

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.114.7: 577.352.6: 616-006

©Коллектив авторов

МИКРОКАПСУЛИРОВАННЫЕ МУЛЬТИКЛЕТОЧНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ СФЕРОИДЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ МОДЕЛИ *IN VITRO* ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВ

А.М. Цой^{1}, Д.С. Зайцева-Зотова¹, Э.Ф. Эдельвейс¹, А. Бартковиак²,
Ж.-Л. Горжен³, Е.Л. Водовозова¹, Е.А. Марквичева¹*

¹Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; тел.: +7(495) 336-06-00;
факс: +7(495) 335-10-11; эл. почта: tsoyanna@gmail.com

²Западнопомеранский университет технологии, Щецин, Польша

³Национальный политехнический институт Лотарингии,
Вандовер-лез-Нанси, Франция

В работе использован метод микрокапсулирования клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в биосовместимые альгинат-хитозановые микрокапсулы с целью генерирования на основе этих клеток мультиклеточных опухолевых сфероидов (МОС) и их дальнейшего исследования в качестве модели *in vitro* для тестирования противораковых лекарственных средств. На МОС, полученных на основе клеточной линии MCF-7, было исследовано цитотоксическое действие метотрексата (MTX). В зависимости от времени культивирования клеток в микрокапсулах были получены МОС со средним размером 150, 200 и 300 мкм. После инкубирования МОС с MTX в различных концентрациях (1, 2, 10, 50 и 100 нМ) в течение 48 ч. оценивали количество жизнеспособных клеток. Показано, что МОС гораздо устойчивее к MTX, чем монослойная культура, причем увеличение размера сфероидов приводит к увеличению устойчивости клеток в МОС к MTX. Так, при концентрации MTX 100 нМ в МОС размером 300 мкм доля жизнеспособных клеток в 2,5 раза превышала количество живых клеток в монослойной культуре. Предполагается, что микрокапсулированные МОС более адекватно отражают состояние клеток в малых солидных опухолях, чем монослойная культура. В дальнейшем МОС могут быть предложены в качестве новой модели *in vitro* для тестирования противораковых лекарств.

Ключевые слова: микрокапсулирование; мультиклеточные опухолевые сфероиды; альгинат-хитозановые микрокапсулы, метотрексат.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время в экспериментальной онкологии используются различные модели, в том числе спонтанные, перевиваемые и индуцированные опухоли животных, опухоли человека, перевитые животным, различные культуры клеток опухолей человека и животных, а также молекулярно-генетические модели [1].

В последнее время в связи с ужесточением требований к экспериментам на животных особое значение приобретают модели *in vitro* на основе клеточных культур, в том числе мультиклеточные опухолевые сфероиды (МОС). МОС – это искусственно полученные малые солидные опухоли, представляющие собой трехмерную (3D) модель на основе раковых клеток. Исследование

* - адресат для переписки

сферических агрегатов клеток (сфероидов) началось еще в первой половине двадцатого века. Важное значение в развитии этого направления имели работы Holtfreter [2]. Он изучал рост клеток в эмбрионах амфибий, которые похожи на сфероиды. Далее исследования с многоклеточными агрегатами, полученными на основе различных животных клеток, были продолжены [3-5].

В середине 70-х годов прошлого столетия Sutherland и Durand показали, что МОС представляют собой более адекватную модель малых солидных опухолей по сравнению с двумерными (2D) суспензионными или адгезионными культурами [6]. В настоящее время МОС широко применяются как модель *in vitro* в различных медико-биологических исследованиях, связанных с терапией рака [7]. Это, например, радиотерапия [5] или фотодинамическая терапия [8, 9].

Классические методы формирования сфероидов заключаются в том, что поверхностно-зависимые клетки культивируют при постоянном перемешивании, не давая им прикрепляться к поверхности, в результате чего они вынужденно растут в агрегатах, образуя сфероиды. Однако формирование МОС - достаточно сложная и трудоемкая задача. Кроме того, известно, что некоторые линии клеток вообще не образуют сфероидов при культивировании их в суспензии [10].

В 1980 году Lim и Sun впервые показали возможность культивировать животные клетки в полупроницаемых полимерных микрокапсулах на основе альгината и поли-L-лизина [11]. Предложенный метод сразу же нашел применение для микрокапсулирования самых разных клеток, включая островки Лангерганса (β -клетки поджелудочной железы, секретирующие инсулин) [12, 13], клетки парашитовидной железы, продуцирующие паратиреоидный гормон [14], а также гепатоциты [15]. В настоящее время с развитием генной инженерии спектр клеток, применяемых в микрокапсулировании, значительно увеличивается. Возникла область, называемая соматической генной терапией, в которой в отличие от генной терапии, где для генной модификации используются клетки хозяина, появилась возможность использовать генно-модифицированные любые животные клетки (мышь, хомяк и др.), секретирующие рекомбинантные человеческие белки и пептиды [16]. Микрокапсулы могут выполнять двойную функцию: работать в качестве микрореактора, "полупроницаемые" стенки которого обеспечивают выход генноинженерного терапевтического продукта, секретируемого клетками, и защищать эти инкапсулированные клетки от иммунной системы пациента [17].

Идея культивирования раковых клеток, способных формировать мультিকлеточные опухолевые сфероиды в микрокапсулах на основе альгината и хитозана была впервые предложена авторами ранее [18].

Целью данной работы было получение в микрокапсулах МОС путём культивирования в них клеточной линии аденокарциномы человека MCF-7 и их исследование в качестве модели *in vitro* для тестирования противоракового препарата – метотрексата.

МЕТОДИКА. В работе использовали следующие реагенты: NaCl, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, NaAlg, ЭДТА, метотрексат ("Sigma", США); среда для культивирования DMEM ("ПанЭко", Россия), эмбриональная телячья сыворотка ("HyClone", США); краситель трипановый синий ("Flow Laboratories, Inc.", США); суспензия латексных наночастиц (диаметр 600 нм, "Sigma", США). Олигохитозан (ММ 4200 Да, степень диацетилирования 87%) был получен методом радикальной дегградации с использованием перекиси водорода [19].

