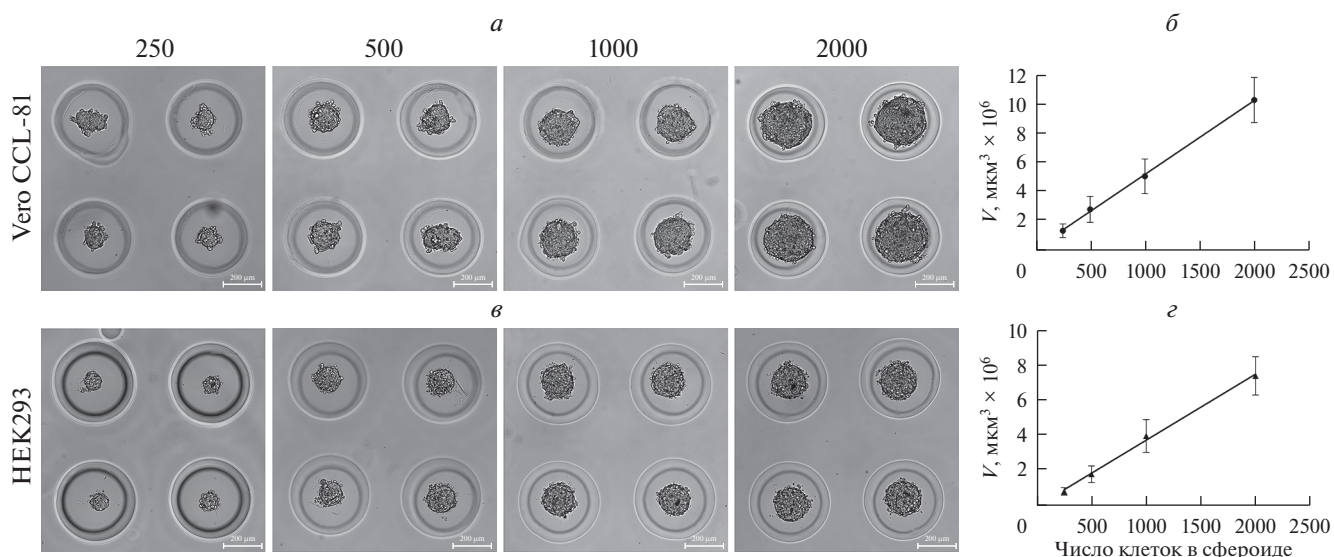


Рис. 1. Фазово-контрастные изображения сфероидов из клеток Vero CCL-81 (а) и HEK293 (в) и зависимость их объема V (б, г) от концентрации клеток через 1 сут после внесения клеточной суспензии в агарозные формы. Показаны средние значения и их стандартные отклонения ($n = 512$).

нормализовали следующим образом: сигнал флуоресценции клеток или сфероидов, необработанных цитостатиками, принимали за 100% жизнеспособности. Относительную жизнеспособность рассчитывали как процентное отношение сигналов флуоресценции обработанных и необработанных цитостатиками клеток или сфероидов. Для каждого цитостатика рассчитывали значение IC_{50} .

Оценка цитотоксичности тестируемых препаратов.

С помощью 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием формировали сфероиды с первоначальной концентрацией 250 клеток на сфероид. Для формирования монослоя с такой же концентрацией клеток в каждую ячейку 96-луночных культуральных планшетов с плоским дном рассеивали по 250 клеток. При формировании сфероидов и монослоя в клеточные суспензии добавляли реагент CellTox Green (Promega, США) в соотношении 1 : 500 по объему. CellTox Green содержит краситель, который проникает в мертвые клетки через поврежденную мембрану и связывается с ДНК, что вызывает разгорание флуоресценции, интенсивность которой пропорциональна количеству мертвых клеток. Через 24 ч к клеткам в монослое и к сфероидам, содержащим реагент CellTox Green, добавляли один из препаратов в тестируемой концентрации (см. выше) и культивировали в течение 72 ч. Через 72 ч фотографировали сфероиды с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью мультифункционального ридера Victor X3 (Perkin Elmer, США), длина волны

возбуждения составляла 485 нм, длина волны испускания составляла 535 нм. Для цитостатиков рассчитывали CC_{50} — концентрацию, при которой выполнялось равенство: $(F_t - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min}) \times 100\% = 50\%$, где F_t — сигнал флуоресценции для тестируемой концентрации, F_{\min} — минимальный сигнал флуоресценции, соответствующий сигналу для клеток или сфероидов, необработанных цитостатиками, F_{\max} — максимальный сигнал флуоресценции, соответствующий сигналу для клеток или сфероидов, обработанных лизирующим буфером, вызывающим 100%-ную гибель клеток или сфероидов.

