



ПОЛИМЕРЫ 2,5-ДИГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ ИНДУЦИРУЮТ ОБРАЗОВАНИЕ СФЕРОИДОВ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

© 2023 г. Г. К. Рысцов*, #, А. В. Лисов*, М. Ю. Земскова*, #

*ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований” РАН,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,
Россия, 142290 Пушкино, просп. Науки, 5

Поступила в редакцию 20.04.2022 г.

После доработки 20.05.2022 г.

Принята к публикации 31.05.2022 г.

Прикрепленные к подложке клетки, выращенные в двухмерной (2D) или суспензионной культуре, не могут точно воспроизвести существующие в тканях и органах межклеточные взаимодействия. Сфероиды, являясь трехмерными (3D) образованиями, более точно воспроизводят структуру органов или новообразований и демонстрируют повышенную по сравнению с 2D-культурами выживаемость, соответствующую морфологию и гипоксическое ядро, которое наблюдается в нативных опухолях *in vivo*. Сфероиды опухолевых клеток также являются моделями процесса метастазирования, поэтому в настоящее время сфероиды широко используют для тестирования новых противоопухолевых препаратов. Однако получение и применение 3D-культур может быть сопряжено с рядом трудностей, таких как потребность в дорогостоящих реагентах и оборудовании, низкая скорость формирования сфероидов необходимого размера и возникновение долгосрочных изменений в клеточном метаболизме, которые зависят от методик, используемых для получения сфероидов. Нами было обнаружено, что инкубирование опухолевых и нормальных клеток в присутствии нетоксичных для клеток полимеров 2,5-дигидроксибензойной кислоты (поли-2,5-ДГБК) способно индуцировать формирование 3D-структур. На основании обнаруженного эффекта был разработан новый способ быстрого получения 3D-культур, не требующий использования дополнительного оборудования, дорогостоящих реактивов и не оказывающий долговременного влияния на клеточный гомеостаз. Сфероиды, полученные по разработанной методике, представляют собой модели 3D-структур и могут быть использованы для биологических исследований межклеточных взаимодействий и скрининга фармацевтических препаратов.

Ключевые слова: 3D-культуры, сфероиды, фармакологический скрининг, культуры клеток, лигниноподобные полимеры, полимеры 2,5-дигидроксибензойной кислоты

DOI: 10.31857/S0132342322060197, EDN: GEUPDF

ВВЕДЕНИЕ

Культуры клеток млекопитающих используют для скрининга лекарственных средств, исследований новообразований, тканевой инженерии, моделирования процессов метастазирования, анализа функций генов и анализа межклеточных взаимодействий [1–4]. За время использования клеточных культур в лабораторной практике было обнаружено, что клетки, выращенные как трехмерные структуры (3D, сфероиды), обеспе-

чивают более достоверные данные для изучения клеточного гомеостаза и клинических испытаний, чем клетки, культивируемые в монослое. Рост клеток в 3D-культуре обеспечивает возможность клеток взаимодействовать как между собой, так и с внеклеточным матриксом. Эти взаимодействия более точно имитируют среду *in vivo* и позволяют получить более точные данные, приближенные к условиям организма, что особо значимо для проведения тестов для скрининга новых лекарств [5]. Сфероиды используют как модель новообразований для изучения механизмов резистентности к лекарственным средствам, которая может быть обусловлена межклеточными взаимодействиями, устойчивостью к индуцированной клеточной гибели (апоптозу), увеличению доли

Сокращения: RTKs – рецепторные тирозинкиназы (receptor tyrosine kinases); ММСК – мультипотентные мезенхимальные клетки стромы костного мозга; поли-2,5-ДГБК – полимеры 2,5-дигидроксибензойной кислоты.

Авторы для связи: (тел.: +7 (999) 963-15-47; +7 (929) 913-27-56; эл. почта: gleb.8.ristoff@gmail.com, mzemskova@ibpm.pushchino.ru).

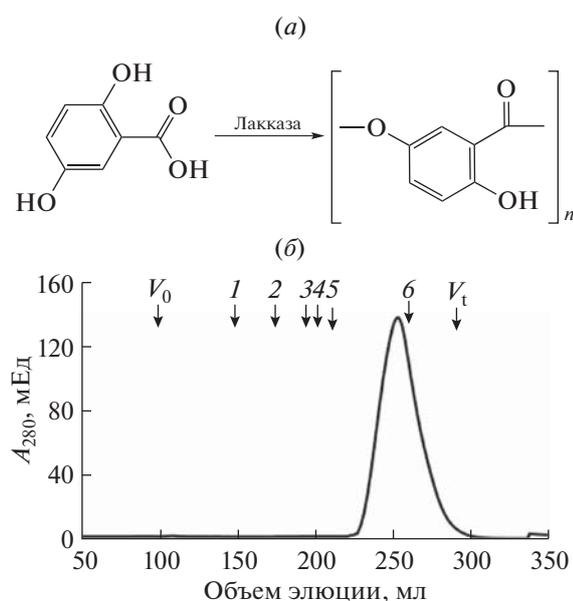


Рис. 1. (а) – Схема синтеза полимеров 2,5-ДГБК под воздействием лакказы, выделенной из гриба *Trametes versicolor*. Слева представлена структурная формула мономера – 2,5-ДГБК, справа – фрагмент полимерной макромолекулы, получаемой в результате окисления мономера; (б) – результат гель-фильтрации поли-2,5-ДГБК на колонке с носителем Superdex 200. V_0 – “пустой” объем колонки, V_t – полный объем колонки. Маркеры молекулярной массы: 1 – каталаза (230 кДа), 2 – амилаза (200 кДа), 3 – алкогольдегидрогеназа (150 кДа), 4 – гексокиназа (100 кДа), 5 – бычий сывороточный альбумин (67 кДа), 6 – рибонуклеаза (14 кДа).