Культивирование клеток. В работе была использована клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Клетки культивировали во флаконах (объем 25 см²) в CO₂-инкубаторе в газовой среде, содержащей 5% CO₂, при температуре 37°C. Культивирование проводили в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Пересев культуры проводили на 2-4 сут. при достижении концентрации 10⁶ кл/мл среды.

Микрокапсулирование клеток. Суспензию клеток центрифугировали (900 g, 5 мин.), далее супернатант удаляли, а к осадку клеток (6-10×10⁶ кл.)

добавляли 2 мл раствора NaAlg, перемешивали и эту смесь диспергировали в 0,5% раствор CaCl_2 либо с помощью прибора с коаксиальной подачей воздуха (метод 1), либо с использованием электростатического генератора микрочастиц (метод 2). В случае метода 1 оптимальными были следующие параметры: скорость подачи клеток в растворе NaAlg перистальтическим насосом 0,2 мл/мин; давление сжатого воздуха 2,0-3,0 бар; диаметр иглы 0,4 мм; концентрация раствора NaAlg 2%; расстояние между кончиком иглы, через которую подается суспензия клеток в растворе NaAlg, до поверхности раствора CaCl_2 - 1 см. А в случае метода 2 оптимальными условиями были: напряжение генератора 6 кВ; скорость подачи клеток в растворе NaAlg перистальтическим насосом 0,5 мл/мин; диаметр иглы 0,3 мм; концентрация раствора NaAlg 1,3%; расстояние между кончиком иглы, через которую подается суспензия клеток в растворе NaAlg, до поверхности раствора хлорида кальция (CaCl_2) - 1 см. В результате диспергирования в растворе CaCl_2 формировались гидрогелевые CaAlg микрочастицы с включёнными в них клетками. Клетки, которые не включались в гель, трижды отмывали физиологическим раствором. Затем CaAlg микрочастицы с включёнными в них клетками переносили в 25 мл раствора олигохитозана (концентрация 0,1-0,3%) и инкубировали при перемешивании 5-10 мин. Полученные CaAlg микрочастицы, покрытые олигохитозаном, трижды промывали физиологическим раствором, а затем инкубировали в 50 мМ растворе ЭДТА для растворения CaAlg ядра путём удаления ионов кальция и получения микрокапсул с альгинат-хитозановой мембраной. Полученные таким образом микрокапсулы с альгинат-хитозановой полупроницаемой мембраной опять 3 раза промывали физиологическим раствором и затем средой для культивирования.

Культивирование микрокапсулированных клеток. Культивирование клеток в микрокапсулах проводили в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2) при температуре 37°C. Клетки росли в течение 2-3 недель до достижения необходимого среднего размера МОС.

Микроскопические исследования. За ростом клеток во флаконах и в микрокапсулах наблюдали с использованием инвертированного микроскопа Биолам-П1 (ЛОМО, Россия). Размер микрокапсул и толщину мембраны оценивали, используя окуляр с масштабной линейкой.

Оценка жизнеспособности клеток. Количество выживших клеток оценивали с помощью красителя трипанового синего (0,4% раствор) в камере Фукса-Розенталя. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле:

$$(\text{кол-во живых клеток в эксперименте} / \text{кол-во живых клеток в контроле}) \times 100.$$

Тестирование метотрексата. Микрокапсулы с МОС инкубировали в 24-луночных планшетах с МТХ в следующих концентрациях: 1, 2, 10, 50 и 100 нМ. Для этого к 100 мкл микрокапсул (плотный осадок) добавляли 1,5 мл среды для культивирования, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, соответствующей концентрацией МТХ, и инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C в течение 48 ч. В качестве контроля использовали монослойную культуру MCF-7 (10^5 кл в лунке). Для оценки неспецифической сорбции МТХ микрокапсулами монослой клеток инкубировали в присутствии пустых микрокапсул в среде, содержащей МТХ (1, 2, 10, 50, 100 нМ). Выживаемость клеток в образце с пустыми микрокапсулами была на 3-5% меньше по сравнению с контролем. Таким образом, было косвенно доказано, что неспецифическая сорбция МТХ микрокапсулами была крайне незначительной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящее время существует классический подход к получению мультиклеточных раковых сфероидов, суть которого заключается в том, что клеткам не позволяют прикрепиться к поверхности флакона путём обработки агарозой дна флакона для культивирования. Далее, после достижения клетками экспоненциальной фазы роста, суспензию клеток переносят либо в спиннер, либо в коническую колбу Эрленмейера, либо в биореактор и культивируют образовавшиеся сфероиды как суспензионную

культуру с перемешиванием. Полученные сфероиды фракционируют по размерам, отбирая нужную фракцию для дальнейших исследований.

В отличие от классических методов, не использующих микрокапсулирование для получения сферoidов, предложенный ранее авторами метод включения раковых клеток в микрокапсулы [18] позволяет легко получать в достаточно большом количестве микрокапсулированные мультиклеточные опухолевые сфероиды заданного диаметра с узким распределением по размерам. При этом можно получать сфероиды, состоящие из клеток, которые в суспензионной культуре вообще не способны формировать мультиклеточные агрегаты, а следовательно, из них вообще невозможно получить опухолевые сфероиды без микрокапсулирования. Кроме того, предложенный метод с использованием микрокапсулирования может позволить в будущем осуществлять совместное культивирование раковых клеток с другими типами клеток (фибробласты, эпителиальные клетки, макрофаги и др.) для получения более адекватной модели малых солидных опухолей *in vivo* по сравнению с классическими сфероидными.

