

ПОВЕДЕНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ПОРИСТЫХ ГИДРОГЕЛЯХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВВЕДЕНИЯ И ДЕЙСТВИИ ДОКСОРУБИЦИНА

М. Х. Зухайб, Д. Т. Луонг, З.Ю. Сираева, А.А. Ергешов, Т.И. Салихова, С.В. Кузнецова,

Р.Г. Киямова, Т.И. Абдуллин

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

420021 Казань, ул. Парижской Коммуны, д.9.

Т.И. Абдуллин

Трехмерные модели опухолей представляют значительный интерес для изучения различных аспектов развития и терапии онкозаболеваний. Важной задачей остается совершенствование технологий создания матриц для опухолевых клеток. На примере гидрогелей желатина оценено влияние пористости на диффузионные характеристики матриц и инвазионную способность опухолевых клеток MCF-7 и PC-3. По данным оптимизированного MTS-теста эффективность заселения макропористого криогеля клетками повышалась в ряду: миграция из монослоя < поверхностная адгезия << инъекция. Опухолевые клетки в составе криогеля различались по миграционной и агрегационной активности; инъецированные клетки имели более равномерное и плотное заселение. В культуре на основе криогеля по сравнению монослойной культурой доксорубицин проявил в 3 раза меньшую цитотоксичность, что объясняется поддерживающим эффектом матрикса на рост и кластеризацию клеток. Результаты представляют интерес для создания моделей и графтов опухолей с контролируемыми свойствами.

Ключевые слова: трехмерные модели опухолей, пористые гидрогели, опухолевые клетки, заселение и анализ матриц, устойчивость к доксорубину

Email: tabdulli@gmail.com

Одной из наиболее актуальных задач в области клеточных технологий является создание информативных моделей для исследования жизнедеятельности опухолевых клеток и тканей, выявления их лекарственной устойчивости и скрининга противоопухолевых препаратов. Обычные культуры адгезионных клеток, выращиваемые на поверхности культуральной посуды, остаются наиболее используемыми в фундаментальных и прикладных исследованиях [8, 20]. Известно, что подобные культуры претерпевают

значительные фенотипические изменения вследствие редукции клеточных и, в особенности, клеточно-матриксных взаимодействий, что, зачастую, ограничивает возможности создания на их основе релевантных моделей опухолей человека [3, 1230].

Одним из подходов к решению данной проблемы является применение тканеподобных материалов из компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), формирующих нативное микроокружение для опухолевых клеток [11]. Подобные материалы, как правило, представляют собой поперечно-сшитые макромолекулярные гидрогели, наиболее соответствующие по своим физико-химическим свойствам мягким тканям [1]. Разработаны гидрогелевые матриксы для опухолевых клеток на основе коллагена [2], фибрина [7], ламинина [28], гиалуроновой кислоты [9] и других полисахаридов [22], а также их композиций с синтетическими полимерами [5], различающиеся по методам получения и характеристикам. Среди них коллагенсодержащие гидрогели остаются наиболее популярным реперным биоматериалом, используемым для как для создания методов фармакологического анализа, так и для повышения онкогенного потенциала опухолевых клеток при имплантации *in vivo* [4, 29].

Характерными недостатками большинства биоматериалов – производных ВКМ является вариабельность и анизотропия структуры/свойств получаемых гидрогелей [2], потенциальная иммуногенность биополимеров [24], а также значительный уровень гипоксии [21], ограничивающей выращивание в них живых клеток и формирование тканеподобных структур. Поэтому все более важную роль в развитии данного направления приобретают технологии конструирования улучшенных биоматериалов, обладающих высокой доступностью для клеток млекопитающих, с возможностью эффективного контроля структурных характеристик и регуляции клеточной активности [22, 30].

Перспективной “платформой” для создания подобных биоматериалов являются криогели – гидрогели с развитой системой взаимосвязанных пор, получаемые методом криополимеризации [16, 19, 22]. Работы последних лет продемонстрировали значительный потенциал однокомпонентных и композиционных криогелей в создании матриксов для культивирования клеток и тканеинженерных материалов для замещения и регенерации различных тканей [13, 15, 16, 17, 26]. Ключевым этапом создания на основе криогелей моделей опухолей является разработка эффективных процедур для заселения и мониторинга клеток в составе биоматериалов. Для решения данной задачи нами проведено сравнительное исследование модельных непористых гидрогелей и криогелей желатина в качестве матриксов для эпителиальных клеток опухоли молочной железы (MCF-7) и аденокарциномы

предстательной железы (РС-3), различающихся по своим адгезионным и инвазионным свойствам [9, 23]. Полученные результаты служат практической основой для контролируемого введения, культивирования и анализа опухолевых клеток в составе криогелевых матриц и представляют интерес в области фармакологических исследований и для создания опухолевых графтов.

Методика исследования

Получение и характеристика гидрогелей. Гидрогели получали путем кросс-сшивки водного раствора желатина (Sigma-Aldrich) глутаровым альдегидом (Acros Organics) в чашках Петри в различной концентрации компонентов как описано в [19, 22]. Для получения обычного гидрогеля реакцию смесь выдерживали при комнатной температуре до формирования стабильного гидрогелевого материала (~12 ч). Пористый гидрогель (криогель) получали методом криополимеризации, инкубируя реакцию смесь в охлаждающем термостате при температуре -12°C в течение 4 ч, с последующим выдерживанием в морозильной камере (-18°C) в течение 24 ч. Полученные криогели размораживали и промывали стерильным фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ).

