

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра генетики

З.Е. ГИЛАЗИЕВА, А.С. ПОНОМАРЕВ, К.В. КИТАЕВА,
А.А. РИЗВАНОВ, В.В. СОЛОВЬЕВА

ПРАКТИКУМ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ
ТРЕХМЕРНЫХ КУЛЬТУР ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК

Учебно-методическое пособие



КАЗАНЬ

2022

УДК 576.5
ББК 28.0
Г47

*Печатается по рекомендации учебно-методической комиссии
Института фундаментальной медицины и биологии КФУ
(протокол № 4 от 16 марта 2022 г.)*

Рецензенты:

кандидат биологических наук **Блатт Н.Л.**
доктор медицинских наук **Бойчук С.В.**

Гилязиева З.Е.

Г47 **Практикум по культивированию трехмерных культур
опухолевых клеток: учебно-методическое пособие / З.Е.
Гилязиева, А.С. Пономарев, К.В. Китаева, А.А. Ризванов,
В.В. Соловьева – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2022. – 35 с.**

В учебно-методическом пособии содержатся протоколы стандартных методов исследования и культивирования трехмерных культур опухолевых клеток и оценки их жизнеспособности. Каждый метод содержит теоретическое описание и краткую характеристику, назначение метода, наиболее важные аспекты его практического использования, целевое назначение необходимых реактивов и оборудования, подробное последовательное описание стадий лабораторных операций. Методическое пособие составлено в соответствии с современной структурой изучения учебных медицинских дисциплин, является дополнением к теоретическим курсам и рекомендовано для изучения следующих дисциплин: Б1.В.02 «Методы исследования в биологии и медицине», Б1.Б.23 «Клеточная и молекулярная биология» и Б1.В.ДВ.2 «Методы клеточной и молекулярной биологии».

УДК 576.5
ББК 28.0

**© Гилязиева З.Е., Пономарев А.С., Китаева К.В,
Ризванов А.А., Соловьева В.В., 2022**

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ТРЕХМЕРНЫХ МОДЕЛИ ОПУХОЛЕЙ	7
1.1 Опухолевые сфероиды.....	7
1.2 Совместные культуры (ко-культуры).....	9
ГЛАВА 2. МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ МОДЕЛЕЙ ОПУХОЛИ.....	12
2.1 Список используемых реагентов	12
2.2 Приготовление питательной среды для культивирования сфероидов.....	13
2.3 Создание сфероидов методом «висячая капля»	14
2.4 Создание сфероидов в суспензионной культуре.....	16
2.4.1 Подготовка планшета для культивирования сфероидов в суспензии.....	16
2.4.2 Посев клеток для получения и культивирования сфероидов в суспензии.....	17
2.5 Создание трехмерной ко-культуры	18
2.5.1 Работа с Матригелем и подготовка планшетов для культивирования клеток	18
2.5.2 Создание ко-культуры	19
2.5.3 Флуоресцентное окрашивание цитоплазматических мембран клеток витальными красителями	22
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ТРЕХМЕРНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЯХ	25
3.1 Список используемых реагентов	25
3.2 Культивирование сфероидов с противоопухолевыми препаратами	26
3.2.1 Культивирование сфероидов в суспензии	26
3.2.2 Культивирование ко-культуры с противоопухолевым препаратом цисплатин	27
3.3 Исследование влияния противоопухолевых препаратов на пролиферативную активность и жизнеспособность клеток в трехмерных клеточных культурах.....	28
3.3.1 Оценка апоптоза клеток.....	28
3.3.3 Анализ пролиферативной активности клеток	30
ЛИТЕРАТУРА	32

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2D	Двухмерная культура
3D	Трехмерная культура
CDDP	Цис-диамминдихлорплатин (цисплатин)
DMEM	Питательная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко
DMEM/F12	Питательная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко/питательная смесь F-12
EGF	Эпидермальный фактор роста
FGF	Фактор роста фибробластов
HIF-1	Индуцируемый гипоксией фактор-1
MEM	Питательная среда Игла
PMS	Феназин метасульфат
BKM	Внеклеточный матрикс
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДФСБ	Натрий-фосфатный буфер Дульбекко
МКПК	Мононуклеарные клетки периферической крови
МСК	Мезенхимные стволовые клетки
ОАФ	Опухоль-ассоциированные фибробласты
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых подходов к скринингу противоопухолевых препаратов является актуальной задачей в свете растущей распространенности онкологических заболеваний, и, как следствие, необходимости увеличения темпов создания, разработки и тестирования новых противоопухолевых агентов. Фармацевтическая промышленность активно использует в основном только двумерные (2D) модели *in vitro*, однако, в области доклинического скрининга возникает все больше запросов на более сложные модели, включающие в себя трехмерные (3D) модели, микрофлюидные системы и модели, созданные с использованием 3D биопечати.

Монослойные клеточные культуры опухолей, которые представляют собой 2D модели все еще остаются одним из важных инструментов исследований в области биологии рака. Однако, культивирование клеток в 2D моделях имеет некоторые ограничения, которые включают в себя отсутствие сложной структуры (разных слоев, присутствующих в опухоли), гетерогенности клеточного состава, метаболических градиентов, взаимодействия с микроокружением, полноценных межклеточных контактов. При культивировании монослойных клеточных культур на пластике, могут изменяться различные клеточные процессы, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, экспрессию генов и синтез белков [1].

Культивирование опухолевых клеток в 3D моделях наделяет их важными свойствами, сближающих их с естественной опухолью. В данных моделях могут содержаться несколько типов клеток, сохраняется опухолевая архитектура, генетическая гетерогенность, взаимодействие опухолевых клеток и стромы. С помощью 3D моделей открывается возможность для исследования межклеточных контактов и микроокружения опухоли [2, 3].

К основным часто используемым 3D моделям можно отнести: (1) многоклеточный сфероид, который получают путем культивирования линий опухолевых клеток на не адгезивной культуральной посуде; (2) онкосфера – модель экспансии опухолевых стволовых клеток в бессывороточной среде с добавлением факторов роста; (3) органотипический многоклеточный сфероид, который получают путем механической и

ферментативной диссоциации опухолевой ткани [4]. Названия сфер могут происходить от типа ткани, из которой они образованы. Например, сферы культуры стволовых клеток головного мозга и молочной железы называют «нейросферы» и «маммосферы» [5].

Известно, что микроокружение играет ключевую роль в прогрессировании опухоли, ее метастазировании и формировании терапевтической резистентности. Опухолевая строма состоит из клеточного компонента, включающего иммунные, эндотелиальные клетки, опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) и миофибробласты, адипоциты и мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), а также из внеклеточного матрикса (ВКМ), обеспечивающего структурную поддержку клеточного компонента во внеклеточном пространстве тканей и органов [6].

Исследования микроокружения опухоли последних лет показали необходимость разработки новых тест-систем, способных учитывать факторы микроокружения и гетерогенность естественной опухоли [7]. К таким тест-системам можно отнести ко-культуры, которые включают в себя несколько типов клеток и ВКМ. Исследование опухоли как сложноорганизованной среды способно внести серьезный вклад в повышение качества лечения онкологических заболеваний и разработку новых методов терапии с персонализированным подходом.

В учебно-методическом пособии содержатся протоколы стандартных методов исследования и культивирования 3D культур опухолевых клеток и оценки их жизнеспособности.

ГЛАВА 1. ТРЕХМЕРНЫХ МОДЕЛИ ОПУХОЛЕЙ

3D модели применяются в исследованиях хеморезистентности, радиорезистентности, онкогенности, инвазии и миграции опухолевых клеток. Несмотря на то, что 3D модели имеют общую трехмерную конформацию, различные методы их получения, позволяют создавать модели, каждая из которых может включать дополнительные свойства. Подбор наиболее подходящей 3D модели опухоли при использовании в исследовании должен быть проведен в зависимости от цели исследования и типа опухоли.

1.1 Опухолевые сфероиды

Опухолевые сфероиды представляют собой самоорганизующиеся культуры опухолевых клеток, с округлой морфологией и преобладающими межклеточными взаимодействиями. В сфероиде, как и в нативных опухолях, существует клеточная зональность (Рис. 1). Выявляют зону пролиферации, которая включает в себя быстро делящиеся клетки. Средний слой представляет собой стареющую зону, клетки которой находятся в покое. Некротическая зона – внутренний слой, содержащий некротические клетки или клетки, находящиеся в апоптозе [8].



Рис. 1. Характеристика опухолевого сфероида и основные направления его применения

Особенностью внутренней части сфероида является подкисленная (рН 6.5–7.2) микросреда [9]. Это происходит за счет того, что в состоянии гипоксии опухолевые клетки активно преобразуют пироват в молочную кислоту (лактат) [10]. Это явление аналогично эффекту Варбурга, связанному с накоплением лактата в солидных опухолях [11]. Кроме того, из-за подкисленной микросреды клетки сфероида, как и нативной опухоли, начинают продуцировать различные факторы, способствующие поддержанию жизнеспособности опухолевых клеток. Например, индуцируемый гипоксией фактор-1 (англ. hypoxia inducible factor-1, HIF-1), усиливает пролиферацию опухолевых клеток и способствует их выживанию [12].