Для исследования возможности использовать МОС в качестве модели *in vitro* для тестирования противоракового препарата в работе был использован метотрексат. Цитостатический препарат МТХ почти 50 лет широко применяется в клинике для лечения опухолей и аутоиммунных патологий, таких как ревматоидный артрит [20]. МТХ - препарат из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты. В связи с антифолиевым эффектом препарат подавляет клеточный митоз, является активным в отношении тканей с высокой пролиферативной активностью клеток и тормозит рост злокачественных новообразований [21].

В качестве противоракового препарата в работе был использован метотрексат. Цитотоксичность МТХ исследовали на МОС, полученных на основе клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. В качестве контроля использовали монослойную культуру MCF-7. Сфероиды были получены методом культивирования клеток в биосовместимых полимерных микрокапсулах на основе природных полисахаридов альгината и хитозана.

Оптимизация условий получения альгинат-хитозановых микрокапсул. Наиболее часто используемая пара полимеров для получения микрокапсул – это альгинат (полианион) и поли-L-лизин (поликатион) [11]. Альгинат нашёл самое широкое применение для иммобилизации различных типов клеток и биологически активных молекул. Недостатком поли-L-лизина является его высокая стоимость и возможная токсичность даже в низких концентрациях [22]. Альтернативой поли-L-лизину может быть хитозан, который в настоящее время всё более широко используется в медицине и фармакологии. Единственным недостатком коммерческих высокомолекулярных хитозанов применительно к инкапсулированию животных клеток является их нерастворимость в физиологическом интервале pH (pH 6-7). Все ранее предпринятые попытки использовать коммерческие хитозаны, имеющие мол. массу 200 кДа и выше, в качестве поликатиона для получения микрокапсул с целью включения в них животных клеток были безуспешными. Нами впервые предложено заменить высокомолекулярные хитозаны, которые растворяются только при pH 4 и ниже, на олигохитозаны (мол. масса 3-20 кДа). Такой подход позволил решить главную задачу - получить хитозаны, растворимые в интервале pH 6,5-6,8, и, следовательно, провести иммобилизацию клеток в физиологических условиях для сохранения максимально возможного количества жизнеспособных клеток [18].

Полиэлектролитные микрокапсулы были получены в три этапа: 1) добавление по каплям смеси водорастворимой соли альгината натрия (NaAlg) с клетками в раствор хлорида кальция с целью получения микрочастиц из нерастворимого альгината кальция (CaAlg); 2) инкубирование CaAlg микрочастиц в растворе олигохитозана для формирования полиэлектролитной альгинат-хитозановой мембраны на поверхности CaAlg микрочастиц; 3) обработка

микрочастиц раствором хелатирующего агента (ЭДТА) с целью получения полых микрокапсул путем растворения альгинатного ядра микрочастиц. Так как далее микрокапсулы предполагалось использовать для культивирования клеток, их переносили в среду для культивирования. Схема получения микрокапсул представлена на рисунке 1. Размер микрокапсул определяется размером CaAlg микрочастиц. Обычно для получения микрокапсул с размерами в диапазоне 150-900 мкм используются различные способы диспергирования клеток в растворе альгината натрия. В данной работе диспергирование осуществляли двумя методами: 1) с помощью специально разработанного прибора с коаксиальной подачей сжатого воздуха, который разбивал струю подаваемого раствора альгината натрия с клетками, тем самым уменьшая размер капель на кончике иглы, попадающих далее в раствор хлорида кальция [23] и 2) с использованием электростатического генератора [24], который позволял уменьшать размер капель за счет действия электростатических сил.

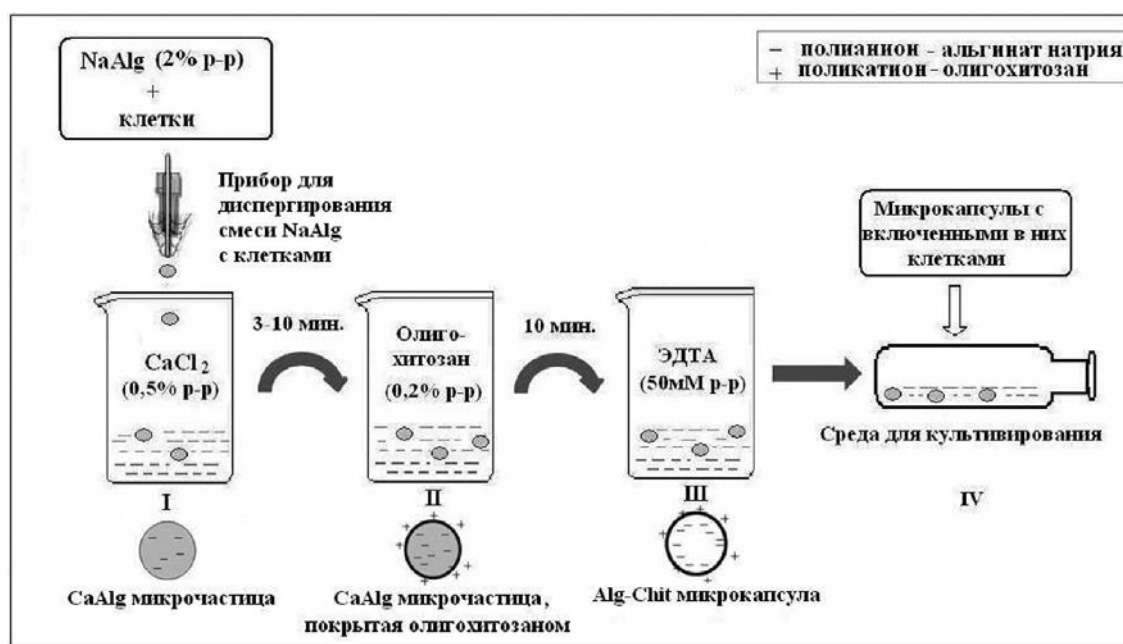


Рисунок 1.