покоящихся клеток, модуляцией экспрессии белков (включая топоизомеразы и репаративные ферменты), снижением проницаемости для препаратов и наличием гипоксического и некротического центров [6]. Таким образом клеточные ответы на воздействие фармакологических препаратов значительно различаются для одного и того же типа клеток, выращенных в 2D- или 3D-культурах. Очевидно, что использование сфероидов в моделировании роста опухолей для изучения сигнальных путей и межклеточных взаимодействий позволяет оптимизировать лечение и обеспечивает понимание механизмов развития устойчивости к лекарственным препаратам [7–10]. В настоящее время сфероиды интенсивно используют в платформах для скрининга новых медикаментов [11–13]. Сфероиды – альтернатива моделям лабораторных животных в исследованиях рака [14], а также возможный материал для использования в тканевой инженерии для реконструкции органов и тканей [15, 16].

Существует несколько подходов к выращиванию сфероидов, таких как метод предотвращения прикрепления [17–19], метод “висячей капли”

[20–23], процедуры, основанные на перемешивании суспензии клеток [24–26], использовании матрикса [27–32] или искусственно сконструированных каркасов [33, 34]. Однако в настоящее время многие методики создания 3D-культур клеток либо дорогие и трудоемкие [19, 23], либо способны влиять на жизнедеятельность используемых клеток из-за применения биологически активных агентов [31–34].

Исследуя ферментативное окисление фенольных мономеров гентизиновой кислоты (2,5-ДГБК) и биологических свойств полученных в результате этой реакции полимеров (поли-2,5-ДГБК), мы определяли цитотоксичность различных концентраций полимеров (0–100 мкг/мл) для различных типов клеток. Было обнаружено, что исследуемые вещества не обладают токсическими свойствами. На основании этого было решено провести серию опытов с использованием повышенной концентрации поли-2,5-ДГБК – 200 мкг/мл. Было обнаружено, что обработка культивируемых клеток человека поли-2,5-ДГБК в концентрации 200 мкг/мл приводит к переходу клеточной культуры в 3D-форму. Следует отметить, что полученные нами полимеры – это продукты поликонденсации 2,5-ДГБК (рис. 1а), которые структурно схожи с веществами из группы лигнинов, однако, в отличие от природных лигнинов, имеют постоянный состав, определяемый условиями синтеза [35].

На основании обнаруженных свойств полимеров и учитывая вышеперечисленные трудности применения различных технологий формирования 3D-культур, была поставлена цель разработать методику быстрого получения сфероидов из опухолевых и/или нормальных клеток млекопитающих, которые могут сохранять свойства роста в 3D-культурах в течение длительного времени.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез поли-2,5-ДГБК. Как нами было обнаружено ранее, окисление 2,5-ДГБК под воздействием лакказы приводит к образованию водонерастворимого осадка, однако при этом можно было синтезировать полимеры, растворимые в воде, посредством окислительной сополимеризации 2,5-ДГБК с желатином [35]. При окислении 20 мМ 2,5-ДГБК под воздействием лакказы в концентрации 3–7 ед./мл происходило образование водонерастворимого осадка серо-зеленоватого цвета. Однако при использовании лакказы в количестве от 10 ед./мл реакционная смесь приобретала темно-коричневый окрас, и образовывалось небольшое количество черного осадка. После удаления осадка центрифугированием и

низкомолекулярных компонентов реакционной смеси с помощью диализа было проведено исследование молекулярно-массового распределения образца методом гель-фильтрации на колонке с носителем Superdex 200. Элюция препарата с колонки происходила одним пиком, что указывает на молекулярную гомогенность препарата (рис. 1б). Молекулярная масса образца составляла 15–20 кДа. Затем диализованный препарат высушивали под вакуумом и использовали в дальнейшей работе. Возможно, что образование водорастворимых поли-2,5-ДГБК связано с активностью лакказы, т.е. под воздействием большого количества фермента образующиеся полимеры 2,5-ДГБК подвергаются вторичному окислению и разлагаются до более низкомолекулярных фрагментов.

Полимеры 2,5-ДГБК индуцируют формирование сфероидов клеток человека. В результате данного исследования были получены сфероиды из нескольких типов клеток, включающих как опухолевые, так и клетки первичных культур человека. Также мы изучили возможность формирования смешанных сфероидов, включающих в себя эпителиальные клетки и фибробласты стромы предстательной железы.