При формировании сфероида происходит агрегация клеток, уплотнение сфероида и его рост. Также происходит накопление компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген IV, ламинин, фибронектин, протеогликаны, тенасцин. Тесное физическое взаимодействие между опухолевыми клетками и внеклеточным матриксом за счет $\alpha 5$ - и $\beta 1$ -интегринов и контакты между опухолевыми клетками за счет E-кадгеринов увеличивают плотность сфероида и создают определенный барьер для проникновения и распределения веществ, поступающих извне, что характерно и для натуральной опухоли [13].

Способы получения сфероидов можно разделить на две группы – создание сфероидов с использованием специальных матриц-носителей (матрикса или скаффолдов) и без их использования.

ВКМ играет роль структурной поддержки клеток в ткани и является важным компонентом клеточного микроокружения, также включает регулирование межклеточного взаимодействия [14]. Матрикса могут быть как естественного происхождения, так и синтетические. Примером синтетического матрикса может служить матрикс на основе полиэтиленгликоля [15].

В качестве аналога естественного матрикса широко используется Матригель. Он представляет собой гетерогенную комплексную смесь белков ВКМ, секретлируемых клеточной линией мышинной саркомы Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) [16].

Методы без использования матрикса, преимущественно, основаны на предотвращении адгезии клеток к поверхности культурального пластика. Достаточно простым и недорогим в исполнении считается метод «висячая капля» [17, 18]. Клетки помещают в каплю культуральной среды и инкубируют в стандартных условиях до

образования сфероидов. Еще один довольно распространенный метод – использование поверхностей, сформированных не адгезивными полимерами, например, агарозой или гиалуроновой кислотой, которые предотвращают адгезию клеток к культуральному пластику, что приводит к слипанию клеток друг с другом и образованию сфероидов [19].

Существуют динамические методы генерирования сфероидов, основанные на использовании вращающихся колб, шейкеров и биореакторов. Поддерживая клетки в условиях постоянного перемешивания, происходит самопроизвольная агрегация клеток [20].

1.2 Совместные культуры (ко-культуры)

Известно, что микроокружение опухоли может заметно изменить восприимчивость опухолевых клеток к лекарственным препаратам. Стратегия использования нескольких разновидностей клеток, а также матриксов, имитирующих межклеточный каркас, способна подробно воспроизвести процессы, происходящие в опухоли, и значительно улучшить прогностическую ценность таких тест-систем по сравнению с обычными 2D моделями опухолей (Рис. 2) [21].

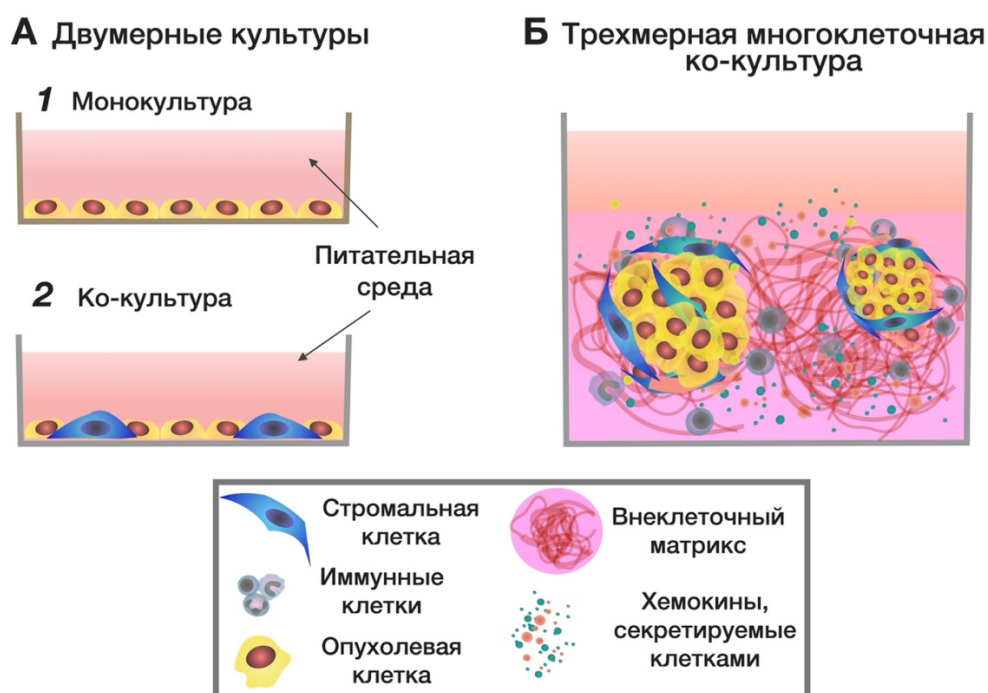


Рис. 2. Разновидности ко-культур. А – 2D-культуры: 1 – монослой опухолевых клеток, 2 – ко-культура из опухолевых и стромальных клеток. Б – 3D-модель опухоли, состоящая из нескольких типов клеток и внеклеточного матрикса

Для решения этой задачи были разработаны новые методы культивирования клеток с использованием ВКМ – для моделирования пространственной организации, а также добавление в культуру различных типов клеток, присутствующих в микроокружении опухоли [22].

Цель этих методов состоит в том, чтобы реконструировать 3D модель многоклеточной опухоли, которая сможет стать переходным звеном между 2D моделями *in vitro* и тестированием на животных *in vivo*. Наличие ВКМ в 3D культурах необходимо для моделирования межклеточных взаимодействий, включая щелевые контакты, которые обеспечивают коммуникацию и обмен веществ, таких как ионы и другие небольшие молекулы. Например, было показано, что воспроизведение фиброзной ткани рака поджелудочной железы при помощи полиакриламидного геля высокой плотности *in vitro*, усиливало хеморезистентность клеток аденокарциномы поджелудочной железы к противоопухолевому препарату паклитаксел [22]. Кроме того, в 3D культурах отмечена повышенная экспрессия молекул клеточной адгезии, таких как N-кадгерин и E-кадгерин, которые помогают в передаче сигналов между клетками [23]. Описано, что использование ламинин-обогащенного ВКМ повышает устойчивость клеток колоректального рака к ингибитору рецептора эпидермального фактора роста (англ. epidermal growth factor, EGF) [24].

При культивировании опухолевых клеток в ко-культуре с фибробластами и эндотелиальными клетками повышается их устойчивость к препаратам 5-фторурацил, регорафениб и эрлотиниб [25]. Karnoub с соавт. (2007) установили, что МСК костного мозга человека при совместном подкожном введении с клетками аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 увеличивали метастатический потенциал опухолевых клеток MCF-7 у мышей с ксенографтной моделью рака молочной железы [26]. Также показано, что МСК жировой ткани при совместном культивировании на Матригеле с клетками MCF-7 индуцировали образование опухолевых сфер *in vitro* и способствовали опухолевому росту *in vivo* у мышей с ксенографтной моделью рака молочной железы. Образование опухолевых сфер клетками MCF-7 и МСК было связано с индукцией стволово-подобных свойств, опосредовавших эпителиально-мезенхимный переход [27]. Не меньший интерес представляет взаимодействие между иммунными и опухолевыми клетками из-за двойственной роли иммунных клеток и секретируемых ими факторов. Несмотря на то, что клетки

иммунной системы нацелены на элиминацию опухолевых клеток, последние литературные данные свидетельствуют о том, что иммунные клетки в микроокружении опухоли тесно взаимодействуют со злокачественными клетками, способствуя канцерогенезу [28, 29].

Таким образом, 3D модели опухоли на основе различных клеточных компонентов могут стать мощным инструментом в исследованиях злокачественных новообразований и скрининге потенциальных противоопухолевых препаратов.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ МОДЕЛЕЙ ОПУХОЛИ

2.1 Список используемых реагентов

Реагент	Кат. №, производитель
Среда DMEM/F12	Кат. № С470п, ПанЭко, Россия
Сыворотка крови плодов коров	Кат. № FB-1001/500, ПанЭко, Россия
Смесь 100 Ед/мл пенициллина/ 100 мкг/мл стрептомицина	Кат. № А063, ПанЭко, Россия
L-глутамин	Кат. № Ф032, ПанЭко, Россия
Рекомбинантный фактор роста фибробластов	Кат. № F3685-25UG, Sigma-Aldrich, США
Рекомбинантный эпидермальный фактор роста	Кат. № SRP3027-500UG, Sigma-Aldrich, США
Добавка B27	Кат. № 17504044, Thermo Fisher Scientific, США
Раствор трипсина-ЭДТА, 0.25 %	Кат. № П036п, ПанЭко, Россия
Фосфатно-солевой буфер (в таблетках)	Кат. № P071-1/B-60201 ПанЭко, Россия
Агароза	Кат. № OB0100, ПанЭко, Россия
Натрий-фосфатный буфер Дульбекко	Кат. № P060п, ПанЭко, Россия
Раствор фикоλλα, плотностью 1.077 г/мл	Кат. № P052п, ПанЭко, Россия
Физиологический раствор	Кат. № P010п, ПанЭко, Россия
Матригель	Кат. № 356237, BD Biosciences, США
Vybrant™ Multicolor Cell-Labeling Kit (набор для витального окрашивания клеточных мембран)	Кат. № V22889, Thermo Fisher Scientific, США

2.2 Приготовление питательной среды для культивирования сфероидов

Для культивирования клеток как в 2D, так и в 3D моделях необходима питательная среда. Питательные среды содержат необходимые вещества для культивирования клеток (аминокислоты, соли, витамины, глюкозу). Подбор культуральной среды зависит от типа культивируемых клеток.