Схема получения Alg-Chit микрокапсул с включенными в них клетками: I. добавление по каплям смеси 2% р-ра NaAlg с клетками в 0,5% раствор CaCl₂; II. инкубирование полученных микрокапсул на основе CaAlg в 0,2% растворе олигохитозана; III. растворение альгинатного ядра в 50 мМ растворе ЭДТА; IV. культивирование микрокапсулированных клеток.

Оптимальные условия для получения CaAlg микрочастиц по первому методу были найдены ранее [23]. В случае получения CaAlg микрочастиц по второму методу в результате серии предварительных экспериментов были подобраны следующие оптимальные условия: напряжение генератора 6 кВ; скорость подачи клеток в растворе NaAlg перистальтическим насосом 0,5 мл/мин; диаметр иглы 0,3 мм; концентрация раствора NaAlg 1,3%; расстояние между кончиком иглы, через которую подается суспензия клеток в растворе NaAlg, до поверхности хлорида кальция 1 см.

На рисунке 2 представлены гистограммы распределения Alg-Chit микрокапсул по размерам. Использование электростатического генератора позволило существенно снизить размер CaAlg микрочастиц, а, следовательно, и полученных на их основе микрокапсул. Из рисунка 2(б, г) также видно, что полученные в физ. растворе микрокапсулы увеличивались в размере после их инкубирования в среде для культивирования, что объясняется их набуханием.

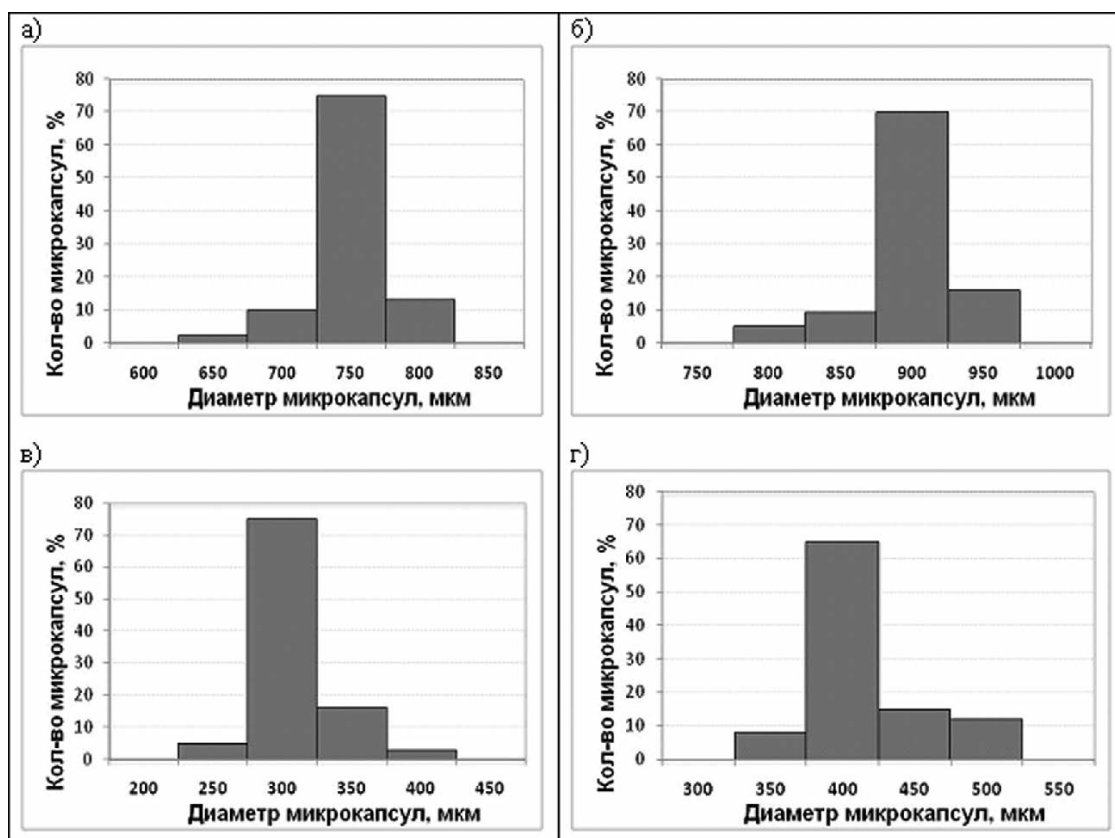


Рисунок 2.

Распределение микрокапсул по размерам в случае применения прибора с коаксиальной подачей воздуха в физ. растворе (а), после инкубирования в среде для культивирования через 24 ч. (б); и с использованием электростатического генератора частиц в физ. растворе (в), после инкубирования в среде для культивирования через 24 ч. (г).

Вторым важным этапом работы была оптимизация толщины мембраны микрокапсул. Так как механическая прочность микрокапсул в значительной степени определяется толщиной полиэлектrolитной мембраны, были исследованы некоторые ключевые параметры, с помощью которых можно регулировать (варьировать) эту толщину. Среди этих параметров следует отметить, в первую очередь, молекулярную массу и концентрацию раствора олигохитозана, в котором инкубируют предварительно полученные CaAlg микрочастицы, а также pH раствора олигохитозана и время инкубирования в нем микрочастиц.

Как показано на рисунке 3, толщина формирующейся мембраны увеличивается с увеличением времени контакта полиэлектrolитов при инкубации CaAlg микрочастиц в растворе олигохитозана. Для визуализации мембраны под микроскопом на этапе формирования микрочастиц в раствор NaAlg добавляли латексные частицы ($d=600$ нм). Далее полученные после обработки микрочастиц раствором ЭДТА микрокапсулы центрифугировали при 9030 g в течение 5-10 мин. и измеряли размер мембраны под микроскопом. Как видно из рисунка 3, латексные частицы концентрировались на внутренней поверхности мембраны. Если время выдерживания микрочастиц в растворе олигохитозана больше, чем время, необходимое для диффузии его молекул внутрь CaAlg микрочастиц и их взаимодействия с альгинатом, то молекулы полиэлектrolитов успевают провзаимодействовать по всему объёму микрочастиц. Именно в таком случае визуально зафиксировать мембрану не удастся (рис. 3г).