Было показано, что все клеточные линии, используемые в данном исследовании, как иммортализованные опухолевые культуры, так и первичные клетки мезенхимы (ММСК) и фибробласты стромы предстательной железы, способны формировать 3D-структуры в присутствии поли-2,5-ДГБК (рис. 2). При этом размер, форма или скорость роста сфероидов различаются для каждого типа клеток. Например, клетки линий PC3 (рис. 2в) и MDA-MB-453 (рис. 2з) формируют слабокомпактизированные сфероиды, называемые “виноградная гроздь” [36]. Для остальных клеточных линий показано, что клетки под воздействием поли-2,5-ДГБК первоначально организованы в рыхлые агрегаты (рис. 3а), которые при дальнейшем культивировании в присутствии полимера трансформируются в образования из плотно соединенных клеток (рис. 2а, 2б, 2г–ж, 2и, 2к, рис. 3б), как это характерно для сфероидов [37, 38]. Следует отметить, что морфология сфероидов с различной степенью компактизации, наблюдаемая для разных клеточных линий, не связана со свойствами поли-2,5-ДГБК. Ранее при применении других подходов формирования 3D-структур также отмечалась различная морфология сфероидов, т.е. организация клеток в составе сфероида по типу “виноградной грозди” для линий PC3 [39] и MDA-MB-453 [40] и образование компактных сфероидов клетками линий LNCaP [41],

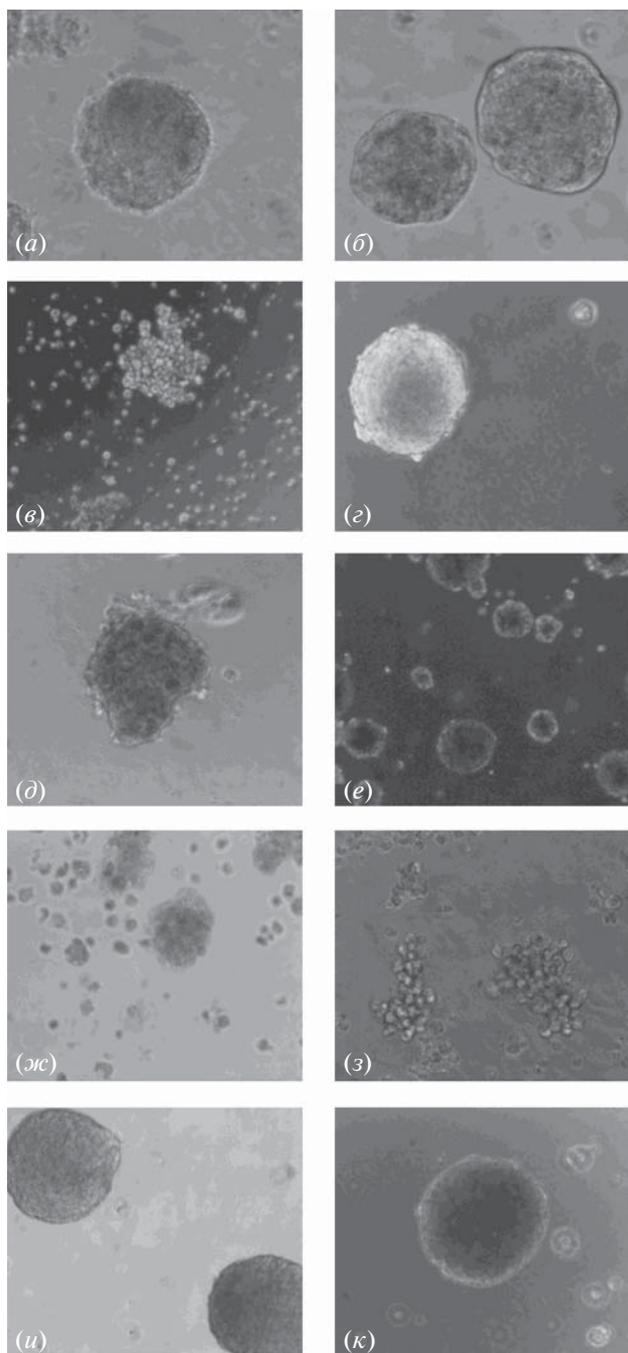


Рис. 2. Сфероиды, сформированные в присутствии 200 мкг/мл поли-2,5-ДГБК, из различных клеточных линий, полученные с использованием варианта 1 методики (см. “Эксперим. часть”). (а) – LNCaP (клетки рака простаты); (б) – DU145 (клетки рака простаты); (в) – PC3 (клетки рака простаты); (г) – T24 (клетки рака мочевого пузыря); (д) – MDA-MB-231 (клетки рака груди); (е) – MCF7 (клетки рака груди); (ж) – BT474 (клетки рака груди); (з) – MDA-MB-453 (клетки рака груди); (и) – клетки первичной культуры фибробластов человека, полученных из стромы предстательной железы; (к) – ММСК (стволовые клетки человека). Микрофотографии сделаны с использованием 20× увеличения.