К наиболее часто используемым питательным средам относятся MEM, DMEM, RPMI-1640, DMEM/F12. Однако, данные среды являются неполными и требуют добавок. К основным добавкам, применяемым для всех культур клеток, относят: сыворотка крови плодов коров, глютамин, антибиотики. Для культивирования опухолевых сфероидов также используют факторы роста, добавки различных аминокислот, пептидов, некоторых солей, гормонов, ингибиторов и др.

Для приготовления полной питательной среды с 10 % содержанием сыворотки к 440 мл среды добавьте 5 мл раствора L-глутамина (конечная концентрация в среде – 2 мМ), 5 мл стандартного раствора пенициллина (100 Ед/мл)/стрептомицина (100 мкг/мл) и 50 мл сыворотки крови плодов коров.

Для культивирования сфероидов клеточных линий аденокарциномы толстой кишки (HCT-15) и молочной железы (MCF-7) человека необходимо подготовить 25 мл питательной среды с добавлением факторов роста по следующей методике:

1) Подготовьте в 50 мл пробирке 24.5 мл полной питательной среды DMEM/F12 (с содержанием 10 % сыворотки, смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина, 2 мМ L-глутамина).

2) Добавьте 0.5 мл вещества B27 (конечная концентрация в растворе – 2 %).

3) Добавьте 1 мкл рекомбинантного фактора роста фибробластов (англ. fibroblast growth factor, FGF) и 1 мкл рекомбинантного EGF (конечная концентрация каждого фактора роста в растворе – 20 мкг/мл).

4) Аккуратно перемешайте.

5) Для культивирования сфероидов клеточной линии MCF-7 используйте аналогичную среду только без добавления сыворотки крови плодов коровы.

2.3 Создание сфероидов методом «висячая капля»

Для создания сфероидов методом «висячая капля» клеточную суспензию поместите каплями на крышку чашки Петри. Клетки агрегируют естественным образом на дне капли культуральной среды с образованием сфероида [30]. Для этого:

1) Клеточную культуру НСТ-15 предварительно выращивайте на планшете с площадью поверхности 75 см² (T75).

2) После достижения монослоя клетки НСТ-15 отмойте фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Для этого удалите питательную среду из культуральной посуды. Добавьте 5 мл ФСБ и инкубируйте в течение 3 минут при комнатной температуре. Удалите ФСБ.

3) Открепите клетки от культурального пластика с помощью 0.25 % раствора трипсина-ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Для этого добавьте 3 мл 0.25 % раствора трипсина-ЭДТА и инкубируйте в течение 5 минут при 37 °С. Оцените действие трипсина на клетки с помощью фазово-контрастной микроскопии.

4) Инактивируйте действие трипсина добавлением полной питательной среды. Для этого добавьте в культуральную посуду 3 мл полной питательной среды (объем полной питательной среды должен быть равен объему добавляемого раствора трипсина-ЭДТА). Перенесите клетки в чистую 15 мл центрифужную пробирку.

5) Для получения клеточного осадка 15 мл пробирку с клетками центрифугируйте в течение 5 минут при 300 g.

6) Супернатант удалите и добавьте 1 мл подготовленной питательной среды с факторами роста. Тщательно ресуспендируйте (перемешайте) осадок клеток.

7) Подсчёт клеток проведите с использованием камеры Горяева.

8) Для получения одного сфероида используйте 20 тыс. клеток и 30 мкл культуральной среды. Если необходимо получить большее количество сфероидов (например, 5), то проведите соответствующие расчеты и смешайте необходимое количество клеток, например $5 \times 20\,000$ клеток = 100 000 клеток в 150 мкл среды (5×30 мкл).

9) С помощью дозатора отберите 30 мкл клеточной суспензии и поместите на внутреннюю часть крышки культуральной чашки Петри (Рис. 3). Сформируйте необходимое количество капель (по 30 мкл).

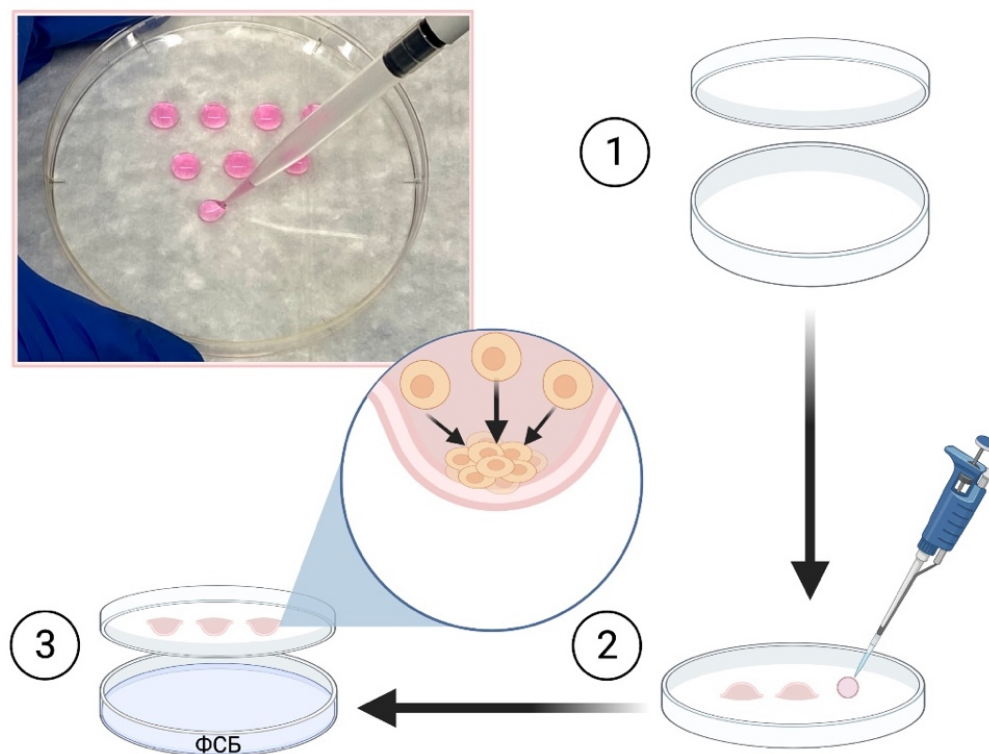


Рис. 3. Пример создания сфероидов методом «висячая капля». Шаг 1. Для культивирования сфероидов методом «висячая капля» используется стерильная чашка Петри. Шаг 2. На внутреннюю часть крышки чашки Петри наносятся капли (30 мкл) культуральной среды с клетками. Шаг 3. Для предотвращения высыхания капель, в чашку Петри добавляют ФСБ, и аккуратно переворачивая крышку, закрывают чашку. Таким образом, клетки будут скапливаться на краю капли и образовывать сфероид

10) В саму культуральную чашку Петри добавьте 15 мл ФСБ для предотвращения высыхания сфероидов. Закройте чашку Петри подготовленной крышкой с каплями.

11) Клетки в каплях инкубируйте 48 часов в стандартных условиях (при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂) до образования сфероидов.

12) Для смены питательной среды из капли, где сформировался сфероид, отберите 10 мкл среды и добавьте новой среды аналогичного объема.

13) Морфологию опухолевых сфероидов, полученных из клеточной линии НСТ-15, оцените с помощью фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе AxyObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxiVision версии 4.8 (Рис. 4Б).