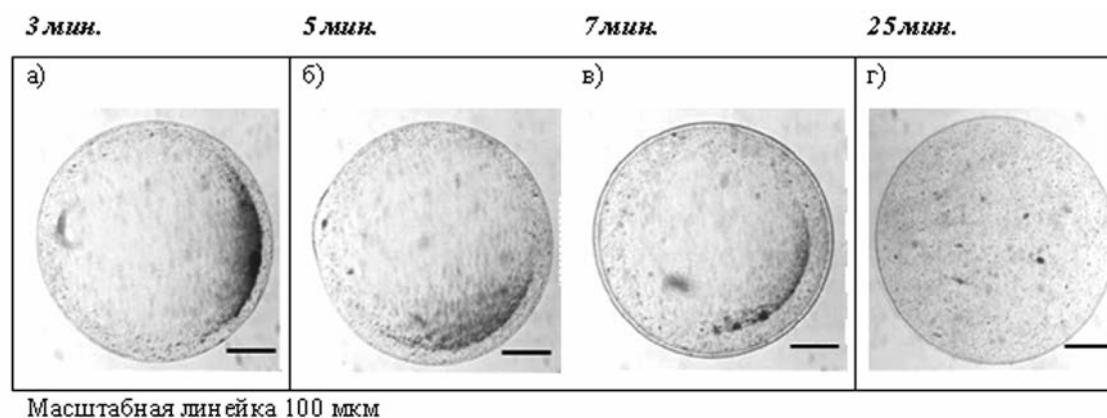


Рисунок 3.

Зависимость толщины формирующейся мембраны от времени инкубирования CaAlg микрочастиц в растворе олигохитозана. молекулярная масса олигохитозана 4200, рН раствора олигохитозана 6,6.

При иммобилизации клеток важно, чтобы толщина полиэлектролитной мембраны микрокапсул была проницаема для питательных веществ среды для культивирования. С другой стороны, мембрана должна быть механически и химически прочной, чтобы сохранять целостность микрокапсул при длительном культивировании клеток.

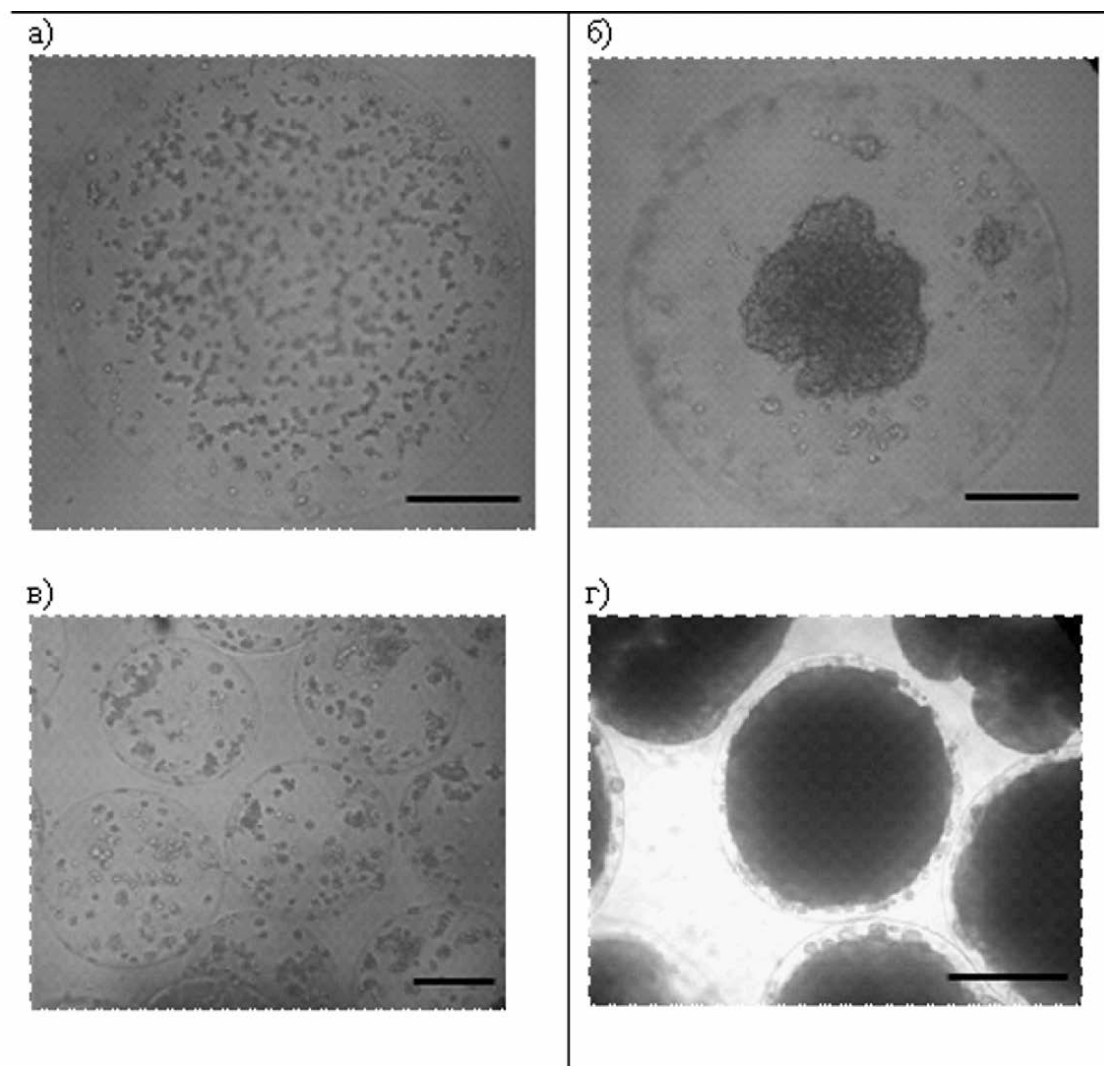
В таблице представлены зависимости толщины мембраны от времени инкубирования CaAlg микрочастиц и концентрации раствора олигохитозана. Увеличение концентрации олигохитозана и увеличение времени инкубирования микрочастиц в его растворе приводит к увеличению толщины получаемой полиэлектролитной мембраны. Следовательно, варьируя эти параметры, можно подобрать оптимальные условия для формирования полиэлектролитной мембраны микрокапсул. Так как оптимальная толщина механически стабильной полиэлектролитной мембраны составляет 80-100 мкм, в дальнейших экспериментах использовали 0,1% раствор олигохитозана и инкубировали микрочастицы в его растворе 5-7 мин.