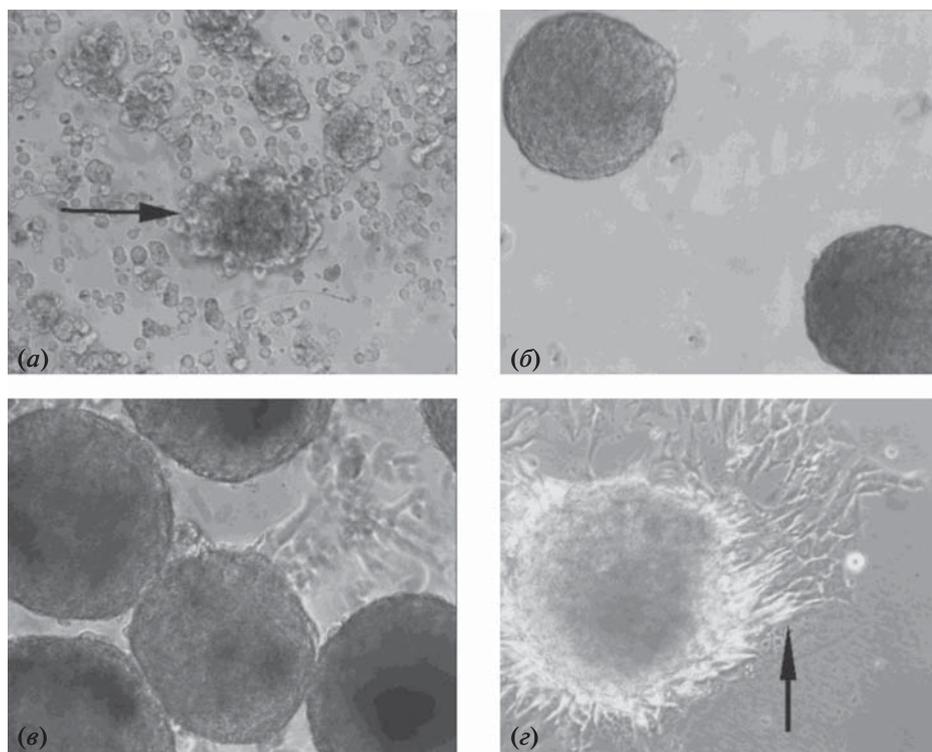


Рис. 3. Сфероиды, сформированные из первичной культуры фибробластов человека, полученных из стромы предстательной железы, на разных этапах роста. Для формирования сфероидов использовали вариант 1 методики (см. “Эксперим. часть”). (а) – Клетки фибробластов человека через 24 ч после добавления поли-2,5-ДГБК (200 мкг/мл). Стрелкой отмечены рыхлые 3D-структуры, еще не прошедшие стадию компактизации; (б) – сфероиды фибробластов человека, растущие в присутствии 200 мкг/мл поли-2,5-ДГБК, через 72 ч после добавления полимеров в суспензию клеток; (в) – сфероиды фибробластов человека, инкубированные в течение 340 ч в неадгезивных флаконах, после удаления поли-2,5-ДГБК; (г) – сфероид фибробластов человека через 24 ч после удаления поли-2,5-ДГБК и переноса в культуральный флакон с адгезивным покрытием. Сфероид при культивировании на адгезивном покрытии прикрепляется к подложке, и клетки начинают мигрировать из 3D-структуры. Стрелкой отмечены мигрирующие клетки. Микрофотографии сделаны с использованием 20× увеличения.

DU145 [41], T24 [42], MDA-MB-231 [43], MCF7 [44] и BT474 [45].

Показано, что полученные с помощью поли-2,5-ДГБК сфероиды сохраняют характерную 3D-структуру и продолжают увеличиваться в размерах как в присутствии поли-2,5-ДГБК при культивировании в стандартной культуральной посуде (рис. 3б), так и после удаления полимеров и переноса сфероидов во флаконы с неадгезивным покрытием (рис. 3в). Таким образом, можно сделать вывод, что наличие в ростовой среде поли-2,5-ДГБК не только инициирует межклеточные взаимодействия, необходимые для роста клеток в 3D-культуре, но также предотвращает прикрепление сформированных сфероидов к поверхности культуральной посуды. Поскольку добавление новых клеток в процессе культивирования сфероидов не производили, можно сделать вывод о том, что увеличение размеров обусловлено делением клеток в составе сфероидов.

Сформированные сфероиды можно удерживать в неприкрепленном состоянии как минимум до 340 ч посредством их культивирования либо в присутствии поли-2,5-ДГБК, либо в отсутствие полимеров, но при этом необходимо использовать культуральную посуду с неадгезивной поверхностью.

Помимо наблюдений за увеличением размера сфероидов, что косвенно указывает на пролиферацию клеток в присутствии поли-2,5-ДГБК, была исследована способность сфероид-образующих клеток к миграции. Для этого сфероиды после удаления полимеров были помещены в стандартные культуральные флаконы с адгезивной поверхностью. Через 24 ч наблюдали прикрепление сфероидов к культуральной подложке и миграция клеток из состава сфероидов (рис. 3г). В ходе визуального наблюдения за расплыванием сфероидов было отмечено, что все мигрирующие из сфероидов клетки прикреплены к подложке (рис. 3г). Этот факт

косвенно свидетельствует об отсутствии клеточной гибели, поскольку, как характерно для всех использованных в данной работе клеточных культур, в случае их гибели происходит открепление клеток от культурального пластика и накопление в культуре “плавающих” мертвых клеток.