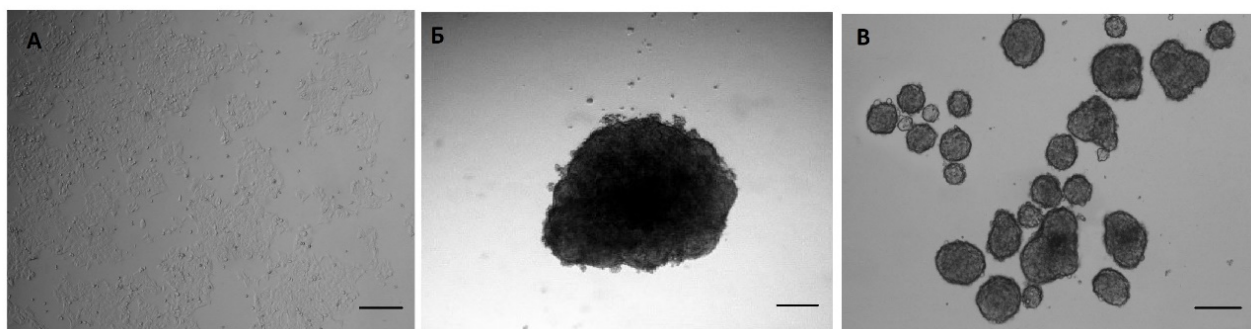


Рис. 4. Фазово-контрастная микроскопия опухолевых сфероидов, полученных различными методами. А – монослойная культура опухолевых клеток. Б – опухолевый сфероид, полученный методом «висячая капля». В – сфероиды в суспензии. Шкала: 100 мкм

2.4 Создание сфероидов в суспензионной культуре

2.4.1 Подготовка планшета для культивирования сфероидов в суспензии

Для создания опухолевых сфероидов из клеток MCF-7 в суспензии подготовьте 24-х луночный культуральный планшет, лунки которого покрыты 1 % агарозой. Агароза – линейный полисахарид, образованный из чередующихся остатков β -D-галактопиранозы и 3,6-ангидридо- α -L-галактопиранозы. Агароза нашла широкое применение в биологических исследованиях. Агароза используется для предотвращения адгезии клеток к пластику, что способствует формированию сфероидов.

1) Для приготовления 1 % агарозы взвесьте 1 грамм агарозы и растворите ее в 100 мл дистиллированной воды в стеклянной банке.

2) Проведите автоклавирование для стерилизации раствора.

3) Дождитесь остывания раствора агарозы до оптимальной температуры (53-56 °C), но не переохлаждайте раствор, так как он имеет свойство полимеризоваться (образовывать гель). Если же раствор полимеризовался, растопите его, используя микроволновую печь.

4) Для нанесения агарозы на лунки культурального планшета используйте дозатор. Отберите по 500 мкл агарозы и нанесите на лунки таким образом, чтобы раствор агарозы покрыл всю поверхность дна лунки, после чего, наклонив планшет, отберите и удалите остатки агарозы. В результате должен получиться тонкий слой агарозы, покрывающий всю площадь дна лунки. Избегайте образования

пузырей. Работайте быстро, для предотвращения застывания агарозы в момент нанесения ее на лунки.

5) Перед использованием планшета промойте его не полной культуральной средой (без сыворотки крови плодов коровы, факторов роста и добавок). Для этого добавьте 500 мкл культуральной среды в лунки планшета, инкубируйте в течение 1 часа при 37 °С. Далее культуральную среду удалите. Для последующего получения и культивирования сфероидов используйте новую полную питательную среду для культивирования клеток.

2.4.2 Посев клеток для получения и культивирования сфероидов в суспензии

1) Клеточную культуру MCF-7 предварительно выращивайте на культуральном планшете с площадью поверхности 75 см² (T75).

2) После достижения монослоя клетки MCF-7 отмойте с использованием ФСБ. Для этого удалите питательную среду из культуральной посуды. Добавьте 5 мл ФСБ и инкубируйте в течение 3 минут при комнатной температуре. Удалите ФСБ.

3) Открепите клетки от культурального пластика с помощью 0.25 % раствора трипсина-ЭДТА. Для этого добавьте 3 мл 0.25 % раствора трипсина-ЭДТА и инкубируйте в течение 5 минут при 37 °С. Оцените действие трипсина на клетки с помощью фазово-контрастной микроскопии.

4) Инактивируйте действие трипсина добавлением полной питательной среды. Для этого добавьте в культуральную посуду 3 мл полной питательной среды (объем полной питательной среды должен быть равен объему добавляемого раствора трипсина-ЭДТА). Перенесите клетки в чистую 15 мл центрифужную пробирку.

5) Для получения клеточного осадка 15 мл пробирку с клетками центрифугируйте в течение 5 минут при 300 g.

6) Супернатант удалите и добавьте 1 мл подготовленной питательной среды. Тщательно ресуспендируйте осадок клеток.

7) Подсчёт клеток проведите с использованием камеры Горяева.

8) Культивируйте клетки в лунках 24-х луночного культурального планшета. На 1 лунку используйте 1 тыс. клеток в 500 мкл среды. Инкубируйте планшет в стандартных условиях (при 37 °С во

влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂) в течение 4-х суток до образования сфероидов.

9) Для смены питательной среды аккуратно соберите сфероиды (пипеткой Пастера) в 1.5 мл пробирку типа Эппендорф и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут.

10) После получения осадка удалите супернатант и добавьте необходимое количество новой полной питательной среды. Аккуратно ресуспендируйте и верните сфероиды в лунки планшета.

11) Морфологию опухолевых сфероидов, полученных из клеточной линии MCF-7, оцените фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxioVision версии 4.8 (Рис. 4В).

2.5 Создание трехмерной ко-культуры

2.5.1 Работа с Матригелем и подготовка планшетов для культивирования клеток

Матригель – один из самых популярных матриксов, получаемый из базальной мембраны саркомы мыши (EHS), которая богата белками внеклеточного матрикса, в том числе ламинином, коллагеном IV, протеогликанами, гепарин сульфатами, факторами роста. Это основной тип матрикса, применяемый в работах по изучению онкогенеза и ангиогенеза, а также безфидерного наращивания клеточного материала. Матригель замерзает при отрицательных температурах (хранится реагент при -20 °С) и необратимо полимеризуется при положительных значениях температуры. Таким образом, работа с Матригелем должна проводиться при около нулевых значениях, то есть, на льду. При этом, необходимо использовать заранее охлажденные наконечники для дозаторов и планшеты во избежание преждевременной полимеризации реагента. Оптимальным способом подготовки Матригеля для работы является его разморозка в термобоксе (пенопластовой коробке) со льдом в холодильнике (при 2–4 °С) течение ночи – таким образом, реагент плавно достигнет около нулевых значений температуры и будет готов к работе.

1) Матригель разморозьте на льду в течение ночи при 4 °С. После разморозки реагент оставьте на льду, не встряхивайте, чтобы избежать появления пузырьков воздуха. Для перемешивания

Матригеля используйте автоматический дозатор с охлажденными наконечниками.

2) Работайте на льду. 200 мкл Матригеля внесите в каждую лунку 12-ти луночного культурального планшета и по 50 мкл Матригеля в каждую лунку 96-ти луночного культурального планшета.

3) Для полимеризации Матригеля планшеты инкубируйте в течение 30 минут при 37 °С, с последующим внесением клеток в лунки.

2.5.2 Создание ко-культуры

Для создания ко-культуры можно использовать различные виды опухолевых клеток и клеток микроокружения опухоли в зависимости от цели исследования. Для примера в данной работе в качестве основных клеточных компонентов используются опухолевые клетки нейробластомы человека линии SH-SY5Y, МСК, выделенные из костного мозга человека, а также моноклеарные клетки, выделенные из периферической крови (МКПК) человека.

2.5.2.1 Выделение мезенхимных стволовых клеток из костного мозга человека

1) Для выделения МСК используйте аспираты костного мозга человека (5–10 мл). Разведите аспират костного мозга вдвое физиологическим раствором.

2) Все манипуляции по непосредственной работе с аспиратами костного мозга с целью нивелирования риска контаминации проводите в асептических условиях в ламинарном боксе.

3) В 50 мл центрифужную пробирку внесите раствор фикола плотностью 1.077 г/мл в объеме, равном разведенной клеточной суспензии.

4) Аккуратно, при помощи автоматического дозатора, наслаивайте равный объём разведенного аспирата костного мозга.

5) После 20 минут центрифугирования (без торможения) при 1900 об/мин получите чёткое разделение суспензии костного мозга на 3 фракции: эритроциты, лейкоциты (моноклеарные клетки) и плазму.

6) Моноклеарные клетки отберите в отдельную 50 мл центрифужную пробирку, добавьте 45 мл физиологического раствора,

полученную смесь ресуспендируйте пипетированием и центрифугируйте при 1400 об/мин в течение 15 минут. Супернатант удалите.

7) Полученный клеточный осадок ресуспендируйте в 25 мл физиологического раствора и повторно центрифугируйте при 1400 об/мин в течение 15 минут. Супернатант удалите.

8) Осадок клеток ресуспендируйте в 10 мл полной среды DMEM/F12, содержащей сыворотку крови плодов коровы, L-глутамин и смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина.

9) Полученную смесь перенесите в стерильную 10 см адгезивную культуральную чашку Петри и культивируйте в инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂.

10) Морфологию выделенных клеток оцените с помощью фазово-контрастной микроскопии. Выделенные МСК должны иметь фибробласто-подобную морфологию: плоские, крупные и распластанные клетки.

2.5.2.2 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови человека

1) Мононуклеарные клетки из периферической крови человека получите методом седиментация в градиенте плотности фикола.

2) Все манипуляции по непосредственной работе с кровью с целью нивелирования риска контаминации проводите в асептических условиях в ламинарном боксе.