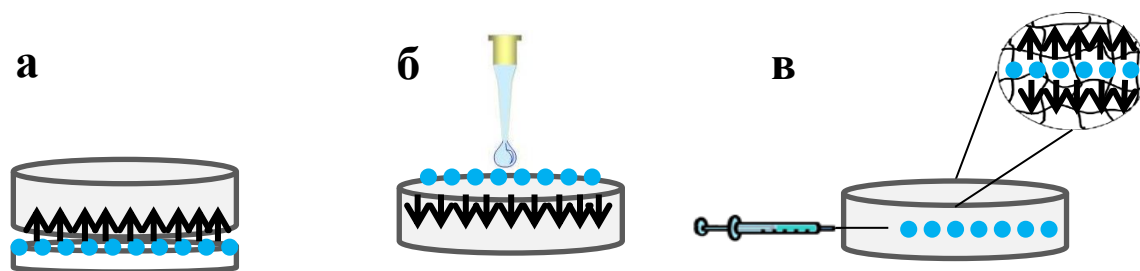
Гидратационные свойства гидрогелей исследовали в питательной среде DMEM (ПанЭко) с помощью теста на набухание. Для этого частично материалы разрезали на мембраны размером 1×1 см, помещали в избыток среды и инкубировали при температуре 37°C . Регистрировали массу гидратированных образцов на аналитических весах с точностью 0.1 мг. Индекс набухания (ИН) рассчитывали для полностью гидратированных образцов по формуле: $\text{ИН} (\%) = (m_{\text{гидр}} - m_{\text{сух}}) / m_{\text{сух}} \times 100\%$, $m_{\text{гидр}}$ и $m_{\text{сух}}$ – масса гидратированного и высушенного образца гидрогелей, соответственно. Данные представляли в виде сред.знач. \pm стандарт.отклон. ($n=3$).

Условия культивирования клеток. Клетки MCF-7 и РС-3 (получены из Американской коллекции типовых культур, АТСС) культивировали асептически в питательной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко) в стандартных условиях (температура 37°C , увлажненная воздушная атмосфера с 5% CO_2). Для посева и получения рабочих суспензий клетки диссоциировали раствором трипсина с ЭДТА (ПанЭко), осаждали центрифугированием и ресуспендировали в требуемом растворе.

Для культивирования клеток с гидрогелями мембраны разрезали на круглые образцы с толщиной и диаметром, соответственно, 3 и 10 мм. Далее мембраны уравнивали питательной средой, выдерживая в избытке DMEM при 37°C в асептических условиях, и переносили в культуральные планшеты.

Сравнительная оценка миграции клеток в гидрогели. Мембраны помещали в 12-луночный планшет и добавляли в лунки среду DMEM с сывороткой до уровня на 1 мм ниже верхней поверхности гидрогеля. На мембрану наносили аликвоту суспензии клеток в среде DMEM без сыворотки (10 тыс. клеток) и культивировали 6 ч в стандартных условиях. Далее гидрогели промывали ФСБ, инкубировали в 4% растворе *n*-формальдегида в ФСБ (Acros Organics) в течение 2.5 ч с последующей промывкой. Фиксированные клетки окрашивали ядерным красителем 4,6-диамино-2-фенилиндол DAPI (Sigma-Aldrich) и визуализировали методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) на микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss).

Способы введения клеток в криогели. Ниже представлена схема, иллюстрирующая тестируемые способы введения клеток в мембраны криогелей, включающие миграцию из монослоя (а), поверхностную адгезию (б), инъекцию в объем материала (в), где фронт миграции клеток указан стрелками:



Для введения клеток в условиях миграции мембраны помещали на поверхность предварительно выращенного субконфлюэнтного слоя клеток в 24-луночном планшете (а). При поверхностной адгезии и инъекции получали суспензию клеток (100 тыс. клеток в 25 мкл), которую, соответственно, наносили на поверхность криогеля с помощью дозатора (б) или вводили в объем криогеля горизонтально инсулиновым шприцем на глубину ~1.5 мм от поверхностей (в). Криогели с клетками культивировали в стандартных условиях в течение 1-7 сут со сменой среды через каждые 24 ч.

MTS-тест. Выявление клеток в монослойной культуре и в составе криогелей проводили с помощью MTS-теста согласно рекомендациям производителя (Promega). Образцы криогелей с выращенными клетками промывали стерильным ФСБ, переносили в чистый планшет без клеток, добавляли среду, содержащую индикаторы (MTS/PMS), и культивировали установленное время. Окрашенный продукт восстановления MTS клетками детектировали при $\lambda=490$ нм на микропланшетном анализаторе Infinite M200 PRO (Tecan). В качестве контроля использовали криогели, выдерживаемые в среде в отсутствие клеток.

Цитотоксичность доксорубина (Teva Pharmaceutical Industries) исследовали в отношении опухолевых клеток, культивируемых на поверхности 96-луночного планшета (2 тыс. посаженных в лунку клеток) и в составе мембраны криогеля (10 тыс. инъекционных

клеток) в 24-луночном планшете при одинаковом соотношении числа клеток к объему питательной среды. Клетки культивировали в присутствии серийно разведенного доксорубина 1.5 нМ–15 мкМ в течение 72 ч. Число/жизнеспособность клеток в матриксе оценивали с помощью MTS-теста относительно выращенных без доксорубина клеток, жизнеспособность которых принимали за 100%. Полумаксимальные ингибирующие концентрации препарата (IC₅₀) рассчитывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism5.0. Данные представляли в виде сред.знач. ± стандарт.отклон. (n=3).

Визуализация клеток в криогелях. По окончании установленного времени культивирования матриксы с клетками промывали ФСБ, фиксировали в 4% растворе *n*-формальдегида, окрашивали в водном растворе толуидинового синего (0.1%, pH 2.3) (Acros Organics) в течение 15 мин. Для приготовления криосрезов матриксы замораживали в среде NEG-50 (Thermo Scientific) и получали серийные продольные срезы (150 мкм) с помощью Microm HM 560 (Thermo Scientific). Окрашенные клетки выявляли на поверхностных участках целостной мембраны и криосрезах методом светлопольной микроскопии на микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss).

Фиксированные клетки и структуру криогеля визуализировали методом ЛСКМ на микроскопе LSM 780 посредством детекции флуоресценции DAPI и аутофлуоресценции кросс-сшитого желатина, соответственно. Анализ клеток в периферических участках криогеля (глубиной до 100-200 мкм) проводили на цельных мембранах. Для выявления клеток и их агрегатов в объеме криогеля получали поперечные срезы мембраны (1 мм) с использованием лезвия микротомов R-35 (Feather).