Таблица. Влияние условий формирования полиэлектролитной мембраны на размер получаемых мембран CaAlg микрочастиц. молекулярная масса олигохитозана 4200 Да, рН раствора олигохитозана 6,6.

Концентрация олигохитозана, %	Толщина мембраны при варьировании времени инкубации CaAlg микрочастиц в растворе олигохитозана, мкм			
	3 мин.	5 мин.	7 мин.	10 мин.
0,1	66±5	82±5	89±5	Мембраны не наблюдали
0,15	110±6	122±6	Мембраны не наблюдали	
0,2	Мембраны не наблюдали			

Получение мультиклеточных опухолевых сфероидов в микрокапсулах. Процесс микрокапсулирования клеток осуществляли по схеме, описанной выше (рис. 1).

За ростом клеток внутри микрокапсул наблюдали с помощью светового микроскопа: клетки образовывали агрегаты, которые увеличивались в размере по мере культивирования, постепенно заполняя объем микрокапсулы (рис. 4).



Масштабная линейка 200 мкм

Рисунок 4.

Рост клеток MCF-7 внутри Alg-Chit микрокапсул, полученных по методу 1 (а, б) и по методу 2 (в, г): сразу после процесса микрокапсулирования (а, в); мультиклеточные сфероиды на 28 сут. культивирования (в) и на 14 сут. культивирования (г).

Известно, что размер сфероидов для адекватной модели малой солидной опухоли *in vivo* составляет 300–600 мкм. В сфероидах большего размера могут иметь место диффузионные ограничения, как по кислороду, так и по компонентам среды, что приводит к некрозу клеток, а, следовательно, такие сфероиды не могут быть адекватны опухоли *in vivo* [8]. В случае применения электростатического

генератора и, соответственно, получения микрокапсул меньшего размера, рост МОС и заполнение объёма всей микрокапсулы клетками происходит быстрее (рис. 4), что позволяет уменьшить время генерирования МОС внутри Alg-Chit микрокапсул. Кроме того, можно легко добиться получения сфероидов с узким распределением по размерам, при этом размер их чётко ограничен размером микрокапсулы.

Клетки культивировали в микрокапсулах в течение 14-28 дней. На рисунке 5 показана типичная кривая роста клеток MCF-7 внутри Alg-Chit микрокапсул, полученных по методу 1.

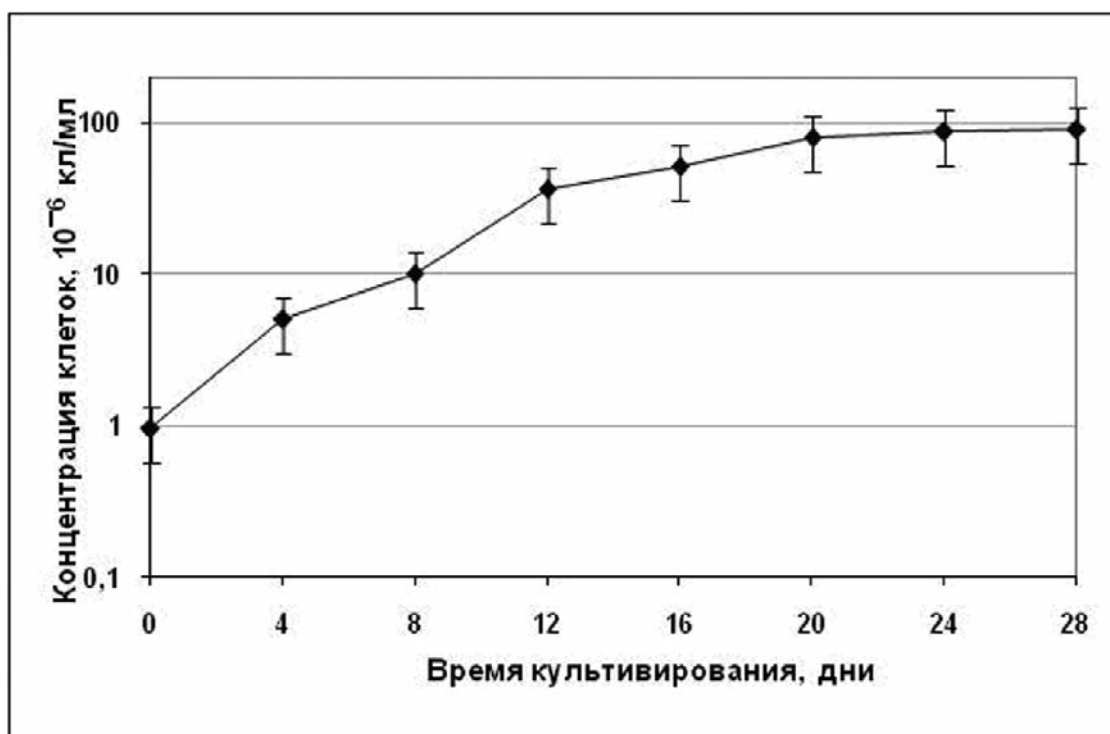


Рисунок 5.