Несмотря на то, что описываемые нами процедуры после удаления поли-2,5-ДГБК включают использование культуральных емкостей с неадгезивной поверхностью, стоит отметить, что применение разработанной нами методики позволяет получить клеточные 3D-структуры и в случаях, когда клетки способны произвести прикрепление к неадгезивной поверхности. Например, на рис. 4а можно наблюдать, что только часть клеток линии LNCaP, посеянных во флаконы с неадгезивным покрытием, приступила к формированию сфероидов, в то время как большая часть популяции смогла произвести прикрепление ко дну флакона и начать рост в виде 2D-культуры. Также следует отметить, что в этих условиях сфероиды клеток LNCaP не образуют плотных 3D-структур. Однако за то же время обработка суспензии клеток поли-2,5-ДГБК индуцирует образование компактизированных сфероидов (рис. 4б), что указывает на преимущество разработанного нами метода перед ранее описанным с использованием неадгезивных покрытий.

В разработанной нами методике минимальная концентрация поли-2,5-ДГБК, необходимая для формирования сфероидов, составляет 200 мкг/мл. Однако клетки линии DU145 способны формировать сфероиды (по методике, описанной в варианте 1, см. “Эксперим. часть”) при концентрации поли-2,5-ДГБК 140 мкг/мл. Следует отметить, что данное исследование посвящено принципиальной возможности использования поли-2,5-ДГБК для индукции образования и дальнейшего роста сфероидов, однако концентрации соединения могут варьироваться в зависимости от типа клеток.

Использование полимеров 2,5-ДГБК для формирования 3D-структур из различных типов клеток. Для моделирования клеточных взаимодействий в составе опухолей или тканей используют так называемые “гетерологичные сфероиды”, сформированные различными типами клеток [46]. Для определения эффективности поли-2,5-ДГБК в формировании гетерологичных сфероидов первичные фибробласты стромы предстательной железы были окрашены прижизненным флуоресцентным красителем Vibrant Cell Tracer (Thermo Fisher Scientific, США) и смешаны с культурой эпителиальных опухолевых клеток простаты LNCaP (рис. 5а, 5б). Добавление к смешанным культурам поли-2,5-ДГБК привело к

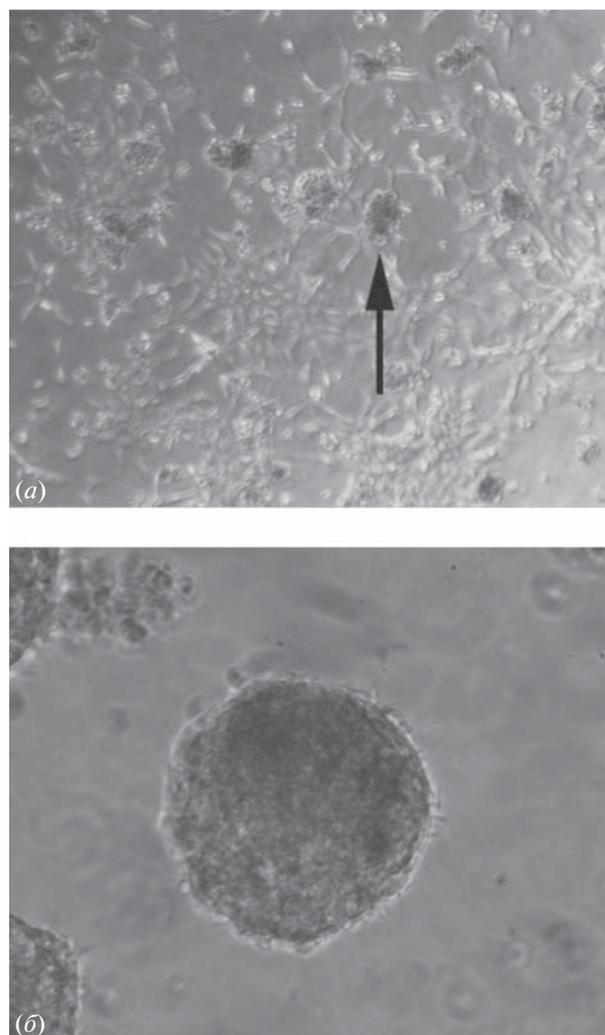


Рис. 4. Клетки LNCaP (клетки рака простаты), инкубированные в течение 96 ч в условиях, предотвращающих адгезию клеток. (а) – Клетки LNCaP, инкубированные в течение 96 ч в неадгезивных флаконах без добавления поли-2,5-ДГБК. Стрелкой отмечены некомпактизированные 3D-структуры. Микрофотография сделана с использованием 10× увеличения; (б) – сфероиды через 96 ч, сформированные с добавлением поли-2,5-ДГБК (200 мкг/мл) к суспензии клеток. Микрофотография сделана с использованием 20× увеличения.