Результаты исследования

Сравнительная характеристика гидрогелей. В работе исследованы два типа гидрогелевых материалов на основе желатина: обычный гидрогель с равномерным распределением полимерной сетки в объеме и гидрогель с ячеистой структурой, получаемый при криополимеризации (криогель). Тестируемые материалы существенно различались по скорости набухания в питательной среде DMEM и достигали полностью гидратированного состояния, приблизительно, через 48 ч (гидрогель) и 1 ч (криогель) (рис. 1, а). Индекс набухания материалов составил, соответственно, 2135 и 4411%.

Усиленные гидратационные свойства криогеля обусловлены его макропористой структурой, которая обеспечивает абсорбцию воды в объеме за счет капиллярных сил и повышенную площадь диффузии веществ в материале [10, 14], тогда как в обычном гидрогеле диффузионный процесс лимитирован поверхностью материала, что в значительной степени затрудняет его доступность для веществ и клеток [27]. Для

сопоставления способности опухолевых клеток мигрировать в гидрогелевые материалы, последние уравнивали средой DMEM с 10% сывороткой и культивировали в контакте с клетками MCF-7 и PC-3 в течение 6 ч. По данным ЛСКМ клетки лишь адгезировали на поверхности гидрогеля, не проникая в его объем (рис. 1, б, I). В случае криогеля клетки MCF-7 мигрировали в матрикс на сходную глубину ~250-450 мкм, тогда как клетки PC-3 обнаруживались в различных слоях до глубины ~550-700 мкм (рис. 1, б, II). Результаты показывают, что опухолевые клетки не мигрируют в гидрогель с питательной средой, но эффективно инфильтрируют криогель. По-видимому, непористая гидрогелевая сетка, в отличие от ячеистой, не поддерживает достаточный уровень обмена газов и веществ для жизнедеятельности клеток [27].

Макропористая структура криогеля позволила применить метаболический MTS-тест для детекции клеток в матриксе. На (рис. 1, в) показана кинетика накопления продукта восстановления MTS клетками в объеме криогеля (3D) и на поверхности культурального планшета (2D). Сравнение кинетических кривых в начальный период времени (≤ 2 ч) показывает, что метаболизация индикатора MTS клетками в криогеле происходит, усреднено, лишь в ~1.5 раза медленнее по сравнению клетками на поверхности планшета. Это подтверждает, что криогелевый матрикс не оказывает значительного торможения на процесс диффузии низкомолекулярных веществ в его составе. Сигнал восстановления MTS характеризовался линейной зависимостью от количества введенных в криогель клеток (рис. 2, а), что свидетельствует о возможности определения содержания клеток, культивируемых в составе матриксов, с использованием MTS-теста.

Культивирование клеток в криогеле при разных способах посева. Для повышения эффективности введения клеток в криогели проведено сравнительное исследование трех способов посева: миграции клеток из монослоя в контакте с криогелем, а также поверхностная адгезия или инъекция шприцем (100 тыс. клеток на мембрану). По данным MTS-теста содержание клеток в матриксе повышалось в ряду: миграция < поверхностная адгезия << инъекция (рис. 2). При 1-м способе оптический сигнал, генерируемый клетками MCF-7 и PC-3, изменялся на 3 день с 0.11 и 0.15 опт. ед., соответственно, до 0.16 и 0.41 опт. ед. на 7 день (рис. 2, б). Повышение отношения регистрируемых сигналов для клеток PC-3 и MCF-7 при 7-дневном культивировании указывает на повышенную пролиферацию клеток PC-3 в матриксе. По сравнению с миграцией при поверхностной адгезии содержание клеток MCF-7 и PC-3 в матриксе повышалось: сигнал на 3 день составлял, соответственно, 0.25 и 0.42 опт. ед. (рис. 2, в).

При инъекции детектировался значительно более высокий сигнал уже при 1-дневном культивировании: 0.28 и 0.75 опт. ед. для клеток MCF-7 и PC-3 (рис. 2, г). По данным

калибровочного графика (рис. 2, а) эти сигналы, соответствовали плотности клеток, приблизительно, 320 и 780 тыс. клеток на мембрану. Принимая во внимание одинаковую плотность посева при инъекции и поверхностной адгезии, последний из двух способов, по-видимому, сопровождается частичным откреплением клеток с поверхности матрикса при культивировании. Относительно низкое (в 1.5 раза) увеличение сигнала для инъецированных клеток РС-3 на 3 день по сравнению с 1 днем (рис. 2, г) указывает на субконфлюэнтные условия пролиферации клеток.

Распределение клеток в криогеле по данным оптической микроскопии. Наряду с общим содержанием клеток оценена их локализация в матриксе методами оптической микроскопии. Полупрозрачная структура криогеля позволила визуализировать окрашенные клетки в прилегающем к поверхности слое матрикса с помощью светлопольной микроскопии (рис. 3, а, б). Для выявления клеток в объеме криогеля получали продольные криосрезы толщиной 150 мкм (рис. 3, в). Как в условиях миграции (рис. 3, а), так и поверхностной адгезии (рис. 3, б) клетки MCF-7 и РС-3 концентрировались, преимущественно, на стороне контакта с матриксом в виде отдельных клеток с типичной морфологией и их скоплений (рис. 3, а, б) и почти не обнаруживались в более глубоких слоях.

Число клеток РС-3 в репрезентативных полях криогеля было выше, чем клеток MCF-7 (рис. 3, а, б), что согласуется с данными MTS-теста (рис. 2). Между скоплениями клеток РС-3 выявлялись протяженные структуры, которые, по-видимому, соответствуют миграционным каналам, прокладываемым клетками в объеме криогеля (рис. 3, а). В случае инъекции клетки обнаруживались в различных слоях матрикса. На криосрезах клетки РС-3 характеризовались более плотным расположением и интеграцией с материалом криогеля в отличие от клеток MCF-7, формирующих, преимущественно, межклеточные агрегаты (рис. 3, в). Обнаружено, что клетки MCF-7 вызывают разрыхление матрикса, затрудняющее получение криосрезов.