Анализ данных. Обработку экспериментальных данных и статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Все исследуемые концентрации препаратов тестировали в квадруплетах. Рассчитывали значения концентраций IC_{50} и CC_{50} методом нелинейной регрессии с использованием трехпараметрической модели доза—эффект. Все эксперименты проводили в четырех независимых повторах. В качестве описательных статистик в работе приведены среднее арифметическое и стандартное отклонение (SD). Для сравнения количественных признаков в группах применяли критерий Манна—Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кинетика роста сфероидов. С помощью агарозных форм были сформированы сфероиды из клеточных линий HEK293 и Vero CCL-81, используя различные

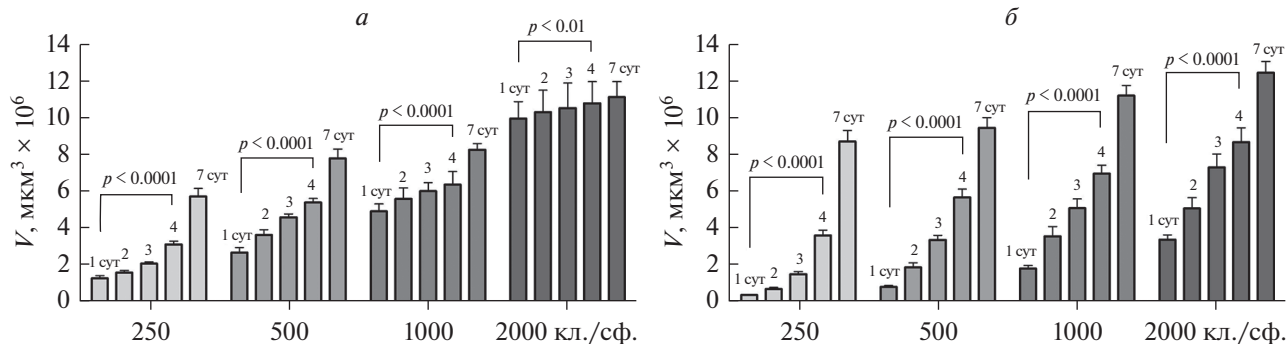


Рис. 2. Кинетика роста объема сфероидов (V), сформированных из Vero CCL-81 (а) и HEK293 (б). По горизонтали показано число клеток в 1 сфероиде (кл./сф.), показаны средние значения и стандартные отклонения ($n = 512$). Для сравнения величин V в группах (1-е и 4-е сут) применяли критерий Манна–Уитни.

первоначальные концентрации клеток: 250, 500, 1000 и 2000 клеток на 1 сфероид. Через 24 ч для обеих линий для всех концентраций клеток наблюдали образование сфероидов округлой формы с четкими краями и едиными размерами в пределах одной концентрации. В течение первых суток зависимость объема сфероидов (значения которого оценивали, измеряя его диаметр) от первоначальной концентрации клеток была линейной (рис. 1).

Конечной целью действия всех цитостатиков является ингибирование пролиферации клеток. В связи с этим, для использования сфероидов в качестве адекватной 3D-модели *in vitro* важно подобрать концентрацию клеток, при которой будет наблюдаться пролиферация клеток в сфероидах. С этой целью мы изучили кинетику роста сфероидов, сформированных из клеточных линий HEK293 и Vero CCL-81, в зависимости от первоначальных концентраций клеток. Полученные результаты представлены на рис. 2. Для обеих клеточных линий наблюдается обратная зависимость скорости роста объема сфероида от первоначальной концентрации клеток. Максимальная скорость роста наблюдается для наименьшей концентрации, составляющей 250 клеток на 1 сфероид. Проведено сравнение объемов сфероидов на 4-е и 1-е сут культивирования, поскольку цитостатики добавляли к 1-суточным сфероидам и культивировали в течение 72 ч. Показано, что различия между значениями объемов являются статистически достоверными для всех концентраций обеих клеточных линий. На основе полученных данных для дальнейших экспериментов была выбрана первоначальная концентрация 250 клеток на сфероид.

Влияние цитостатиков на пролиферацию клеток.

Существует большое количество реагентов, позволяющих оценить жизнеспособность клеток или сфероидов. Однако ни один из них не является идеаль-

ным. Поэтому для оценки влияния цитостатиков на пролиферацию клеток мы использовали три разных метода: с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D, с помощью натриевой соли резазурина, а также на основе измерения диаметров сфероидов.

Тест-система CellTiter-Glo 3D основана на измерении количества молекул клеточного АТФ в АТФ-зависимой люциферазной реакции. Окисление люциферина люциферазой в присутствии клеточного АТФ приводит к образованию оксилуциферина. Реакция сопровождается люминесценцией, сигнал которой пропорционален количеству живых метаболически активных клеток. Кривые зависимости относительной жизнеспособности клеток от концентрации тестируемых препаратов представлены на рис. 3. Рассчитанные из кривых значения IC_{50} приведены в таб. 1.

Сравнение полученных значений IC_{50} показало, что в случае Vero CCL-81 антипролиферативная активность препаратов для монослоя клеток выше, чем для сфероидов. В случае HEK293 доксорубин и этопозид демонстрируют незначительное снижение активности при тестировании на сфероидах, в то время как для цисплатина и фторурацила не наблюдается заметной разницы в активности между 2D- и 3D-вариантами.