формированию сфероидов (рис. 5в). При этом сформированные сфероиды содержали оба типа клеток: неокрашенные эпителиальные клетки LNCaP и испускающие зеленый свет фибробласты (рис. 5в, 5г, фибробласты отмечены стрелками). Различные типы клеток в составе сфероидов расположены не хаотично, а сгруппированы в четко различимые области. Разделение клеток в сфероиде можно наблюдать как на фазовом контрасте (рис. 5в), где области скопления фибробластов более темные по сравнению с клетками

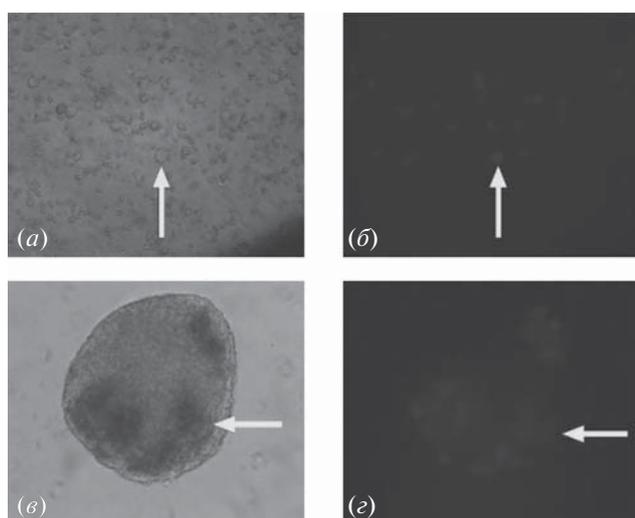


Рис. 5. Сфероиды, сформированные из смеси первичной культуры фибробластов человека, полученных из стромы предстательной железы, и клеток LNCaP, на разных этапах роста. Для формирования сфероидов использовали вариант 1 методики (см. “Эксперим. часть”). (а) – Смешанная суспензия клеток первичной культуры фибробластов человека, полученных из стромы предстательной железы, и клеток LNCaP с добавлением поли-2,5-ДГБК (200 мкг/мл). Клетки фибробластов (отмечены стрелкой) более крупные; (б) – флуоресценция клеток фибробластов (отмечены стрелкой) в смешанной клеточной суспензии, представленной на микрофотографии (а); (в) – сфероид, сформированный из фибробластов стромы и клеток LNCaP, после 340 ч культивирования во флаконах с неадгезивным покрытием в отсутствие поли-2,5-ДГБК; (г) – флуоресценция клеток фибробластов (отмечены стрелкой) в составе гетерологичного сфероидов. Центр сфероидов испускает зеленое свечение, т.к. состоит из окрашенных клеток первичной культуры фибробластов. Микрофотографии сделаны с использованием 20× увеличения.

LNCaP, так и при наблюдении флуоресценции – более темные области сфероидов, наблюдаемые в фазовом контрасте, обладают зеленой флуоресценцией (рис. 5г). Показано, что первоначально равномерное распределение клеток стромы (более крупные и окрашенные зеленым флуоресцентным красителем) и неокрашенных клеток LNCaP в смешанной культуре, через 48 ч культивирования в присутствии поли-2,5-ДГБК сменяется разделением клеток на флуоресцентную сердцевину и неокрашенную оболочку (рис. 5г), что может свидетельствовать о произошедшей перегруппировке клеток по их типу в составе сфероидов. Учитывая, что флуоресценция обеспечивается фибробластами, можно предположить, что наблюдаемые окрашенные участки сформированы благодаря миграции и компартиментализации клеток при формировании сфероидов, а не в результате образования клеточного массива путем деле-

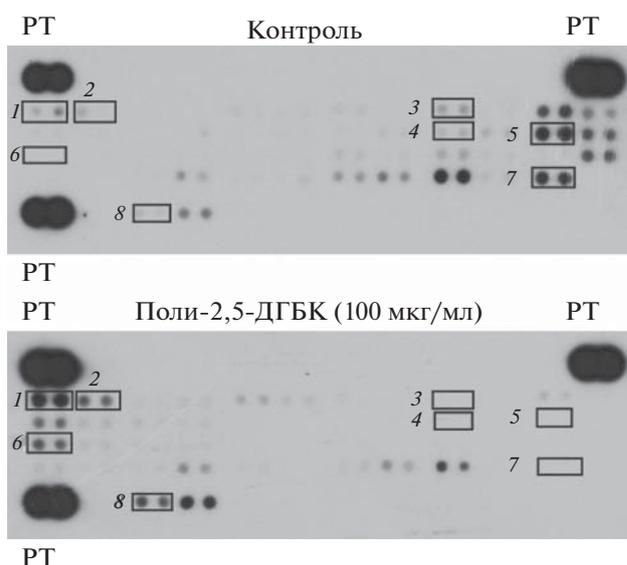


Рис. 6. Поли-2,5-ДГБК модулирует уровни фосфорилирования рецепторных тирозинкиназ в клетках LNCaP. Репрезентативное изображение мембран для фосфопротеомного анализа с антителами, иммобилизованными на мембране и специфичными к определенным клеточным рецепторам, представлены в двух экземплярах. Интенсивность каждого сигнала соответствует уровню фосфорилирования различных рецепторов в клетках LNCaP, инкубированных в присутствии 100 мкг/мл (нижняя панель) или в отсутствие (верхняя панель) поли-2,5-ДГБК. РТ – референсные точки; 1 – EGFR (EGFR) (здесь и далее в скобках указано семейство рецепторов, к которому относится белок); 2 – ErbB2 (EGFR); 3 – InsulinR (InsulinR); 4 – c-Ret (Ret); 5 – ROR2 (ROR); 6 – Tie-2 (Tie); 7 – EphA10 (EphR); 8 – EphB3 (EphR).