3) Выделение ядросодержащих клеток проводите в 50 мл центрифужных пробирках. В каждую пробирку внесите по 25 мл раствора фикола плотностью 1.077 г/мл и аккуратно, при помощи автоматического дозатора, наслаивайте равный объём крови с антикоагулянтом (соотношение крови и антикоагулянта в диапазоне 1:1–1:3).

4) После 20 минут центрифугирования (без торможения) при 1900 об/мин получите чёткое разделение крови на 3 фракции: эритроциты, лейкоциты (мононуклеарные клетки) и плазму.

5) Мононуклеарные клетки отберите в отдельную 50 мл центрифужную пробирку, добавьте 45 мл натрий-фосфатного буфера Дульбекко (ДФСБ), полученную смесь ресуспендируйте пипетированием и центрифугируйте при 1400 об/мин в течение 15 минут. Супернатант удалите.

6) Полученный клеточный осадок ресуспендируйте в 25 мл раствора ДФСБ и повторно центрифугируйте при 1400 об/мин в течение 15 минут. Супернатант удалите.

7) Осадок клеток ресуспендируйте в 10 мл полной среды DMEM/F12, содержащей сыворотку крови плодов коровы, L-глутамин и смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина.

8) Полученную смесь перенесите в стерильную 10 см неадгезивную культуральную чашку Петри и культивируйте в инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂.

9) Морфологию выделенных клеток оцените с помощью фазово-контрастной микроскопии. Выделенные мононуклеары должны быть небольшими по размеру и округлыми клетками.

2.5.2.3 Внесение клеток в ко-культуру

Для исследования самоорганизации МСК, клеток нейробластомы SH-SY5Y и МКПК (тройной ко-культуры) на аналоге ВКМ Матригеле понадобятся 12-ти луночные культуральные планшеты.

1) Для создания тройной ко-культуры подготовьте планшет, как описано в пункте 2.5.1. Для каждого эксперимента используйте минимум три повторности, то есть, необходимо подготовить три лунки в 12-ти луночном планшете.

2) Клетки нейробластомы SH-SY5Y и МСК предварительно выращивайте на культуральных планшетах T75, после достижения монослоя клетки отмойте ФСБ и открепите с помощью 0.25 % раствора трипсина-ЭДТА (инкубируйте в течение 5 минут при 37 °С). Действие трипсина инактивируйте полной культуральной средой. Для создания тройной ко-культуры дополнительно используйте свежесыведенные МКПК.

3) Отберите по 60 тыс. клеток каждого вида в отдельные центрифужные пробирки (для подсчета клеток используйте камеру Горяева). Для удобства работы клеточную суспензию каждого вида клеток ресуспендируйте в 1.2 мл полной среды DMEM/F12.

4) В подготовленный 12-ти луночный культуральный планшет с Матригелем в соотношении 1:1:1 внесите по 20 тыс. клеток каждого вида (т.е., отберите треть от объема подготовленной в предыдущем пункте клеточной суспензии – 400 мкл) в каждую из трех лунок. Таким образом, в каждой из трех подготовленных лунок получится смесь клеток МСК (20 тыс. клеток/400 мкл), клеток нейробластомы (20 тыс. клеток/400 мкл), МКПК (20 тыс.

клеток/400 мкл), итого – ко-культура из 60 тыс. клеток трех видов в 1.2 мл среды в каждой лунке.

5) Клетки культивируйте при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂.

6) Пустые лунки в планшетах заполните физиологическим раствором либо ДФСБ для сохранения постоянства микроклимата и влажности в планшете.

7) Фазово-контрастную микроскопию проводите на различных временных промежутках культивирования, например, 24 часа, 48 часов и 72 часа на инвертированном микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxioVision версии 4.8.

2.5.3 Флуоресцентное окрашивание цитоплазматических мембран клеток витальными красителями

Флуоресцентное окрашивание цитоплазматических мембран МСК, МКПК и опухолевых клеток используется для исследования самоорганизации клеток в ко-культуре, их взаимодействия, которое можно оценить при помощи флуоресцентной микроскопии, а также для цитофлуориметрического анализа отдельных клеточных популяций. Витальные красители Vybrant™ Multicolor Cell-Labeling Kit позволяют проводить прижизненное окрашивание липофильных мембран клеток. Краситель начинает флуоресцировать после включения в липофильную мембрану, что дает возможность идентифицировать межклеточные взаимодействия.

Клеточную культуру нейробластомы SH-SY5Y и МСК предварительно выращивайте на культуральных планшетах Т75, после достижения монослоя клетки отмойте ФСБ и открепите с помощью 0.25 % раствора трипсина-ЭДТА (инкубируйте в течение 5 минут при 37 °С). Действие трипсина инактивируйте полной культуральной средой. Для создания тройной ко-культуры дополнительно используйте свежевыделенные МКПК.

1) Клетки соберите в 15 мл центрифужную пробирку и центрифугируйте в течение 5 минут при 300 g.

2) Супернатант удалите и добавьте 1 мл полной среды DMEM/F12 без содержания сыворотки крови плодов коровы.

3) Тщательно ресуспендируйте клеточный осадок. Проведите подсчёт клеток с использованием камеры Горяева. Отберите

500 тыс. клеток и ресуспендируйте в 500 мкл культуральной среды без сыворотки плодов коровы.

4) Для витального окрашивания клеток используйте набор Vybrant™ Multicolor Cell-Labeling Kit, который содержит следующие флуоресцентные красители: DiO (зеленый спектр), DiD (красный спектр) и DiI (желтый спектр).

5) Добавьте 2.5 мкл красителя к 500 мкл культуральной среды без сыворотки плодов коровы с 500 тыс. клеток. Например, DiO к клеткам нейробластомы SH-SY5Y, DiD к МСК и DiI к МКПК.

6) Клетки инкубируйте с красителем в течение 15 минут при 37 °С.

7) Далее клеточную суспензию центрифугируйте при 1500 об/мин в течение 5 минут при 37 °С.

8) Удалите супернатант, к осадку добавьте питательную среду DMEM/F12 без сыворотки плодов коровы.

9) Повторите промывку от красителя еще два раза.

10) После последней промывки клеточный осадок ресуспендируйте в необходимом количестве полной среды DMEM/F12.

11) В подготовленный 12-луночный культуральный планшет с Матригелем в соотношении 1:1:1 внесите по 20 тыс. клеток каждого вида и инкубируйте при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % содержанием CO₂.

12) Проведите качественную оценку окрашивания с помощью флуоресцентной микроскопии на инвертированном микроскопе AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxioVision версии 4.8 на различных временных промежутках (Рис. 5).

48 часов

96 часов

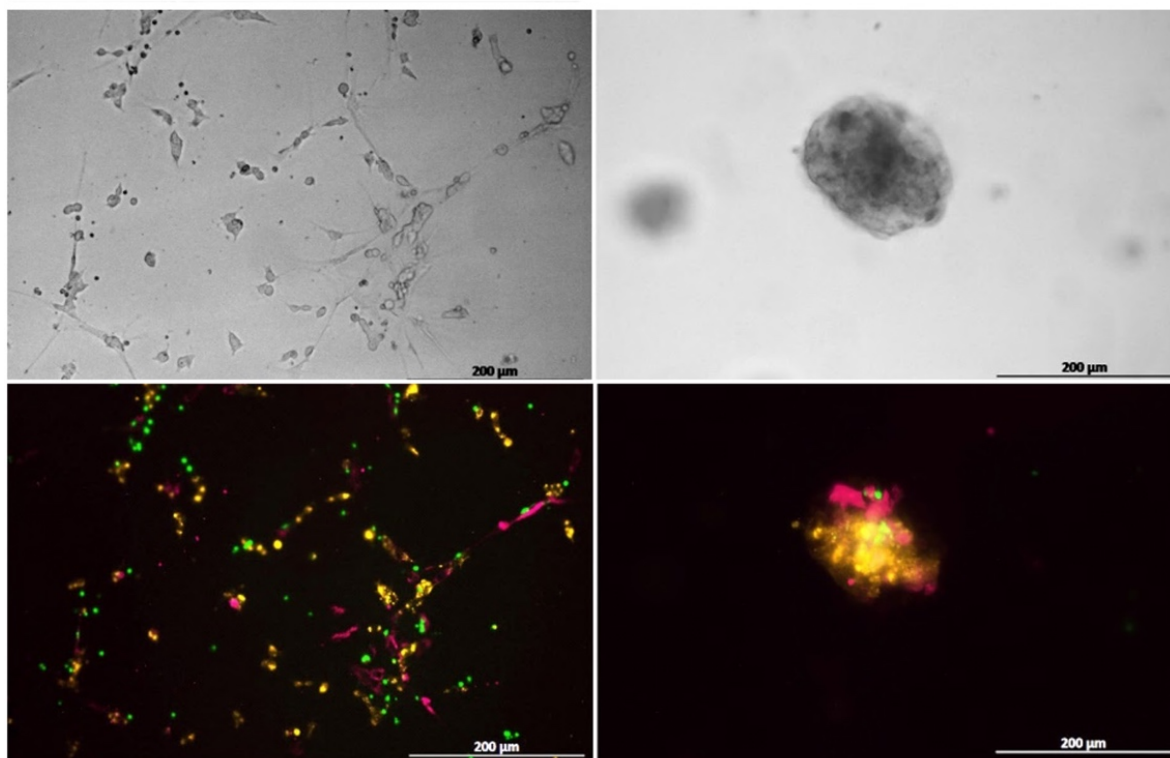


Рис. 5. Анализ самоорганизации МСК, МКПК и клеток SH-SY5Y в ко-культуре на Матригеле после 48 и 96 часов культивирования при помощи световой и флуоресцентной микроскопии. Клетки формируют сначала капилляроподобные структуры (после 48 часов культивирования), а затем формируют сфероидоподобные образования после 96 часов культивирования. Шкала: 200 мкм