Резазурин – кислотно-основной индикатор синего цвета, который в присутствии метаболически активных клеток необратимо восстанавливается до розового флуоресцирующего резорурфина. Наблюдаемый флуоресцентный сигнал прямо пропорционален количеству живых клеток. Кривые зависимости относительной жизнеспособности клеток от концентрации тестируемых препаратов представлены на рис. 4. Рассчитанные из кривых значения IC_{50} приведены в таб. 1.

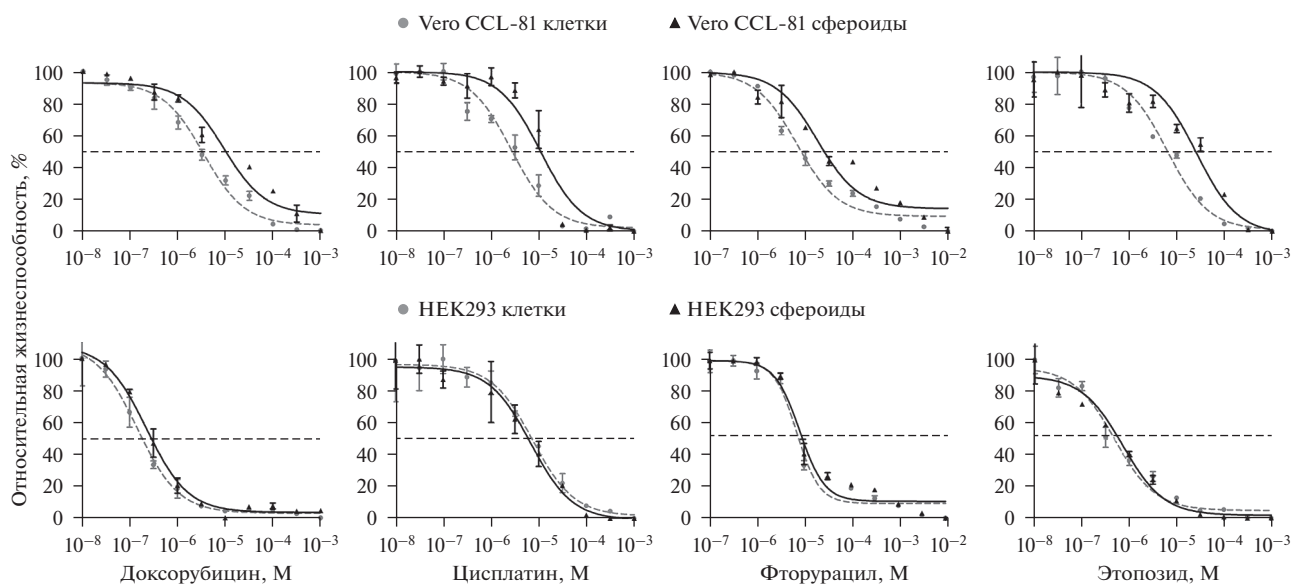


Рис. 3. Кривые зависимости относительной жизнеспособности Ver0 CCL-81 (верхний ряд) и HEK293 (нижний ряд) от концентрации цитостатиков, полученные с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D. Штриховая кривая (кружки) – клетки, сплошная (треугольники) – сфероиды. Показаны средние значения и их стандартные отклонения ($n = 4$). Для всех случаев, кроме цисплатина и фторурацила для HEK293, различия между значениями IC_{50} для клеток и сфероидов достоверны ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