ния клеток, т.к. в противном случае наблюдалось бы значительное ослабление интенсивности зеленого свечения. Также следует отметить, что 48 ч, прошедшие с момента начала формирования сфероидов под воздействием поли-2,5-ДГБК, – это недостаточный временной промежуток для создания группы клеток наблюдаемого размера вследствие деления исходных фибробластов. Таким образом, показано, что поли-2,5-ДГБК можно использовать для получения сфероидов, состоящих из различных типов клеток, в частности для изучения клеточных взаимодействий между фибробластами стромы и эпителиальными клетками в моделировании опухолей предстательной железы.

В основе инициируемого поли-2,5-ДГБК формирования сфероидов лежит реорганизация активности тирозинкиназных рецепторов. С целью определения молекулярных мишеней, воздействие на которые поли-2,5-ДГБК может приводить к формированию 3D-структур, мы исследовали изменение активности тирозинкиназных рецепторов в прикрепленной культуре клеток LNCaP, ин-

кубированных при концентрации поли-2,5-ДГБК, которая еще не приводит к формированию сфероидов, но может индуцировать изменения в сигнальных путях клетки. В качестве объекта исследования была выбрана 2D-культура по той причине, что существование клеток в 3D-культуре само по себе приводит к изменению гомеостаза [47]. Клетки культивировали в присутствии 100 мкг/мл поли-2,5-ДГБК в течение 24 ч, поскольку было установлено, что эти условия еще не вызывают переход прикрепленной культуры в 3D-форму. Результаты фосфопротеомного анализа, представленные на рис. 6, указывают на повышение уровня фосфорилирования следующих рецепторов: EGFR, Tie-2, ErbB2 и EphB3, что косвенно указывает на их активацию. Также можно наблюдать снижение уровня фосфорилирования и, следовательно, ингибирование функциональной активности рецепторов Alk, DDR1, Insulin R, c-Ret, EphA1, DDR2, Ax1, ROR2, EphA10, Dtk, Tie-1 и EphA4.

Одни из наиболее примечательных рецепторов, активность которых может регулировать рост клеток в 3D-культуре, – это EGFR и инсулиновый рецептор (Insulin R). Было показано, что активность EGFR необходима для образования непрерывных кольцевых апикальных соединений, содержащих эпителиальный кадгерин (E-кадгерин [48]) что приводит к уплотнению межклеточных контактов. Так, сверхэкспрессия EGFR в клетках MCF7 трансформирует адгезивную клеточную 2D-культуру в 3D-культуру [49]. Активация Tie-2 увеличивает плотность межклеточных взаимодействий при наличии контактов клетки с другими клетками [50, 51]. Высокая активность ErbB2 (HER2) сопряжена со снижением экспрессии фокальных адгезионных белков, таких как паксиллин, фокальная адгезионная киназа и интегрин. Следовательно, стимуляция ErbB2 под воздействием поли-2,5-ДГБК может приводить к ингибированию данных белков и общему снижению способности клетки к прикреплению [52]. Рецептор EphB3 в активной форме ингибирует опосредованную интегрином адгезию клеток и индуцирует реорганизацию актинового цитоскелета и перераспределение E-кадгерина [53], что также приводит к уменьшению способности клеток прикрепляться к подложке.

Эти процессы активации рецепторов под воздействием поли-2,5-ДГБК также коррелируют со снижением фосфорилирования и, следовательно, с ингибированием ряда тирозинкиназных рецепторов (рис. 6), таких как инсулиновый рецептор (Insulin R), рецепторы Ret и EphA10. Показано, что активность инсулинового рецептора необхо-

дима для экспрессии белков фокальной адгезии и паксиллина, которые регулируют способность клеток прикрепляться к культуральной подложке [54]. Ингибирование рецептора Ret снижает адгезию клеток, опосредованную функцией интегринов формировать комплексы, необходимые для узнавания лигандов межклеточного матрикса [55]. Инактивация рецепторов ROR2 и EphA10 сильно ингибирует клеточную адгезию [56, 57]. Поскольку сфероид-образующий эффект может быть обусловлен ослаблением прикрепления клеток к поверхности культуральной посуды (для предотвращения перехода суспензии в форму стандартной 2D-культуры) и усилением межклеточных взаимодействий, мы полагаем, что изменение активности этих клеточных рецепторов под воздействием поли-2,5-ДГБК приводит к изменению как способности роста в 2D-культуре (т.е. прикреплению к подложке), так и к усилению межклеточных контактов.

Известно, что рецепторные тирозинкиназы (RTK) реагируют на биохимические сигналы из окружающей среды, контролирующие поведение клеток в тканях. Координация их активности важна для морфогенеза и гомеостаза в зрелых тканях [58]. Поэтому дисрегуляция активности различных RTK, вызываемая поли-2,5 ДГБК, может приводить к изменениям в работе соответствующих сигнальных каскадов, находящихся под управлением данных рецепторов. Хотя определение конкретного механизма инициации и контроля перестройки клеток в 3D-структуру под воздействием поли-2,5-ДГБК затруднительно, мы предполагаем, что формирование сфероидов происходит в результате комплексного изменения активности вышеописанных рецепторов.