По данным ЛСКМ в условиях миграции клетки также имели поверхностную локализацию в криогеле: клетки РС-3 были распределены более равномерно в виде обособленных клеток, тогда как клетки MCF-7 в большей степени формировали кластеры (рис. 4, а). В случае адгезии кластеризация обоих типов клеток в поверхностном слое усиливалась, при этом отдельные клетки и агрегаты обнаруживались на глубине до ~700 мкм от поверхности криогеля (рис. 4, б). Инъекция клеток обеспечила наибольшее заселение криогеля, плотность которого была значительно выше для клеток РС-3, чем MCF-7 (рис. 4, в), что коррелирует с данными MTS-теста (рис. 2, г) и результатами анализа криосрезов (рис. 3, в). В этих условиях хорошо заметно постепенное уменьшение плотности клеток РС-3 при движении от поверхностных и краевых участков в объем криогеля (рис. 4, в), что объясняется наличием определенного концентрационного градиента компонентов

питательной среды и кислорода в матриксе [18, 21]. В совокупности, результаты показывают, что инъекционный способ позволяет существенно повысить степень и равномерность заселения криогеля опухолевыми клетками. Инъецированные клетки мигрируют из зоны введения и эффективно заселяют различные слои криогеля; их распределение, локализация и поведение в матриксе, по-видимому, зависит как от градиента нутриентов, так и от фенотипических особенностей самих клеток. В составе криогеля клетки РС-3 обладают усиленной миграционной и пролиферативной активностью, а клетки MCF-7 – повышенной способностью формировать сфероидоподобные агрегаты, чему, вероятно, дополнительно благоприятствует пористая структура матрикса [3, 12, 20].

Чувствительность опухолевых клеток в составе криогеля к доксорубину.

Исследован цитотоксический эффект противоопухолевого препарата доксорубин на клетки MCF-7 и РС-3 при культивировании в течение 72 ч в монослое на поверхности планшета и в криогеле, заселенном инъекционным способом (рис. 5, 2D и 3D, соответственно). По данным MTS-теста значения IC_{50} доксорубина для клеток РС-3 и MCF-7 составили, соответственно, 0.97 ± 0.19 и 0.11 ± 0.02 мкМ (2D) и 2.42 ± 0.32 и 0.35 ± 0.08 мкМ (3D). Результаты показывают, что культивирование опухолевых клеток в криогелевом матриксе приводит почти к 3-кратному понижению цитотоксичности доксорубина для обоих клеточных типов по сравнению с культивированием в монослое. В условиях продолжительной экспозиции подобный эффект, по-видимому, связан не столько с диффузионным фактором, сколько со способностью микроокружения матрикса стабилизировать клетки, а также усиливать клеточные взаимодействия и агрегацию, тем самым, понижая доступность препарата. Сходное повышение лекарственной резистентности наблюдали для различных опухолевых клеток в составе нанопибриллярного пептидного скаффолда [25] и гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты [6].

Полученные результаты позволяют рассматривать криогели на основе желатина в качестве прототипа тканеимитирующего матрикса для роста опухолевых клеток, а также исследования эффектов противоопухолевых препаратов в более релевантных условиях по сравнению с монослойной культурой. Подобные матриксы позволяют проводить воспроизводимый анализ в них содержания/пролиферации клеток (рис. 2) и цитотоксической активности с помощью MTS-теста (рис. 5). Для дополнительной характеристики поведения опухолевых клеток в криогеле может быть применен микроскопический анализ как методом ЛСКМ (рис. 4), так и более доступной светлопольной микроскопии (рис. 3).

Результаты проведенного исследования служат основой для создания *in vitro* моделей опухолей, имитирующих условия *in vivo*. Охарактеризованы способы введения клеток в

криогели, обеспечивающие их эффективное и контролируемое заселение, которые могут быть использованы для решения различных задач в области клеточных технологий. Показана возможность применения криогелей с инъецированными клетками в качестве удобных матриц для информативного анализа цитотоксических эффектов противоопухолевых препаратов. Перспективным направлением дальнейших исследований является модификация криогелевого матрикса биоактивными факторами, усиливающими образование и лекарственную резистентность опухолей. Подобные матрицы также представляют интерес для повышения приживаемости опухолевых клеток *in vivo* при формировании опухолевых графтов.

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров на 2013-2020 гг. Исследования выполнены с использованием оборудования Междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» КФУ.

Литература

1. *Asghar W., El Assal R., Shafiee H., Pitteri S., Paulmurugan R., Demirci U.* Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models // *Materials today*. 2015. Vol. 18, N 10. P. 539-53.
2. *Campbell J.J., Husmann A., Hume R.D., Watson C.J., Cameron R.E.* Development of three-dimensional collagen scaffolds with controlled architecture for cell migration studies using breast cancer cell lines // *Biomaterials*. 2017. Vol. 114, P. 34-43.
3. *Cavo M., Fato M., Penuela L., Beltrame F., Raiteri R., Scaglione S.* Microenvironment complexity and matrix stiffness regulate breast cancer cell activity in a 3D in vitro model // *Scientific reports*. 2016. Vol. 6, P. 35367.
4. *Chen L., Xiao Z., Meng Y., Zhao Y., Han J., Su G., Chen B., Dai J.* The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, N 5. P. 1437-44.
5. *Cruz-Acuna R., Garcia A.J.* Synthetic hydrogels mimicking basement membrane matrices to promote cell-matrix interactions // *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2017. Vol. 57-58, P. 324-33.
6. *David L., Dulong V., Le Cerf D., Cazin L., Lamacz M., Vannier J.P.* Hyaluronan hydrogel: an appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity // *Acta biomaterialia*. 2008. Vol. 4, N 2. P. 256-63.
7. *Del Bufalo F., Manzo T., Hoyos V., Yagyu S., Caruana I., Jacot J., Benavides O., Rosen D., Brenner M.K.* 3D modeling of human cancer: A PEG-fibrin hydrogel system to study the role of tumor microenvironment and recapitulate the in vivo effect of oncolytic adenovirus // *Biomaterials*. 2016. Vol. 84, P. 76-85.
8. *Dunne L.W., Huang Z., Meng W., Fan X., Zhang N., Zhang Q., An Z.* Human decellularized adipose tissue scaffold as a model for breast cancer cell growth and drug treatments // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35, N 18. P. 4940-9.