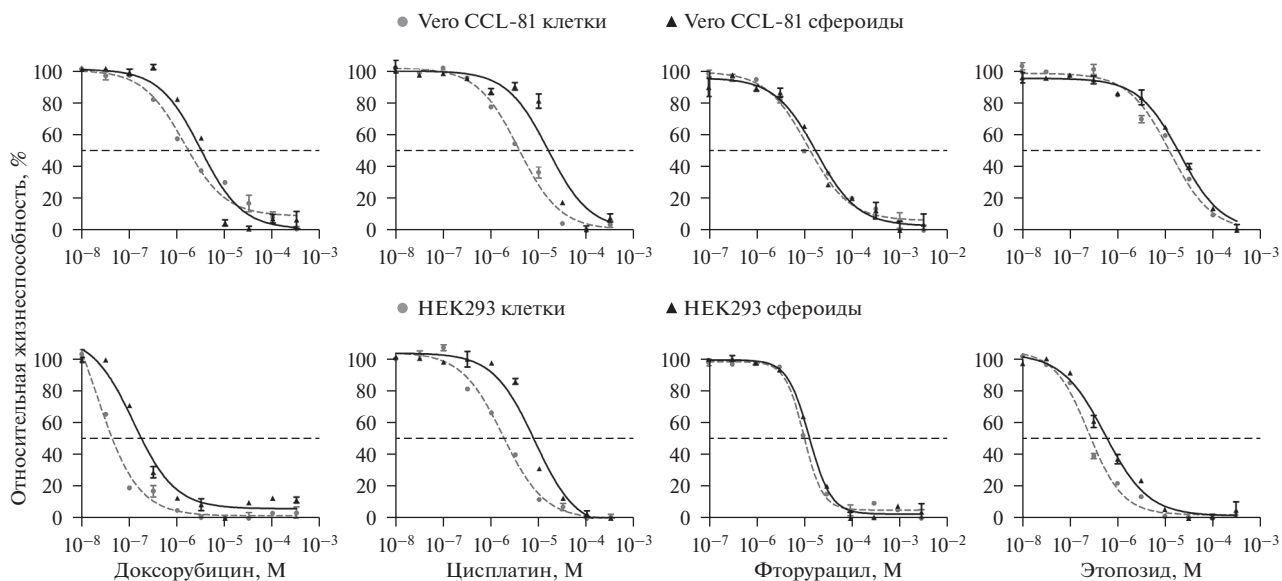


Рис. 4. Кривые зависимости относительной жизнеспособности Ver0 CCL-81 (верхний ряд) и HEK293 (нижний ряд) от концентрации цитостатиков, полученные с помощью резазурина. Штриховая кривая (кружки) – клетки, сплошная (треугольники) – сфероиды. Показаны средние значения и их стандартные отклонения, $n = 4$. Для всех случаев различия между значениями IC_{50} для клеток и сфероидов достоверны ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

При оценке антипролиферативной активности с помощью резазурина для обеих клеточных линий наблюдается снижение активности всех препаратов в условиях 3D-культивирования по сравнению с 2D.

При этом наиболее заметные различия значений IC_{50} получены для цисплатина.

Анализ сфероидов по многим параметрам является технически более сложной задачей, чем анализ

Таблица 1. Антипролиферативная активность препаратов (IC_{50}) для клеток Vero CCL-81 и HEK293 в монослое и в составе сфероидов. Оценка с помощью трех тестов

Оценка с помощью тест-системы CellTiter-Glo 3D; IC_{50} , мкМ ($M \pm SD$)				
Соединение	Vero CCL-81		HEK293	
	клетки	сфероиды	клетки	сфероиды
Доксорубин	3.5 ± 0.3	9.3 ± 1.9	0.15 ± 0.02	0.23 ± 0.03
Цисплатин	2.7 ± 0.3	11.0 ± 0.8	7.5 ± 1.8	6.9 ± 2.2
Фторурацил	6.7 ± 0.9	18.0 ± 4.0	7.0 ± 0.7	8.1 ± 0.8
Этопозид	6.4 ± 0.5	26.1 ± 3.5	0.49 ± 0.1	0.73 ± 0.08

Оценка с помощью резазурина; IC_{50} , мкМ ($M \pm SD$)				
Соединение	Vero CCL-81		HEK293	
	клетки	сфероиды	клетки	сфероиды
Доксорубин	1.4 ± 0.3	3.1 ± 0.2	0.02 ± 0.01	0.12 ± 0.02
Цисплатин	3.8 ± 0.3	15.9 ± 1.3	1.7 ± 0.2	8.1 ± 0.3
Фторурацил	11.9 ± 1.5	17.9 ± 1.9	10.4 ± 0.4	13.5 ± 0.5
Этопозид	12.5 ± 1.0	20.4 ± 1.3	0.24 ± 0.03	0.55 ± 0.05

Оценка путем измерения диаметров сфероидов; IC_{50} , мкМ ($M \pm SD$)				
Соединение	Vero CCL-81		HEK293	
	клетки	сфероиды	клетки	сфероиды
Доксорубин	—	9.3 ± 1.4	—	0.27 ± 0.04
Цисплатин	—	10.4 ± 1.5	—	5.5 ± 1.3
Фторурацил	—	7.3 ± 0.8	—	5.8 ± 0.4
Этопозид	—	12.9 ± 4.5	—	0.35 ± 0.06

монослоя клеток. Однако некоторые виды исследований для сфероидов могут быть проведены даже проще, чем для монослоя клеток, благодаря их форме. Так, оценить пролиферацию клеток в сфероиде можно и без использования каких-либо реагентов и красителей. Для этого достаточно измерить диаметры сфероидов при разных концентрациях тестируемых препаратов. На основе диаметров можно рассчитать объемы сфероидов, которые прямо пропорциональны количеству живых клеток в сфероиде. Кривые зависимости относительного объема сфероидов от концентрации тестируемых препаратов

представлены на рис. 5. Рассчитанные из кривых значения IC_{50} приведены в табл. 1.

Сравнение полученных значений IC_{50} показало, что фторурацил демонстрирует одинаковую антипролиферативную активность на обеих клеточных линиях, цисплатин чуть более активен в отношении клеток HEK293, а доксорубин и этопозид гораздо более активны в отношении HEK293, чем Vero CCL-81.