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ТРЕХМЕРНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЯХ

В настоящее время 3D модели активно применяют для прогностической оценки противоопухолевых методов лечения, таких как химиотерапия, радиотерапия, фотодинамическая терапия, генная терапия и иммунотерапия. Схожая структура 3D моделей с нативной опухолью позволяет использовать их для исследований цитотоксичности противоопухолевых препаратов, патофизиологических градиентов и процессов их диффузии *in vitro*.

3.1 Список используемых реагентов

Реагент	Кат. №, производитель
Паклитаксел	Лэнс-Фарм, Россия
Цисплатин	Лэнс-Фарм, Россия
Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (набор для детекции апоптоза и некроза клеток)	Кат. № 640932, Bio-Legend, США
Раствор трипсина-ЭДТА, 0.25 %	Кат. № П036п, ПанЭко, Россия
Фосфатно-солевой буфер (в таблетках)	Кат. № P071-1/B-60201 ПанЭко, Россия
Среда DMEM/F12	Кат. № С470п, ПанЭко, Россия
Сыворотка крови плодов коров	Кат. № FB-1001/500, ПанЭко, Россия
Смесь 100 Ед/мл пенициллина/100 мкг/мл стрептомицина	Кат. № А063, ПанЭко, Россия
L-глутамин	Кат. № Ф032, ПанЭко, Россия
Рекомбинантный фактор роста фибробластов	Кат. № F3685-25UG, Sigma-Aldrich, США
Рекомбинантный эпидермальный фактор роста	Кат. № SRP3027-500UG, Sigma-Aldrich, США
Добавка B27	Кат. № 17504044, Thermo Fisher Scientific, США

Реагент	Кат. №, производитель
CellTiter 96 [®] AQueous Non-Radiative Cell Proliferation Assay (набор для анализа пролиферации клеток)	Кат. № G1111, Promega, США
Матригель	Кат. № 356237, BD Biosciences, США
Феназин метасульфат 99.0 %, чда	Кат. № S299116.0005, ДиаМ, Россия

3.2 Культивирование сфероидов с противоопухолевыми препаратами

3.2.1 Культивирование сфероидов в суспензии

Паклитаксел – противоопухолевое средство природного происхождения. Является ингибитором митоза. Паклитаксел связывается с тубулином микротрубочек, нарушая процесс деполимеризации белка, и блокирует процесс митоза [31]. Для того чтобы провести оценку действия препарата паклитаксел на опухолевые сфероиды в суспензии:

- 1) Культивируйте сфероиды в суспензии в полной питательной среде DMEM/F12, как описано в пункте 2.4.
- 2) Сформируйте 2 группы сфероидов: 1 – контрольная группа без добавления препарата, 2 – экспериментальная группа с добавлением препарата паклитаксел в концентрации 100 мкмоль/мл. Для каждой группы сформируйте сфероиды в трех лунках 24-х луночного культурального планшета.
- 3) Добавьте терапевтический препарат (паклитаксел) в экспериментальную группу через 120 часов (пятые сутки) культивирования сфероидов.
- 4) Инкубируйте сфероиды с противоопухолевым препаратом паклитаксел в течение 48 часов.
- 5) Оцените влияние препарата на сфероиды с помощью фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе AxyObserver.Z1 с использованием программного обеспечения Axi-oVision версии 4.8 (Carl Zeiss, Германия) (Рис. 6).

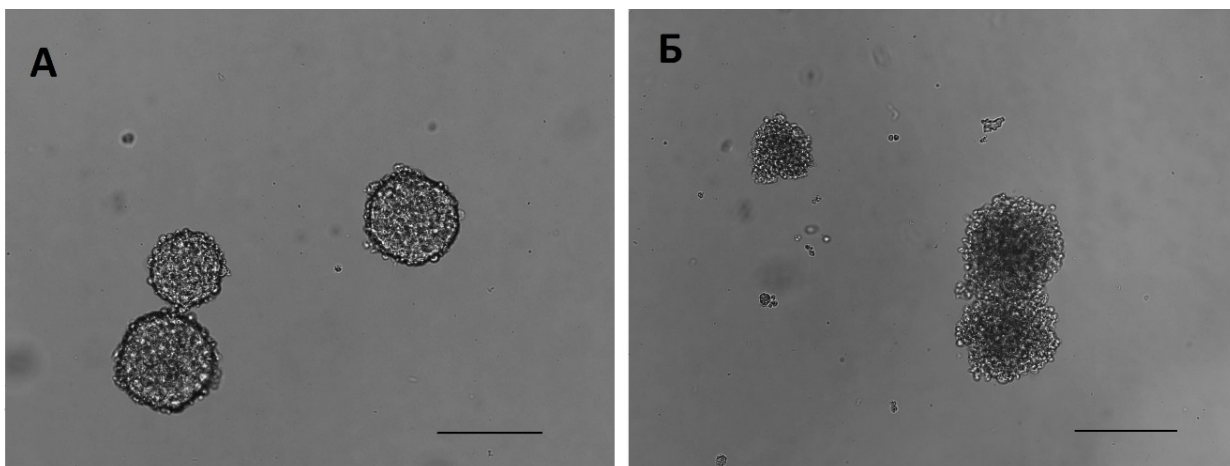


Рис. 6. Пример использования сфероидов, для оценки влияния противоопухолевого препарата. А – контрольная группа сфероидов (без добавления препарата паклитаксел). Б – опытная группа сфероидов (с добавлением препарата паклитаксел в концентрации 100 мкмоль/мл). Шкала: 100 мкм

3.2.2 Культивирование ко-культуры с противоопухолевым препаратом цисплатин

Цисплатин – один из первых химиотерапевтических препаратов на основе металлов, также известный как цис-диамминдихлорплатин (англ. cis-diamminedichloroplatinum, CDDP) [32]. Одним из наиболее изученных механизмов воздействия CDDP на опухолевые клетки заключается в его связывании с геномной ДНК или митохондриальной ДНК, что приводит к некрозу или апоптозу клетки [33, 34].

Для того чтобы провести оценку действия CDDP на сложную многоклеточную модель опухоли:

1) Подготовьте 96-ти луночный культуральный планшет с Матригелем, согласно пункту 2.4.1. Сформируйте 2 группы ко-культур, включающие: 1 – контрольную группу без добавления CDDP, 2 – экспериментальную группу с добавлением CDDP в концентрации 10 мкг/мл. Для каждой группы сформируйте ко-культуры в трех лунках 96-ти луночного культурального планшета.

2) В подготовленный 96-ти луночный культуральный планшет с Матригелем в соотношении 1:1:1 внесите по 1.5 тыс. клеток каждого вида (аналогично пункту 2.4.2) в каждую из трех лунок. Итоговый объем клеточной суспензии в каждой лунке должен составить 100 мкл. Для этого отберите по 10.5 тыс. клеток каждого вида в отдельные центрифужные пробирки (1.5 тыс. клеток × 6

повторностей + 1.5 тыс. клеток для запаса) и ресуспендируйте в 210 мкл (30 мкл × 6 повторностей + 30 мкл для запаса) полной среды DMEM/F12. Далее добавьте по 30 мкл клеточной суспензии каждого вида в каждую лунку и затем доведите объем клеточной суспензии в каждой лунке до 100 мкл (добавив 10 мкл полной среды DMEM/F12). Таким образом, в каждой лунке после смешивания трех видов клеток получится 4.5 тыс. клеток в 100 мкл полной среды DMEM/F12. В пустые лунки добавьте ФСБ.

3) Клетки культивируйте в течение 48 часов при 37 °С во влажной среде с 5 % содержанием CO₂.

4) Добавьте CDDP в концентрации 10 мкг/мл в лунки с ко-культурами экспериментальной группы через 48 часов (третьи сутки) ко-культивирования.

5) Инкубируйте ко-культуру с CDDP в течение еще 48 часов.