9. Fisher S.A., Anandakumaran P.N., Owen S.C., Shoichet M.S. Tuning the Microenvironment: Click-Crosslinked Hyaluronic Acid-Based Hydrogels Provide a Platform for Studying Breast Cancer Cell Invasion // *Adv Funct Mater.* 2015. Vol. 25, N 46. P. 7163-72.
10. Gun'ko V.M., Savina I.N., Mikhailovsky S.V. Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation // *Advances in colloid and interface science.* 2013. Vol. 187-188, P. 1-46.
11. Hinderer S., Layland S.L., Schenke-Layland K. ECM and ECM-like materials - Biomaterials for applications in regenerative medicine and cancer therapy // *Advanced drug delivery reviews.* 2016. Vol. 97, P. 260-9.
12. Imamura Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., Kiyota N., Takao S., Kono S., Nakatsura T., Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer // *Oncology reports.* 2015. Vol. 33, N 4. P. 1837-43.
13. Kwon S., Lee S., Sivashanmugam A., Kwon J., Kim S., Noh M., Kwon S., Jayakumar R., Hwang N. Bioglass-Incorporated Methacrylated Gelatin Cryogel for Regeneration of Bone Defects // *Polymers.* 2018. Vol. 10, N 8. P. 914.
14. Leddy H.A., Awad H.A., Guilak F. Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: effects of scaffold material, time, and culture conditions // *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials.* 2004. Vol. 70, N 2. P. 397-406.
15. Luo L.J., Lai J.Y., Chou S.F., Hsueh Y.J., Ma D.H. Development of gelatin/ascorbic acid cryogels for potential use in corneal stromal tissue engineering // *Acta biomaterialia.* 2018. Vol. 65, P. 123-36.
16. Petrenko Y.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I., Petrenko A.Y. Comparison of the methods for seeding human bone marrow mesenchymal stem cells to macroporous alginate cryogel carriers // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2011. Vol. 150, N 4. P. 543-6.
17. Petrenko Y.A., Petrenko A.Y., Damshkaln L.G., Volkova N.A., Lozinsky V.I. Growth and adipogenic differentiation of mesenchymal stromal bone marrow cells during culturing in 3D macroporous agarose cryogel sponges // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2008. Vol. 146, N 1. P. 129-32.
18. Roh J.D., Nelson G.N., Udelsman B.V., Brennan M.P., Lockhart B., Fong P.M., Lopez-Soler R.I., Saltzman W.M., Breuer C.K. Centrifugal seeding increases seeding efficiency and cellular distribution of bone marrow stromal cells in porous biodegradable scaffolds // *Tissue engineering.* 2007. Vol. 13, N 11. P. 2743-9.
19. Savina I.N., Gun'ko V.M., Turov V.V., Dainiak M., Phillips G.J., Galaev I.Y., Mikhailovsky S.V. Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo-hydrogels // *Soft Matter.* 2011. Vol. 7, N 9. P. 4276-83.
20. Sieh S., Lubik A.A., Clements J.A., Nelson C.C., Hutmacher D.W. Interactions between human osteoblasts and prostate cancer cells in a novel 3D in vitro model // *Organogenesis.* 2010. Vol. 6, N 3. P. 181-8.
21. Szot C.S., Buchanan C.F., Freeman J.W., Rylander M.N. 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, N 31. P. 7905-12.
22. Tam R.Y., Fisher S.A., Baker A.E.G., Shoichet M.S. Transparent Porous Polysaccharide Cryogels Provide Biochemically Defined, Biomimetic Matrices for Tunable 3D Cell Culture // *Chem Mater.* 2016. Vol. 28, N 11. P. 3762-70.
23. Taubenberger A.V., Bray L.J., Haller B., Shaposhnykov A., Binner M., Freudenberg U., Guck J., Werner C. 3D extracellular matrix interactions modulate tumour cell growth, invasion and angiogenesis in engineered tumour microenvironments // *Acta biomaterialia.* 2016. Vol. 36, P. 73-85.

24. Wu Y., Puperi D.S., Grande-Allen K.J., West J.L. Ascorbic acid promotes extracellular matrix deposition while preserving valve interstitial cell quiescence within 3D hydrogel scaffolds // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2017. Vol. 11, N 7. P. 1963-73.
25. Yang Z., Zhao X. A 3D model of ovarian cancer cell lines on peptide nanofiber scaffold to explore the cell-scaffold interaction and chemotherapeutic resistance of anticancer drugs // *International journal of nanomedicine*. 2011. Vol. 6, P. 303-10.
26. Yergeshov A.A., Siraeva Z.Y., Kazakova R.R., Mullin R.I., Davliev D.M., Zakirova A.A., Salikhova T.I., Kuznetsova E.V., Luong D.T., Savina I.N., Abdullin T.I. Effect of gelatin cryogel on proliferation and synthetic activity of fibroblasts in excision wound model // *Genes and Cells*. 2015. Vol. 10, N 4. P. 29-33.
27. You F., Wu X., Zhu N., Lei M., Eames B.F., Chen X. 3D Printing of Porous Cell-Laden Hydrogel Constructs for Potential Applications in Cartilage Tissue Engineering // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2016. Vol. 2, N 7. P. 1200-10.
28. Zhang X., Fournier M.V., Ware J.L., Bissell M.J., Yacoub A., Zehner Z.E. Inhibition of vimentin or beta1 integrin reverts morphology of prostate tumor cells grown in laminin-rich extracellular matrix gels and reduces tumor growth in vivo // *Molecular cancer therapeutics*. 2009. Vol. 8, N 3. P. 499-508.
29. Zheng L., Hu X., Huang Y., Xu G., Yang J., Li L. In vivo bioengineered ovarian tumors based on collagen, matrigel, alginate and agarose hydrogels: a comparative study // *Biomedical materials*. 2015. Vol. 10, N 1. P. 015016.
30. Zhu W., Holmes B., Glazer R.I., Zhang L.G. 3D printed nanocomposite matrix for the study of breast cancer bone metastasis // *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2016. Vol. 12, N 1. P. 69-79.