Цитотоксичность цитостатиков. Для оценки цитотоксичности цитостатиков использовали реагент CellTox Green, действие которого основано на изменении целостности мембраны клеток вследствие клеточной смерти. CellTox Green содержит краси-

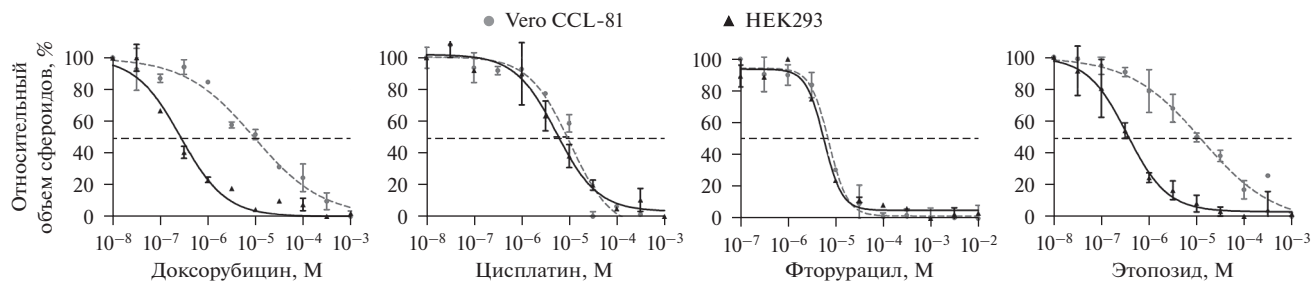


Рис. 5. Кривые зависимости относительного объема сфероидов из Vero CCL-81 и HEK293 от концентрации цитостатика. Штриховая кривая (кружки) – Vero CCL-81, сплошная (треугольники) – HEK293. Показаны средние значения и их стандартные отклонения ($n = 4$). Для всех случаев, кроме фторурацила, различия между значениями IC_{50} для сфероидов из Vero CCL-81 и HEK293 достоверны ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

тель, не способный проникнуть в живые клетки, но свободно проникающий в мертвые клетки через поврежденную мембрану. При связывании красителя с ДНК мертвой клетки наблюдается разгорание флуоресценции. Наблюдаемый флуоресцентный сигнал прямо пропорционален количеству мертвых клеток. Полученные результаты представлены в табл. 2 и на рис. 6.

Как видно из табл. 2, фторурацил не токсичен на обеих клеточных линиях как в 2D, так и в 3D. Цисплатин нетоксичен на HEK293 и клетках Vero CCL-81 и слаботоксичен на сфероидах из Vero CCL-81. Этопозид проявляет незначительную токсичность при высоких концентрациях. Доксорубин проявляет заметную токсичность, причем значение CC_{50} (~20 мкМ) приблизительно одинаково для обеих клеточных линий и обоих способов культивирования. На рис. 6 приведены изображения сфероидов, обработанных препаратами в концентрациях, близ-

ких к CC_{50} , мертвые клетки окрашены с помощью CellToxGreen.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сфероиды привлекают широкое внимание исследователей в качестве моделей *in vitro* для скрининга лекарственных препаратов. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области биофабрикации, визуализации и анализа трехмерных структур, работа со сфероидом все еще вызывает определенные сложности по сравнению с работой на монослойной культуре клеток.

В настоящей статье описана процедура формирования и последующего анализа сфероидов с помощью двух различных методов. Показано, что наряду с использованием достаточно дорогих 96-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием и коммерческого реагента CellTiter-Glo, возможно удешевление процесса за счет формирования сфероидов с помощью агарозных форм и их анализа посредством натриевой соли резазурина. Полученные значения IC_{50} для цитостатиков близки по значениям, что свидетельствует о сравнимой предиктивности обоих методов.

Для скрининга большого количества химических соединений мы рекомендуем формировать сфероиды с помощью коммерческих 96-луночных или 384-луночных планшетов с низкоадгезивным покрытием, так как планшеты хорошо совместимы с роботическим оборудованием, обеспечивают образование сфероидов единого стандартного диаметра, позволяют оперировать маленькими объемами реагентов и красителей. Единственным минусом метода является высокая стоимость планшетов. Формирование сфероидов с помощью агарозных форм целесообразно проводить в тех случаях, когда последующий анализ предполагает использование низко чувствительных реагентов или требуется большое количество статистических данных. Одна агарозная форма поз-

Таблица 2. Цитотоксическая активность препаратов (CC_{50}) для клеток Vero CCL-81 и HEK293 в монослое и в составе сфероидов

Соединение	CC_{50} , мкМ ($M \pm SD$)			
	Vero CCL-81		HEK293	
	клетки	сфероиды	клетки	сфероиды
Доксорубин	18 ± 4	17 ± 3	24 ± 7	25 ± 6
Цисплатин	>100	60 ± 8	>100	>100
Фторурацил	>1000	>1000	>1000	>1000
Этопозид	620 ± 70	300 ± 60	>1000	97 ± 15