3.3 Исследование влияния противоопухолевых препаратов на пролиферативную активность и жизнеспособность клеток в трехмерных клеточных культурах

3.3.1 Оценка апоптоза клеток

Конъюгированные с флуоресцентной меткой антитела к аннексину V и флуоресцентный краситель пропидий йодид обычно используются для идентификации клеток, находящихся в состоянии апоптоза. Апоптоз – процесс саморазрушения клеток по генетически детерминированной программе в ответ на определённые внешние или внутренние стимулы. Аннексин V представляет собой фосфолипидсвязывающий белок, который имеет высокое сродство к фосфолипидному фосфатидилсерину. Во время апоптоза проницаемость клеточной мембраны увеличивается и фосфатидилсерин проникает на наружный слой плазматической мембраны. Транслоцированный фосфатидилсерин на внешней поверхности связывается с аннексином V, маркируя клетку [35]. Пропидий йодид окрашивает ядро и хромосомы и проникает только в клетки с повреждённой мембраной.

Проведите оценку апоптоза клеток после добавления противоопухолевого препарата с помощью набора Alexa Fluor[®] 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit:

1) Инкубируйте сфероиды с противоопухолевым препаратом в течение 48 часов, как описано в пункте 3.2.1.

2) Опухолевые сфероиды соберите пипеткой Пастера в пробирки типа Эппендорф и центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут.

3) После получения осадка удалите супернатант и добавьте 500 мкл ФСБ. Далее центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут.

4) Отберите супернатант и добавьте 100 мкл 0.25 % раствора трипсина-ЭДТА. Инкубируйте в течение 5 минут при 37 °С.

5) Действие трипсина инактивируйте добавлением 100 мкл полной питательной среды. Тщательно ресуспендируйте. Далее центрифугируйте при 200 g в течение 5 минут.

6) Приготовьте растворы с антителами к аннексину V (на 1 образец используйте 100 мкл буфера и 1 мкл антитела) и пропидий йодидом (на 1 образец используйте 100 мкл буфера и 2 мкл красителя).

7) После центрифугирования удалите супернатант и добавьте 100 мкл готового раствора с антителами к аннексину V.

8) Инкубируйте клетки при комнатной температуре в течение 15 минут в темноте. Добавьте 500 мкл ФСБ. Далее центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут.

9) Удалите супернатант и добавьте 100 мкл раствора с пропидий йодидом. Ресуспендируйте клетки в добавленном растворе. Поместите суспензию клеток на лёд и проведите измерение флуоресценции клеток на проточном цитометре FACS Aria III (BD Biosciences, США) (Рис. 7).

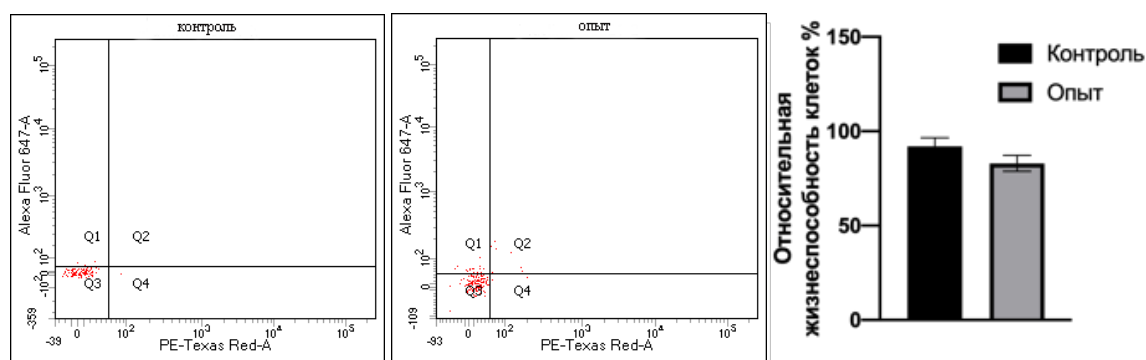


Рис. 7. Анализ жизнеспособности клеток после 48 часов культивирования опухолевых сфероидов с препаратом паклитаксел. Данные получены с помощью проточной цитофлуориметрии. Контроль – сфероиды без добавления препарата: количество жизнеспособных клеток составило 92.5 % (область Q3). Опыт – сфероиды с добавлением препарата паклитаксел: количество жизнеспособных клеток составило 84 % (область Q3)

3.3.3 Анализ пролиферативной активности клеток

Оценку пролиферативной активности клеток проведите с использованием набора CellTiter 96[®] AQueous Non-Radiative Cell Proliferation Assay. Данный метод измерения пролиферативной активности клеток основан на способности митохондриальных дегидрогеназ в присутствии переносчика электронов феназин метасульфата (англ. phenasin methosulphate PMS) конвертировать тетразолиеое соединение MTS (внутренняя соль; 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий) в растворимую форму формаза, оптическую плотность которого можно измерить при длине волны 490 нм.

Для приготовления рабочего раствора MTS в концентрации 2 мг/мл в 50 мл центрифужной пробирке смешайте 42 мг реагента MTS и 21 мл раствора ДФСБ. Перемешивайте полученную смесь в течение 15 минут, доведите рН раствора до 6–6.5, после чего профильтруйте через фильтр с размером пор 0.22 мкм. Полученный раствор разделите на аликвоты по 1 мл и храните при температуре -20 °С.

Для приготовления рабочего раствора PMS в концентрации 3 мМ/л в 50 мл центрифужной пробирке смешайте 18.5 мг PMS и 20 мл дистиллированной воды. Перемешивайте полученную смесь в течение 15 минут, после чего профильтруйте через фильтр с размером пор 0.22 мкм. Полученный раствор разделите на аликвоты по 1 мл и храните при температуре -20 °С.

Инкубируйте ко-культуру с противоопухолевым препаратом CDDP в концентрации 10 мкг/мл (см. пункт 3.2.2).

Для анализа пролиферативной активности клеток ко-культуры:

- 1) В 5 мл пробирке смешайте необходимое количество реагентов MTS и PMS в соотношении 20:1.
- 2) Добавьте по 20 мкл смеси в каждую лунку 96-ти луночного культурального планшета, содержащего ко-культуры.
- 3) Планшет инкубируйте в течение 1 часа в инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂.
- 4) Оптическую плотность в лунках определите с использованием микропланшетного ридера Infinite M200Pro (Tecan Trading AG, Швейцария) в двухволновом режиме: основной фильтр – 490 нм, референс-фильтр – 700 нм. (Рис. 8).

5) После измерения оптической плотности, вы получите таблицу со значениями, соответствующую лункам планшета. Для анализа результатов посчитайте среднее значение для каждой экспериментальной группы, а также стандартное отклонение. После подсчета данных значений проведите статистическую обработку полученных результатов на предмет достоверности различий, например, с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software), одностороннего ANOVA с последующим сравнительным анализом Tukey HSD.

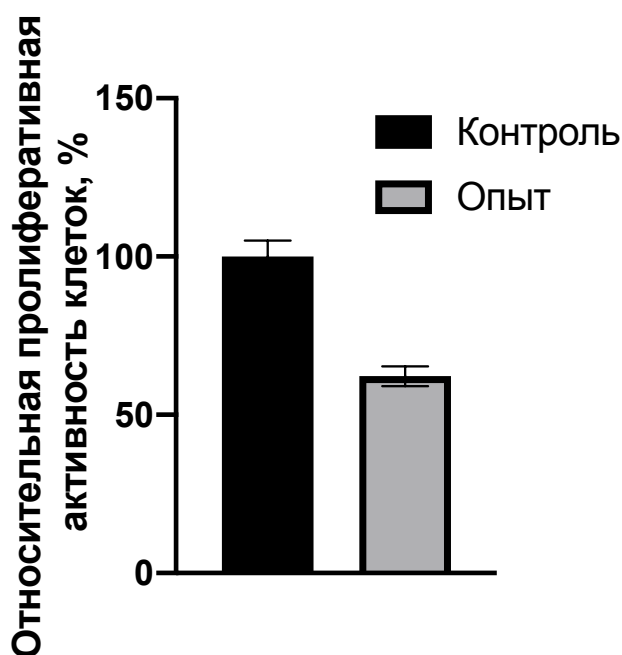


Рис. 8. Анализ пролиферативной активности МСК, клеток SH-SY5Y и МКПК после 48 часов инкубации с CDDP в концентрации 10 мкг/мл. Контроль – необработанные CDDP клетки. Опыт – клетки после инкубации с CDDP. Пролиферативная активность контрольных клеток принята за 100 %