Рис. 1. Сравнительная характеристика гидрогеля и криогеля.

а — Кинетика гидратации гидрогеля и криогеля в питательной среде DMEM; б — Репрезентативные микрофотографии гидрогеля (I) и криогеля (II), уравновешенных средой DMEM, с мигрировавшими клетками MCF-7 и PC-3 по 6-часового контакта (ЛСКМ, боковой разрез окрашивание DAPI, стрелки указывают сторону посева клеток); в — Кинетика восстановления индикатора MTS клетками PC-3 в объеме криогеля (3D) и на поверхности культурального планшета (2D).

Рис. 2. Содержание опухолевых клеток в культивируемых криогелях по данным MTS-теста при различных способах посева.

а — зависимость оптического сигнала от числа введенных в криогель клеток PC-3; б — миграция из монослоя; в — поверхностная адгезия; г — инъекция в объем. В случае (б) и (в) вводили 100 тыс. клеток в 25 мкл. Толщина и диаметр мембраны криогеля 3 и 10 мм. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Рис. 3. Визуализация и отслеживание путей миграции опухолевых клеток в составе криогелей при различных способах посева методом светлопольной инвертированной (а,б) и прямой (в) микроскопии.

а,б — микрофотографии целостного матрикса в зоне контакта с клетками (а — миграция из монослоя; б — поверхностная адгезия) ; в — микрофотографии продольных криосрезов матрикса (150 мкм) на различной глубине (d) с инъецированными клетками. Фиксация в *n*-формальдегиде, окрашивание толуидиновым синим.

Рис. 4. Визуализация и отслеживание путей миграции опухолевых клеток в составе криогелей методом ЛСКМ при различных способах посева.

а — миграция из монослоя; б — поверхностная адгезия; в — инъекция в объем. Время культивирования 3 сут, фиксация в *n*-формальдегиде, окрашивание DAPI.

Рис. 5. Концентрационные зависимости влияния доксорубина (С) на жизнеспособность опухолевых клеток, выращенных на поверхности культурального планшета (2D) и в объеме криогеля (3D), по данным MTS-теста (72 ч).

а — MCF-7; б — PC-3. Жизнеспособность выражена в процентах относительно контроля (необработанных клеток), принятого за 100%.

Авторы (Ф.И.О)	Authors
Зухайб Мохамед Хасан	M.H. Zoughaib
Луонг Дзыонг Тхай	D.T. Luong
Сираева Зульфира Юнысовна	Z.Y. Siraeva
Ергешов Абдулла Арсланович	A.A. Yergeshov
Салихова Талия Илшатовна	T.I. Salikhova
Кузнецова Светлана Владимировна	S.V. Kuznetsova
Киямова Рамзия Галлямовна	R.G. Kiyamova
Абдуллин Тимур Илдарович	T.I. Abdullin
Тел: +7 953 498-08-47 Email: tabdulli@gmail.com	

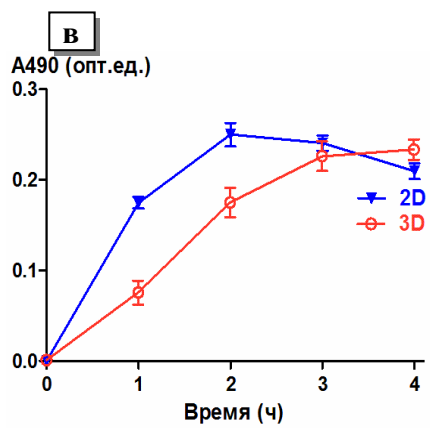
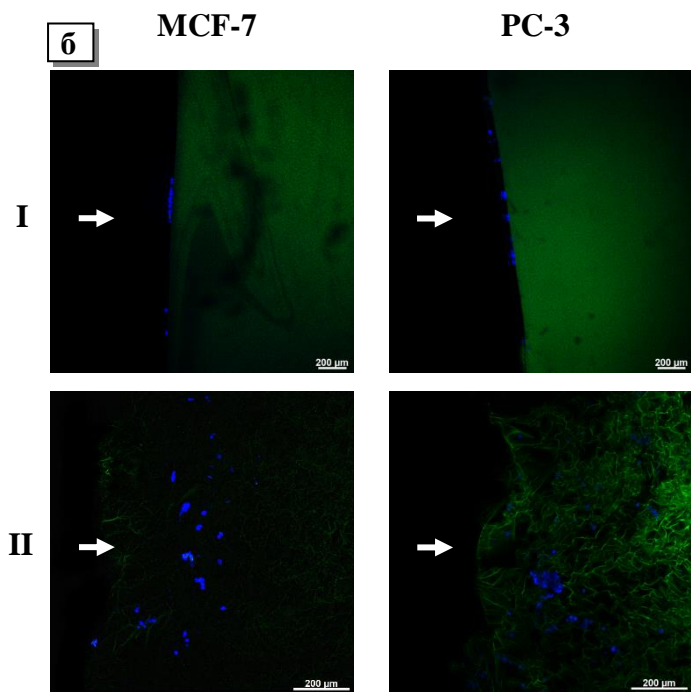
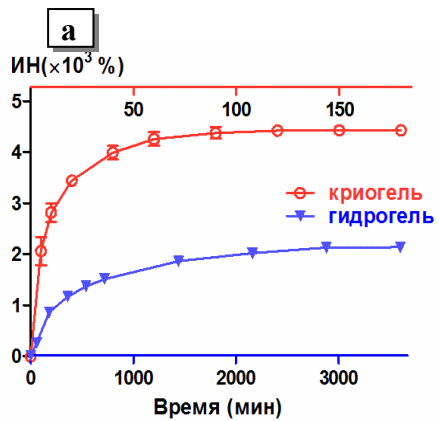


Рис. 1.