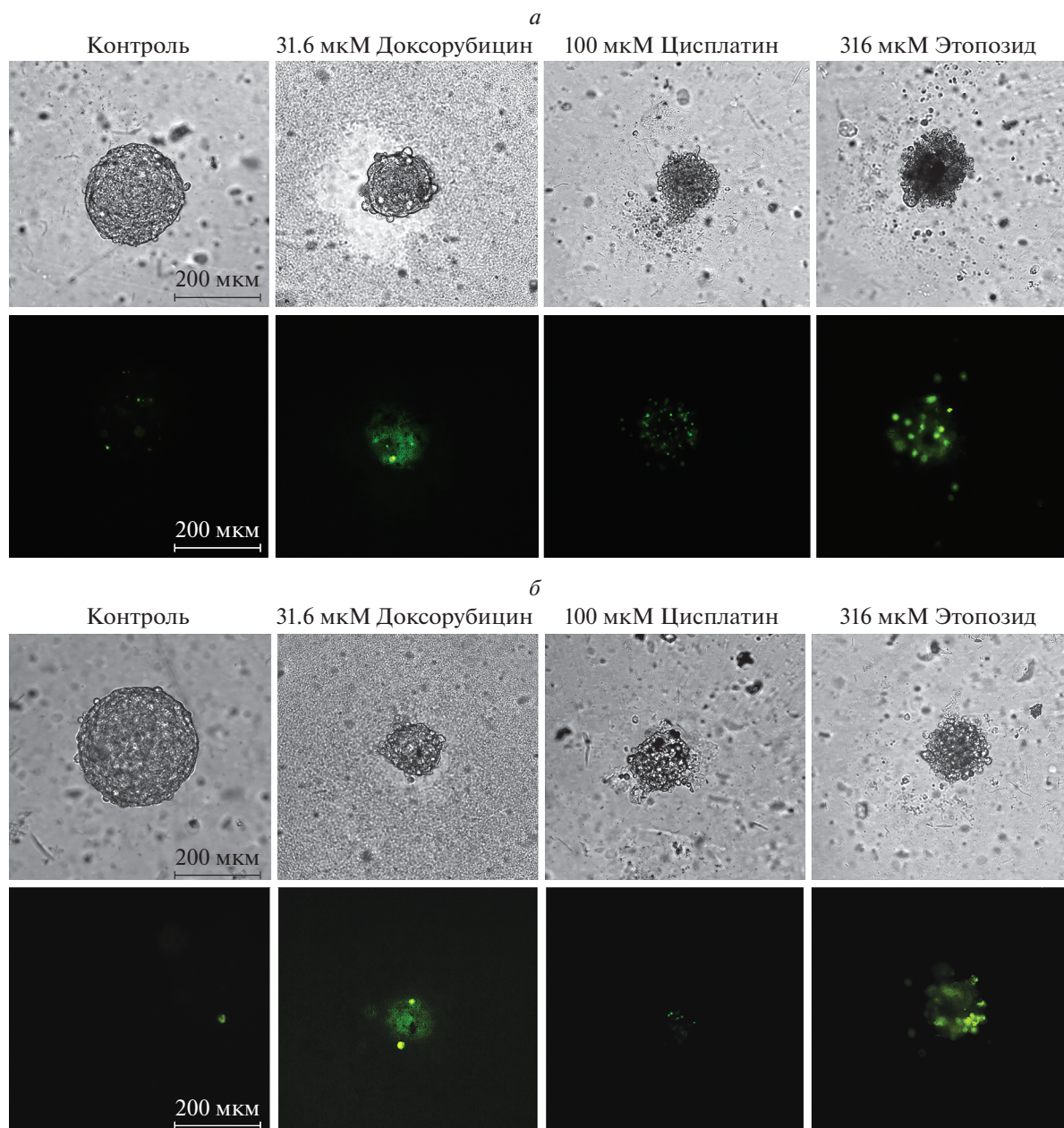


Рис. 6. Фазово-контрастные и флуоресцентные изображения клеточных сфероидов из Vero CCL-81 (*a*) и HEK293 (*б*), обработанных цитостатиками и окрашенных с помощью CellTox Green.

воляет сформировать 256 сфероидов, поэтому тестирование каждой концентрации препарата на одной агарозной форме в 256 раз увеличивает порог чувствительности анализа. Дополнительным преимуществом данного метода является его низкая стоимость. Однако метод не совместим с роботическими системами дозирования.

При формировании сфероидов особое внимание следует уделять первоначальному числу клеток в сфероиде, т.к. оно задает скорость пролиферации

клеток и, соответственно, финальный диаметр и объем сфероидов. В сфероиде большого диаметра (больше 250 мкм) развивается некроз, поскольку кислород и питательные вещества не достигают центра сфероиде. Соответственно при тестировании цитотоксической активности лекарственных препаратов невозможно отделить гибель клеток вследствие некроза. Кроме того, сами лекарственные вещества и красители также могут не доходить до центра сфероиде.

ида, что неизбежно повлияет на результаты эксперимента. Учитывая вышесказанное, очевидно, что использование сфероидов маленького диаметра более предпочтительно. В настоящей работе проведена оценка кинетики роста сфероидов в зависимости от первоначальной концентрации клеток и подобрана оптимальная концентрация, обеспечивающая формирование на 4-е сут сфероидов с диаметром, не превышающим 250 мкм ($V \leq 8.2 \times 10^6$ мкм³).

Сравнение значений IC₅₀ и CC₅₀, полученных для Vero CCL-81 и НЕК293, независимо от методов культивирования, демонстрирует различную активность цитостатиков на этих двух клеточных линиях (табл. 1, 2). Доксорубин и этопозид значительно более эффективно тормозят пролиферацию НЕК293, чем Vero CCL-81, при этом цитотоксический эффект на обеих клеточных линиях одинаков для всех препаратов. Учитывая, что обе клеточные линии представляют собой почечный эпителий, такой результат может объясняться тем, что антипролиферативная активность препаратов напрямую зависит от скорости пролиферации клеток, которая в случае НЕК293 в 4 раза выше, чем в случае Vero CCL-81. Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами работы, в которой установлено, что один и тот же препарат может проявлять разную активность в зависимости от выбранной для теста клеточной линии (Brajša et al., 2016b), что еще раз подтверждает необходимость обращать внимание на тип клеток при тестировании препаратов.