ЛИТЕРАТУРА

1. **Gilazieva, Z.** Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine / Z. Gilazieva, A. Ponomarev, C. Rutland, A. Rizvanov, V. Solovyeva // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12 (10). – P. 2727.
2. **Ham, S.L.** Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery / S.L. Ham, R. Joshi, P.S. Thakuri, H. Tavana // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. – 2016. – Vol. 241 (9). – P. 939-954.
3. **Hynds, R.E.** Concise review: the relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine / R.E. Hynds, A. Giangreco // *Stem Cells*. – 2013. – Vol. 31 (3). – P. 417-422.
4. **Weiswald, L.B.** Spherical cancer models in tumor biology / L.B. Weiswald, D. Bellet, V. Dangles-Marie // *Neoplasia*. – 2015. – Vol. 17 (1). – P. 1-15.
5. **Singh, S.K.** Identification of a cancer stem cell in human brain tumors / S.K. Singh, I.D. Clarke, M. Terasaki, V.E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, P.B. Dirks // *Cancer Res*. – 2003. – Vol. 63 (18). – P. 5821-5828.
6. **Chulpanova, D.S.** Application of mesenchymal stem cells for therapeutic agent delivery in anti-tumor treatment / D.S. Chulpanova, K.V. Kitaeva, L.G. Tazetdinova, V. James, A.A. Rizvanov, V.V. Solovyeva // *Front. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 259.
7. **Timaner, M.** Analysis of the stromal cellular components of the solid tumor microenvironment using flow cytometry / M. Timaner, O. Beyar-Katz, Y. Shaked // *Curr. Protoc. Cell Biol.* – 2016. – Vol. 70. – P. 19.18.1-19.18.12.
8. **Mehta, G.** Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy / G. Mehta, A.Y. Hsiao, M. Ingram, G.D. Luker, S. Takayama // *J. Control. Release*. – 2012. – Vol. 164 (2). – P. 192-204.
9. **Ponomarev, A.** Intrinsic and extrinsic factors impacting cancer stemness and tumor progression / A. Ponomarev, Z. Gilazieva, V. Solovyeva, C. Allegrucci, A. Rizvanov // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14 (4). – P. 970.
10. **Alfarouk, K.O.** Glycolysis, tumor metabolism, cancer growth and dissemination. A new pH-based etiopathogenic perspective and therapeutic approach to an old cancer question / K.O. Alfarouk, D. Verduzco, C. Rauch, A.K. Muddathir, H.H. Adil, G.O. Elhassan, M.E.

Ibrahim, J. David Polo Orozco, R.A. Cardone, S.J. Reshkin, S. Harguindey // *Oncoscience*. – 2014. – Vol. 1 (12). – P. 777-802.

11. **Kim, J.W.** Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect / J.W. Kim, C.V. Dang // *Cancer Res*. – 2006. – Vol. 66 (18). – P. 8927-8930.

12. **Martin, A.R.** Hypoxia inducible factor down-regulation, cancer and cancer stem cells (CSCs): ongoing success stories / A.R. Martin, C. Ronco, L. Demange, R. Benhida // *Medchemcomm*. – 2017. – Vol. 8 (1). – P. 21-52.

13. **Tzanakakis, E.S.** The role of actin filaments and microtubules in hepatocyte spheroid self-assembly / E.S. Tzanakakis, L.K. Hansen, W.S. Hu // *Cell Motil. Cytoskeleton*. – 2001. – Vol. 48 (3). – P. 175-189.

14. **Jarvelainen, H.** Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy / H. Jarvelainen, R. Penttinen, A. Sainio, M. Koulu, T.N. Wight, R. Penttinen // *Pharmacol. Rev*. – 2009. – Vol. 61 (2). – P. 198-223.

15. **Cruz-Acuna, R.** Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair / R. Cruz-Acuna, M. Quiros, A.E. Farkas, P.H. Dedhia, S. Huang, D. Siuda, V. Garcia-Hernandez, A.J. Miller, J.R. Spence, A. Nusrat, A.J. Garcia // *Nat. Cell Biol*. – 2017. – Vol. 19 (11). – P. 1326-1335.

16. **Hughes, C.S.** Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture / C.S. Hughes, L.M. Postovit, G.A. Lajoie // *Proteomics*. – 2010. – Vol. 10 (9). – P. 1886-1890.

17. **Froehlich, K.** Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols / K. Froehlich, J. D. Haeger, J. Heger, J. Pastuschek, S. M. Photini, Y. Yan, A. Lupp, C. Pfarrer, R. Mrowka, E. Schleussner, U.R. Markert, A. Schmidt // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. – 2016. – Vol. 21 (3-4). – P. 89-98.

18. **Foty, R.** A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids / R. Foty // *J. Vis. Exp*. – 2011. – Vol. 51. – P. 2720.

19. **Costa, E.C.** Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: considerations and practical approaches / E.C. Costa, D. de Melo-Diogo, A.F. Moreira, M.P. Carvalho, I.J. Correia // *Biotechnol. J*. – 2018. – Vol. 13 (1). – P. 1700417.

20. **Cui, X.** Advances in multicellular spheroids formation / X. Cui, Y. Hartanto, H. Zhang // *J. R. Soc. Interface*. – 2017. – Vol. 14 (127). – P. 20160877.

21. **Santo, V.E.** Drug screening in 3D in vitro tumor models: overcoming current pitfalls of efficacy read-outs / V.E. Santo, S.P. Rebelo, M.F. Estrada, P.M. Alves, E. Boghaert, C. Brito // *Biotechnol. J.* – 2017. – Vol. 12 (1). – P. 1600505.

22. **Rice, A.J.** Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells / A.J. Rice, E. Cortes, D. Lachowski, B.C.H. Cheung, S.A. Karim, J.P. Morton, A. Del Rio Hernandez // *Oncogenesis.* – 2017. – Vol. 6 (7). – P. e352.

23. **Ravi, M.** Contributions of 3D cell cultures for cancer research / M. Ravi, A. Ramesh, A. Pattabhi // *J Cell. Physiol.* – 2017. – Vol. 232 (10). – P. 2679-2697.

24. **Luca, A.C.** Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines / A.C. Luca, S. Mersch, R. Deenen, S. Schmidt, I. Messner, K.L. Schafer, S.E. Baldus, W. Huckenbeck, R.P. Piekorz, W.T. Knoefel, A. Krieg, N.H. Stoecklein // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8 (3). – P. e59689.

25. **Zoetemelk, M.** Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma / M. Zoetemelk, M. Rausch, D.J. Colin, O. Dormond, P. Nowak-Sliwinska // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9 (1). – P. 7103.

26. **Karnoub, A.E.** Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis / A.E.Karnoub, A.B. Dash, A.P. Vo, A. Sullivan, M.W. Brooks, G.W. Bell, A.L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, R.A. Weinberg // *Nature.* – 2007. – Vol. 449 (7162). – P. 557-563.

27. **Chen, Y.** Adiposederived mesenchymal stem cells exhibit tumor tropism and promote tumorsphere formation of breast cancer cells / Y. Chen, Y. He, X. Wang, F. Lu, J. Gao // *Oncol. Rep.* – 2019. – Vol. 41 (4). – P. 2126-2136.

28. **Hiam-Galvez, K.J.** Systemic immunity in cancer / K.J. Hiam-Galvez, B.M. Allen, M.H. Spitzer // *Nat. Rev. Cancer.* – 2021. – Vol. 21 (6). – P. 345-359.

29. **Kitaeva, K.V.** Analysis of the interaction and proliferative activity of adenocarcinoma, peripheral blood mononuclear and mesenchymal stromal cells after co-cultivation in vitro / K.V. Kitaeva, T.S. Prudnikov, M.O. Gomzikova, S.K. Kletukhina, V. James, A.A. Rizvanov, V.V. Solovyeva // *BioNanoSci.* – 2019. – Vol. 9 (2). – P. 502-509.

30. **Breslin, S.** Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery / S. Breslin, L. O'Driscoll // *Drug Discov. Today.* – 2013. – Vol. 18 (5-6). – P. 240-249.

31. **Deakin, A.S.** Model for the growth of a solid in vitro tumor / A.S. Deakin // *Growth.* – 1975. – Vol. 39 (1). – P. 159-165.

32. **Melissaridou, S.** The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer / S. Melissaridou, E. Wiechec, M. Magan, M.V. Jain, M.K. Chung, L. Farnebo, K. Roberg // *Cancer Cell Int.* – 2019. – Vol. 19. – P. 16.

33. **Guan, X.W.** Tumor microenvironment interruption: a novel anti-cancer mechanism of Proton-pump inhibitor in gastric cancer by suppressing the release of microRNA-carrying exosomes / X.W. Guan, F. Zhao, J.Y. Wang, H.Y. Wang, S.H. Ge, X. Wang, L. Zhang, R. Liu, Y. Ba, H.L. Li, T. Deng, L.K. Zhou, M. Bai, T. Ning, H.Y. Zhang, D.Z. Huang // *Am. J. Cancer Res.* – 2017. – Vol. 7 (9). – P. 1913-1925.

34. **Qin, X.** Cisplatin-resistant lung cancer cell-derived exosomes increase cisplatin resistance of recipient cells in exosomal miR-100-5p-dependent manner / X. Qin, S. Yu, L. Zhou, M. Shi, Y. Hu, X. Xu, B. Shen, S. Liu, D. Yan, J. Feng // *Int. J. Nanomedicine.* – 2017. – Vol. 12. – P. 3721-3733.

35. **Demchenko, A.P.** The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection / A.P. Demchenko // *Exp. Oncol.* – 2012. – Vol. 34 (3). – P. 263-268.