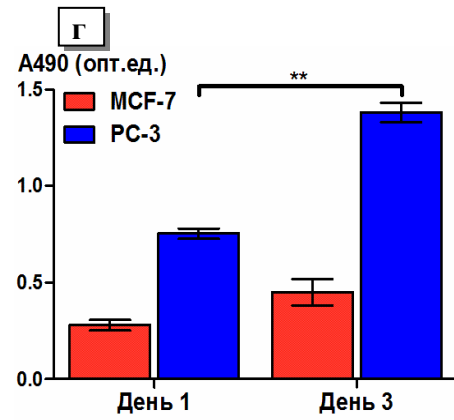
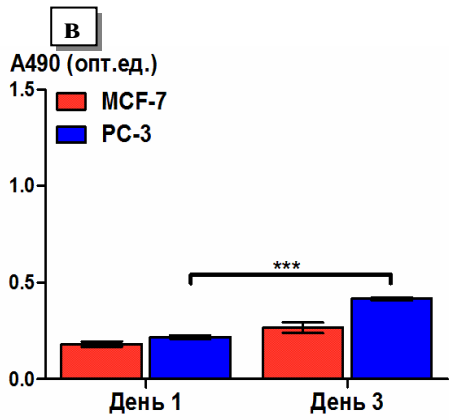
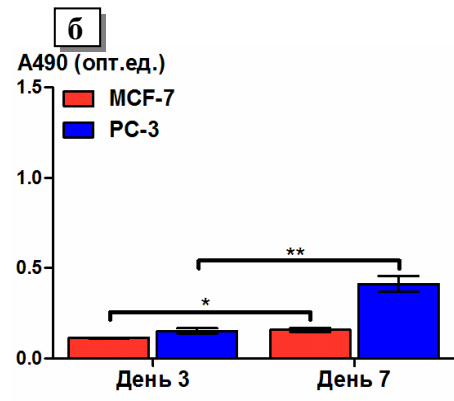
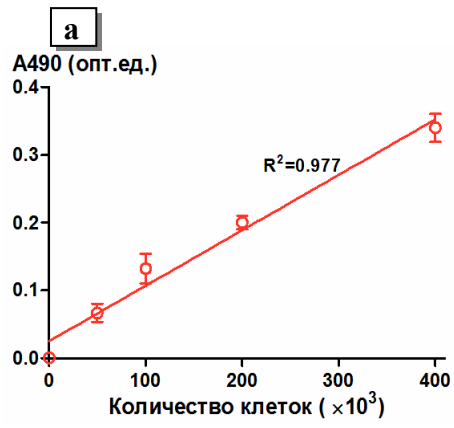


Рис. 2.

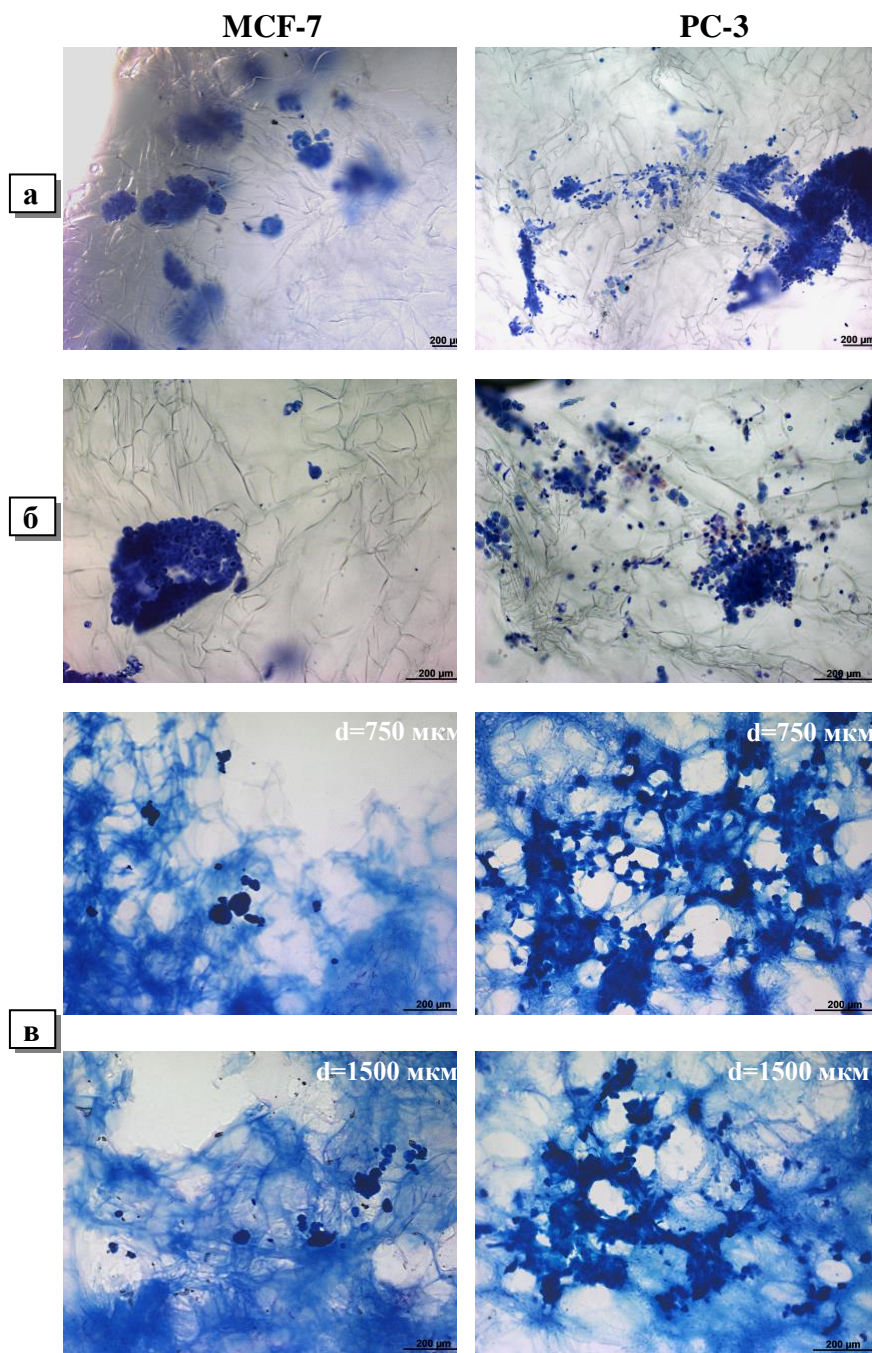


Рис. 3.