Кривая роста клеток MCF-7 внутри Alg-Chit микрокапсул, полученных по методу 1. Приведены данные двух независимых экспериментов.

Изучение цитотоксического действия метатрексата на мультиклеточных опухолевых сфероидах. На первом этапе работы в микрокапсулах среднего размера 900 мкм были генерированы МОС среднего размера 200 мкм, которые далее инкубировали в 24-луночном планшете в течение 48 ч. в среде DMEM с сывороткой (10%), содержащей MTX. Концентрации MTX в интервале от 1 до 100 нМ были выбраны на основании результатов, полученных ранее для монослойной культуры клеток [25]. Были проведены два независимых эксперимента в трех повторах. Полученные результаты зависимости количества жизнеспособных клеток для сфероидов и для монослойной культуры (контроль) от концентрации MTX представлены на рисунке 6а. Для оценки сорбции MTX на поверхности микрокапсул предварительно была проведена серия экспериментов с монослойной культурой в присутствии пустых микрокапсул. Неспецифическая сорбция MTX на поверхности микрокапсул не превышала 5%.

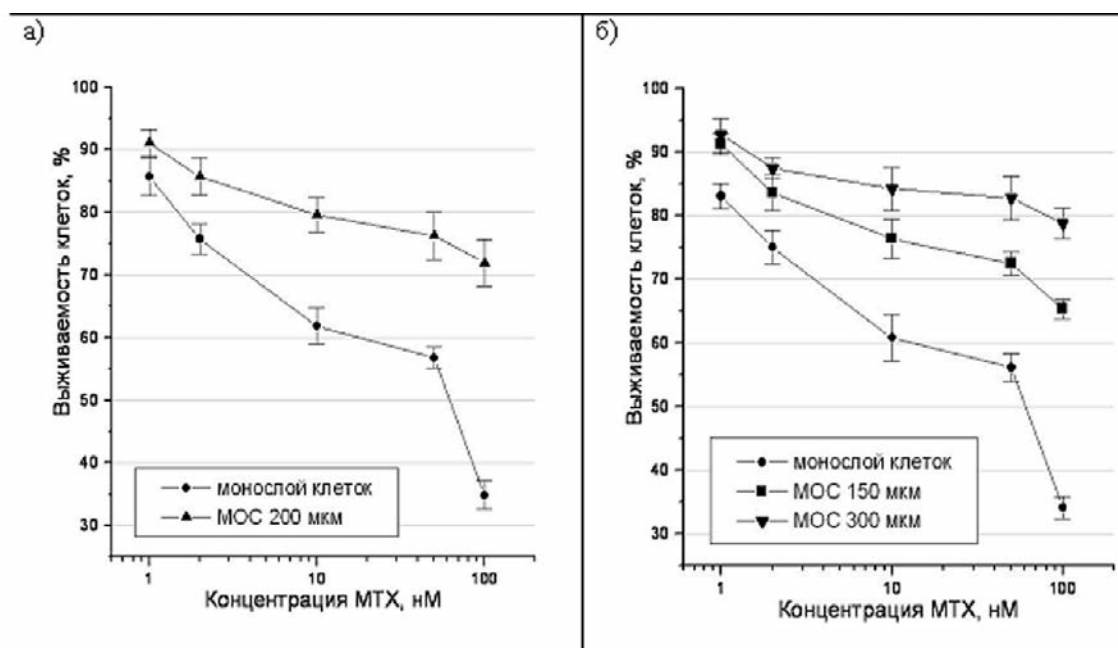


Рисунок 6.

Выживаемость клеток MCF-7 в мультиклеточных опухолевых сфероиды (со средним размером 150, 200 и 300 мкм) и в монослойной культуре (контроль) в зависимости от концентрации МТХ. Сфероиды получены путём культивирования клеток в Alg-Chit микрокапсулах методами 1 (а) и 2 (б).

Выживаемость жизнеспособных клеток для монослойной культуры составила 83, 73, 59, 56 и 36% при инкубировании с МТХ в концентрациях 1, 2, 10, 50 и 100 нМ, соответственно (рис. 6а). В то же время для МОС эти значения были больше: 91, 86, 80, 76 и 72%, соответственно. При концентрации МТХ 100 нМ выживаемость жизнеспособных клеток в контроле была вдвое меньше по сравнению с таковой для МОС. Следовательно, как и ожидалось, МОС оказались устойчивее к МТХ, чем монослойная культура.

Далее представилось интересным проверить цитотоксическое действие МТХ в зависимости от размера МОС. Для этого были получены микрокапсулы (400 мкм) с включёнными в них клетками с использованием электростатического генератора частиц (рис. 4в,г), что позволило сформировать МОС со средним диаметром 150 и 300 мкм. В сфероидах большего размера может иметь место некроз клеток в центральной части МОС, обусловленный диффузионными ограничениями по кислороду и компонентам среды [14]. Использование же электростатического генератора позволяет снизить размер микрокапсул с 900 мкм (в методе 1) до 400 мкм и ниже. Этот метод позволяет получать сфероиды с узким распределением по размерам, так как размер сфероида чётко ограничивается мембраной микрокапсулы (см. рис. 4г), а унимодальные микрокапсулы легко сформировать после оптимизации всех параметров процесса микрокапсулирования. Кроме того, этот метод позволяет достичь более быстрого заполнения клетками всего объёма микрокапсулы.

При концентрации МТХ 100 нМ количество живых клеток составило 65 и 88% для сфероидов размером 150 и 300 мкм, соответственно, в то время как в контроле это значение составило только 35% (рис. 6б). Следовательно, увеличение размера сфероидов ограничивает доступ цитостатического агента ко всей популяции клеток. Отметим, что в случае МОС с размером 300 мкм выживаемость клеток в 2,5 раза была выше, чем в монослойной культуре.