Сравнительный анализ активности препаратов на монослое клеток и на сфероидах показал, что в большинстве случаев антипролиферативный эффект цитостатиков более выражен в 2D-условиях (табл. 1), при этом их цитотоксическая активность ярче проявляется в 3D (табл. 2). Наши данные по антипролиферативной активности цитостатиков в монослое клеток хорошо согласуются с результатами работ, в которых оценивали активность тех же препаратов в 2D-условиях на тех же клеточных линиях (Quispe-Mauricio et al., 2009; Hall et al., 2011; Li et al., 2011; Sangmalee et al., 2016; Gupta et al., 2019; Valsalam et al., 2019; Wu et al., 2020). Более высокая активность цитостатиков в условиях 2D по сравнению с 3D может быть связана с более высокой доступностью клеток в монослое для тестируемых веществ.

Таким образом, нами проведена оценка антипролиферативной и цитотоксической активности четырех цитостатиков на клетках Vero CCL-81 и НЕК293 в условиях 2D- и 3D-культивирования. Согласно нашим данным, цитостатики проявляли в 3D-условиях такую же или меньшую антипролиферативную активность по сравнению с 2D-условиями, но были более токсичны. Можно предположить, что исполь-

зование 3D-культур при разработке новых лекарственных средств позволит выявить потенциальную токсичность препарата на ранних стадиях доклинических исследований. Полученные нами данные показывают, что сфероиды могут быть использованы для оценки эффективности лекарственных препаратов *in vitro*, как более точно отражающие архитектуру ткани и обеспечивающие более физиологичное окружение для клеток. Нами предложены два возможных алгоритма формирования и анализа сфероидов, один из которых является дорогим, чувствительным, быстрым и совместимым с роботическим оборудованием на всех стадиях процесса, другой – более дешевый, позволяющий получить большое количество статистических данных, но менее чувствительный, не роботизируемый и более медленный на стадии анализа. Для получения адекватных данных об активности химических соединений всегда следует учитывать восприимчивость клеточной культуры, скорость пролиферации клеток, а в случае сфероидов дополнительно подбирать оптимальный диаметр для каждой используемой клеточной линии, чтобы гарантировать отсутствие некроза и полное проникновение тестируемых веществ. Развитие методов формирования и анализа сфероидов в совокупности с развитием персонализированного подхода может вывести доклинические исследования, а также подбор эффективных доз препарата при клиническом применении на качественно новый уровень. При выборе таргетной терапии для конкретного пациента наилучшую предиктивную способность будут иметь сфероиды, сформированные из аутологичных клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была выполнена за счет средств частного учреждения Лаборатория биотехнологических исследований “3D Биопринтинг Солюшенс”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа была выполнена без использования животных или участия людей в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baker B.M., Chen C.S. 2012. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* V. 125. P. 3015.
- Bissell M.J. 2017. Goodbye flat biology – time for the 3rd and the 4th dimensions. *J. Cell Sci.* V. 130. P. 3.