МСF-7

РС-3

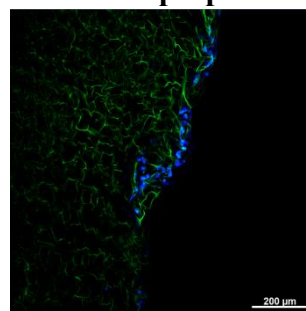
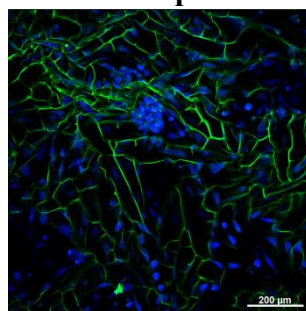
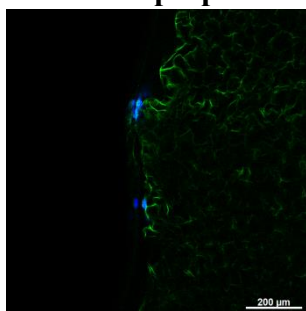
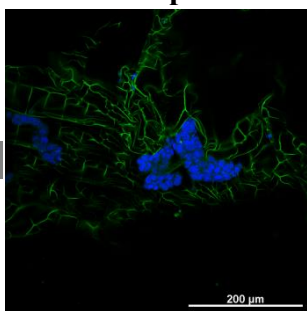
поверхность

в разрезе

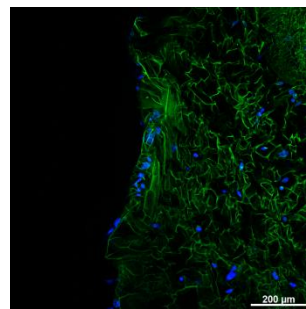
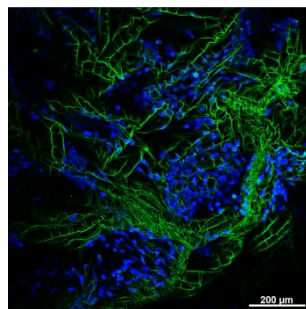
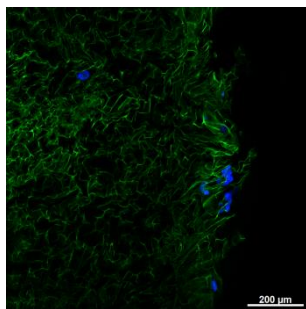
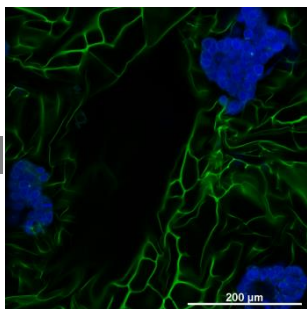
поверхность

в разрезе

а



б



в

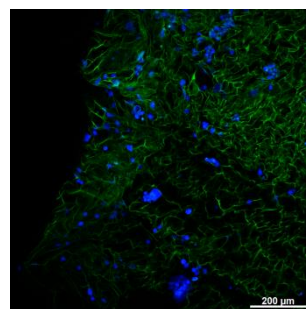
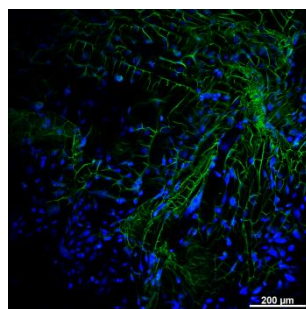
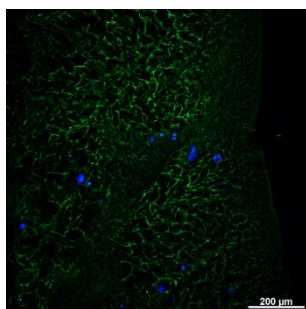
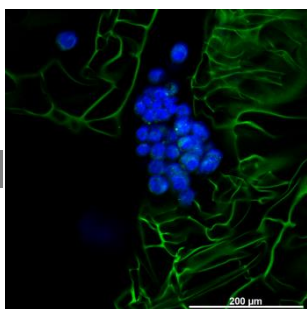


Рис. 4.

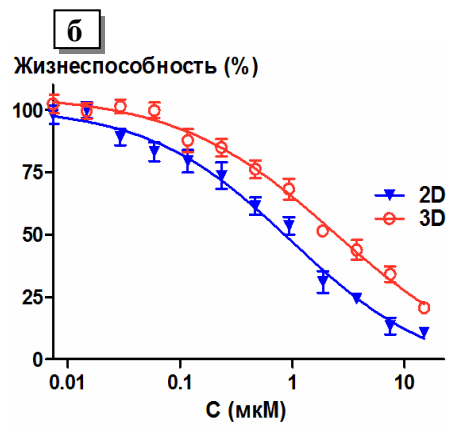
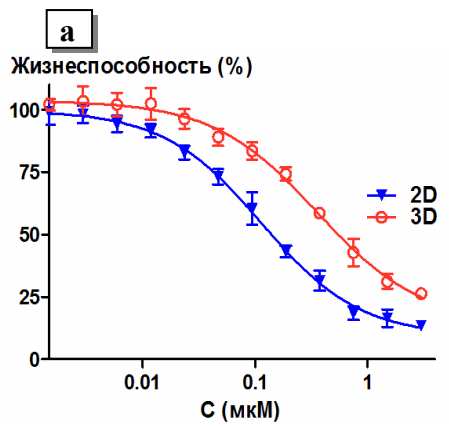


Рис. 5.