Таким образом, в результате работы были оптимизированы условия получения микрокапсул заданного размера с мембраной оптимальной толщины; показана возможность получения сфероидов заданного размера в микрокапсулах; показано, что МОС значительно более устойчивы к МТХ, чем монослойная культура, причем цитотоксическое действие МТХ уменьшается с увеличением размера МОС.

Предложенная модель на основе микрокапсулированных опухолевых сфероидов может рассматриваться как новая модель *in vitro*, которая имеет преимущества как перед монослойными культурами, так и перед сфероидами, полученными классическими методами. Микрокапсулированные МОС могут быть предложены для тестирования различных противораковых препаратов *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Попова Н.А. (2000) Соросовский образов. ж., **6**, 33-38.
2. Holtfreter J. (1947) Curr. J. Exper. Zoology, **106**, 197-222.
3. Moscona A. (1952) Exper. Cell Res., **3**, 535-539.
4. Knudsen K.A., Horwitz A.F. (1977) Development Biology, **58**, 328-338.
5. Santini M.T., Rainaldi G., Indovina P.L. (1999) Int. J. Radiat. Biol., **75**, 787-789.
6. Sutherland R.M., Durand R.E. (1976) Curr. Top Radiat. Res. Q., **1**, 87-139.
7. Sutherland R.M. and Durand R.E. (1984) Recent Results Cancer Res., **95**, 24-49.
8. Coutier S., Bezdetnaya L., Parache R.-M., Foster T.H., Guillemin F. (2002) Radiat. Res., **158**, 339-345.
9. Marchal S., Fadloun A., Maugain E.D., Hallewin M.A., Guillemin F., Bezdetnaya L. (2005) Biochem. Pharmacol., **69**, 1167-1176.
10. Yuhas J.M., Li A.P., Martinez A.O., Ladman A.J. (1977) Cancer Res., **10**, 3639-3643.
11. Lim F., Sun A.M. (1980) Science, **210**, 908-910.
12. Sullivan S.J., Maki K.M., Borland M.D. (1991) Science, **252**, 718-721.
13. Sun Y., Ma X., Zhou D. (1996) J. Clin. Invest., **98**, 1417-1422.
14. Fu X.W., Sun A.M. (1991) Transplantation, **47**, 432-435.
15. Bruni S., Chang T.M. (1989) Biomater. Artif. Cells Artif. Organs, **17**, 403-411.
16. Chang P.L., Van Raamsdonk J.M., Hortelano G., Barsoum S.C., MacDonald N.C., Stockle T.L. (1999) Trends Biotechnol., **2**, 78-83.
17. Марквичева Е.А. (2002) Хитин и хитозан: получение, свойства и применение. Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова, Москва: Наука, 315-326.
18. Markvicheva E.A., Bezdetnaya L., Bartkowiak A., Marc A., Gorgen G-L., Guillemin F., Poncelet D. (2003) Chem. Ind., **12**, 585-588.
19. Osumi H., Kazuo K. (1979) Jpn. Patent 79,148,890. (Chem Abst. 1980, 92, 148883k).
20. McGuire J.J. (2003) Curr. Pharm. Design, **9**, 2593-2613.
21. Johntson A., Gudjonsson J.E., Sigmundsdottir H., Ludviksson B.R., Valdimarsson H. (2005) Clin. Immunol., **114**, 154-163.
22. Strand B.L., Skjak-Braek G., Gaserod O. (2004) Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology, Series Focus on Biotechnology. (Willaert R., Nedovich V., eds.). Dordrecht; Boston; London: Kluwer Academic Publishers, **8A**, 165-184.
23. Селина О.Е., Чинарев А.А., Обухова П.С., Бартковиак А., Бовин Н.В., Марквичева Е.А. (2008) Биоорг. химия, **34**, 522-526.
24. Manojlovic V., Djonlagic J., Obradovich B., Nedovich V.A., Bugarski B.M. (2006) International J. Nanomedicine, **1(2)**, 163-171.
25. Водовозова Е.Л., Гаенко Г.П., Бобрикова Е.С., Пазынина Г.В., Молотковский Ю.Г. (2007) Хим.-Фарм. журн., **41**, 10-14.

Поступила: 13. 04. 2009.

**MICROENCAPSULATED MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS:
PREPARATION AND USE AS A NOVEL *IN VITRO* MODEL FOR DRUG SCREENING**

*A.M. Tsoy¹, D.S. Zaytseva-Zotova¹, E.F. Edelweiss¹, A. Bartkowiak², J-L. Goergen³,
E.L. Vodovozova¹, E.A. Markvicheva¹*

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia; tel.: +7 (495) 336-0600; fax: +7(495) 335-10-11;
e-mail: tsoyanna@gmail.com

²Westpomeranian University of Technology, Szczecin, Poland

³Institut National Polytechnique de Lorraine - ENSAIA, Vandoeuvre-les-Nancy, France

In the current study a technique for microencapsulation of human breast adenocarcinoma cells MCF-7 in alginate-chitosan microcapsules is used. Microencapsulation is proposed to generate multicellular tumor spheroids (MTS) based on these cells and to test them further as an *in vitro* model for anti-tumor drug screening. Cytotoxicity of methotrexate (MTX) was studied on the obtained MTS. A set of MTS with mean size of 150, 200 and 300 μ m was prepared in function of a cultivation time. After incubation of MTS in cultivation medium containing MTX at concentrations of 1, 2, 10, 50 and 100 nM for 48 hs cell viability was evaluated. MTS were shown to be more resistant to MTX than the monolayer culture, and the resistance to MTX was increased with enhancing a spheroid size. At MTX concentration of 100 nM a number of viable cells in MTS with the size of 300 μ m was 2.5-fold bigger than that one in monolayer culture. It is suggested that the cells in microencapsulated MTS can better mimic cell behavior in a small size solid tumor than the cells in a monolayer culture. In future microencapsulated MTS can be proposed as a novel *in vitro* model for anticancer drug screening.

Key words: microencapsulation; multicellular tumor spheroids; alginate-chitosan microcapsules, methotrexate.