- Brajša K., Trzun M., Zlatař I., Jelić D. 2016a. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. *Period. boil.* V. 118. P. 59.
- Brajša K., Vujanović I., Jelić D., Trzun M., Zlatař I., Karminski-Zamola G., Hranjec M. 2016b. Antitumor activity of amidino-substituted benzimidazole and benzimidazo[1,2-a]quinoline derivatives tested in 2D and 3D cell culture systems. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* V. 31. P. 1139–45.
- Eke I., Hehlhans S., Sandfort V., Cordes N. 2016. 3D matrix-based cell cultures: Automated analysis of tumor cell survival and proliferation. *Int J Oncol.* V. 48. P. 313–321.
- Fang Y., Eglan R.M. 2017. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discovery.* V. 22. P. 456.
- Fatehullah A., Tan S.H., Barker N. 2016. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat. Cell Biol.* V. 18. P. 246.
- Gupta G., You Y., Hadiputra R., Jung J., Kang D.K., Lee C.Y. 2019. Heterometallic BODIPY-based molecular squares obtained by self-assembly: Synthesis and biological activities. *ACS Omega.* V. 4. P. 13200.
- Hall M.D., Brimacombe K.R., Varonka M.S., Pluchino K.M., Monda J.K., Li J., Walsh M.J., Boxer M.B., Warren T.H., Fales H.M., Gottesman M.M. 2011. Synthesis and structure-activity evaluation of isatin- β -thiosemicarbazones with improved selective activity toward multidrug-resistant cells expressing P-glycoprotein. *J. Med Chem.* V. 54. P. 5878.
- Jasmund I., Schwientek S., Acikgöz A., Langsch A., Machens H.G., Bader A. 2007. The influence of medium composition and matrix on long-term cultivation of primary porcine and human hepatocytes. *Biomol. Eng.* V. 24. P. 59.
- Kinney M.A., Hookway T.A., Wang Y., McDevitt T.C. 2014. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Ann. Biomed. Eng.* V. 42. P. 352.
- Koudan E.V., Gryadunova A.A., Karalkin P.A., Korneva J.V., Meteleva N.Y., Babichenko I.I., Volkov A.V., Rodionov S.A., Parfenov V.A., Pereira F.D.A.S., Khesuani Y.D., Mironov V.A., Bulanova E.A. 2020. Multiparametric analysis of tissue spheroids fabricated from different types of cells. *Biotechnol. J.* V. 15. P. e1900217.
- Lancaster M. A., Knoblich J. A. 2014. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science.* V. 345. P. 1247125.
- Langhans S.A. 2018. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* V. 9. P. 6.
- Li Y., Revalde J.L., Reid G., Paxton J.W. 2011. Modulatory effects of curcumin on multi-drug resistance-associated protein 5 in pancreatic cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* V. 68. P. 603.
- Monjaret F., Fernandes M., Duchemin-Pelletier E., Argento A., Degot S., Young J. 2016. Fully automated one-step production of functional 3d tumor spheroids for high-content screening. *J. Lab. Autom.* V. 21. P. 268.
- Pampaloni F., Reynaud E.G., Stelzer E.H. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 8. P. 839.
- Quispe-Mauricio A., Callacondo D., Rojas J., Zavala D., Posso M., Vaisberg A. 2009. Actividad citotóxica de physalis peruviana (aguaymanto) en cultivos celulares de adenocarcinoma colorectal, próstata y leucemia mieloide crónica (Cytotoxic effect of physalis peruviana in cell culture of colorectal and prostate cancer and chronic myeloid leukemia). *Rev. Gastroenterol. Peru.* V. 29 P. 239.
- Sangmalee S., Laorpaksa A., Sritularak B., Sukrong S. 2016. Bioassay-guided isolation of two flavonoids from *derris scandens* with topoisomerase ii poison activity. *Biol. Pharm. Bull.* V. 39. P. 631.
- Thomas R.J., Bhandari R., Barrett D.A., Bennett A.J., Fry J.R., Powe D., Thomson B.J., Shakesheff K.M. 2005. The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro. *Cells Tissues Organs.* V. 181. P. 67.
- Valsalam S., Agastian P., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A., Ghilan A.M., Kaviyarasu K., Ravindran B., Chang S.W., Arokiyaraj S. 2019. Rapid biosynthesis and characterization of silver nanoparticles from the leaf extract of *Tropaeolum majus* L. and its enhanced in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and anticancer properties. *J. Photochem. Photobiol. B.* V. 191. P. 65.
- Wu C.P., Lusvarghi S., Tseng P.J., Hsiao S.H., Huang Y.H., Hung T.H., Ambudkar S.V. 2020. MY-5445, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, resensitizes ABCG2-overexpressing multidrug-resistant cancer cells to cytotoxic anticancer drugs. *Am. J. Cancer Res.* V. 10. P. 164.

The Determination of Cytostatic Activity on a 3D Spheroids-Based Model in Comparison with Conventional Monolayer Culture

E. V. Koudan^{a,*}, S. P. Kudan^b, S. Sh. Karshieva^{a,c}, Yu. D. Khesuani^a, V. A. Mironov^{a,d}, and E. A. Bulanova^a

^aLaboratory for Biotechnological Research 3D Bioprinting Solutions, Moscow, 115409 Russia

^bPablo Neruda School № 1568, Moscow, 127221 Russia

^cBlokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, 115478 Russia

^dSechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

*e-mail: koudan1980@gmail.com

It is becoming approved that screening of compounds on a platform applying two-dimensionally (2D)-cultured cell lines is incapable to precisely predict clinical activity of drugs; therefore three-dimensional (3D)-culture systems are emerging and show potential for better simulating the physiological cell microenvironment. In this regard, a 3D models that reflect all types of intercellular interactions, as well as the interaction of cells with the extracellular ma-

trix, are becoming increasingly accepted. Spheroids represent one of these models. The purpose of our study was to reveal the antiproliferative and cytotoxic activity of cisplatin, doxorubicin, fluorouracil, and etoposide on Vero CCL-81 and HEK293 cell lines under 2D (monolayer) and 3D (spheroids) culture conditions. The comparison of antiproliferative activity (IC_{50}) and cytotoxic activity (CC_{50}) obtained in different culture conditions revealed that the antiproliferative activity of compounds was higher in 2D while cytotoxic effect was more prominent in 3D. We suggest that cells in 3D are cultured in more physiological conditions, consequently they are more resistant to antiproliferative activity of compounds. More prominent cytotoxic effect in 3D allowed us to theorize that implementation of 3D spheroids-based model will allow to recognize early toxicity at the initial steps of preclinical studies in vitro. Our data approved that in the course of determination of compounds specific activity, cell type, the cell proliferation rate and in the optimal diameter of spheroids for each cell type should be taken into account.

Keywords: spheroids, monolayer, drugs, antiproliferative activity, cytotoxicity