В ходе формирования сфероида происходит временное ингибирование киназы Akt1. Как упоминалось ранее, тирозинкиназные рецепторы имеют многочисленные нисходящие эффекторные цепочки. Поэтому возникла необходимость проверить, способна ли обработка поли-2,5-ДГБК, воздействуя на нисходящие эффекторы, приводить к долговременным изменениям клеточного гомеостаза. Известно, что рецепторы данной группы при нахождении в активном состоянии воздействуют на киназу Akt1 за счет нисходящих сигнальных каскадов. Наибольший интерес в данном случае представляют инсулиновый рецептор (Insulin R) и рецептор эфрина типа B3 (EphB3). Инсулиновый рецептор – вышестоящий активатор Akt1, сигнальный путь которого включает IRS (insulin receptor substrate, субстрат рецептора инсулина), PI3-K (class IA phosphatidylinositol 3-kinase, фосфатидилинозитол-3-киназа

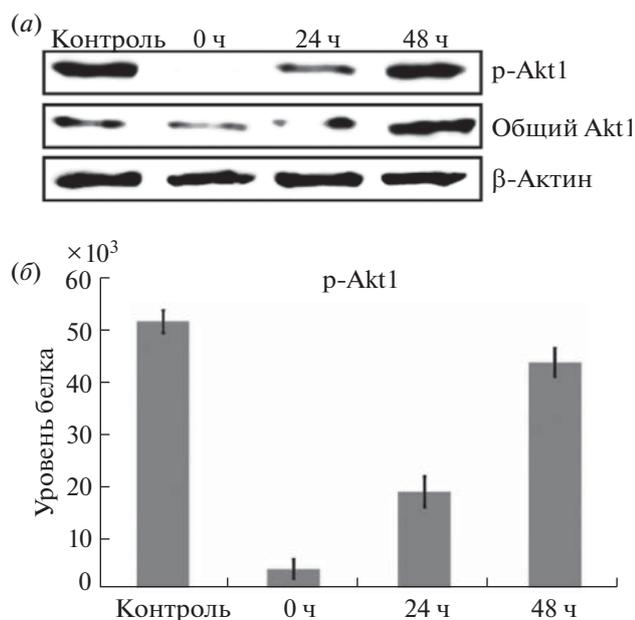


Рис. 7. Результаты вестерн-блот-анализа лизатов клеток LNCaP, растущих в монослое и не подвергнутых обработке поли-2,5-ДГБК (контроль), и сфероидов, сформированных в присутствии 200 мкг/мл поли-2,5-ДГБК. После формирования сфероидов полимеры удаляли, клетки инкубировали в ростовой среде во флаконах с неадгезивным покрытием в течение 0, 24 и 48 ч. (а) — Изменения в уровнях фосфорилирования киназы Akt1 (p-Akt1) и общего белка Akt1 в контрольных клетках 2D-культуры и сфероидов. Интенсивность каждого сигнала соответствует уровню фосфорилирования (для p-Akt1) или уровню общего белка в контроле и сфероидов. Актин (β -актин) использовали для нормализации концентрации белков в каждой пробе; (б) — денситометрический анализ сигналов, полученных вестерн-блот-анализом лизатов контроля и сфероидов, представлен в виде средней плотности пикселей, отражающей изменения уровня p-Akt1, нормализованного к уровню β -актина. Столбики ошибок представляют \pm стандартное отклонение от среднего.

класса IA), PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate, фосфатидилинозитол (4,5)-бисфосфат), PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, фосфатидилинозитол 3,4,5-трифосфат) и PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1, фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа-1) [59, 60]. ERHВ3 — ингибитор Akt1, образующий комплекс с RACK1 (receptor of activated protein C kinase 1, рецептор активированной киназы протеина C 1) и PP2A (protein phosphatase 2, протеинфосфатаза 2), активность которых приводит к дефосфорилированию Akt1 и, следовательно, к подавлению активности киназы [61]. Таким образом, мы предположили, что в сфероидов, полученных посредством обработки клеток LNCaP поли-2,5-ДГБК, ингибирование инсулинового рецептора (вследствие уменьше-

ния его фосфорилирования) и активации ERHВ3 (вследствие увеличения его фосфорилирования) может приводить к уменьшению фосфорилирования и активации киназы Akt1. Результаты вестерн-блот-анализа сфероидов клеток LNCaP показали 17-кратное снижение уровней как фосфорилированного Akt1 (Ser473), так и общего количества киназы по сравнению с необработанными клетками (рис. 7). Как было отмечено ранее, рост клеток в 3D-культуре продолжается и после удаления поли-2,5-ДГБК при переносе культур во флаконы с неадгезивным покрытием. Для того чтобы определить, является ли ингибирование Akt1 необходимым условием для существования клеток в форме 3D-культуры или подавление ее экспрессии значимо для инициации формирования сфероидов и носит временный эффект, мы исследовали экспрессию Akt1 в сфероидов после удаления поли-2,5-ДГБК. Данные, представленные на рис. 7, свидетельствуют о том, что после удаления индуктора происходит постепенное восстановление как фосфорилирования Akt1 (Ser473), так и количества общего белка до уровней, наблюдаемых в необработанных полимерах клеток. Следует отметить, что при этом сформированные сфероиды сохраняют свою форму и растут в виде 3D-культур. Следовательно, можно предположить, что ингибирование Akt1 — это результат воздействия поли-2,5-ДГБК на функциональную активность рецепторов инсулина и Eph3В, а не последствие роста клеток в 3D-культуре. Таким образом, показано, что поли-2,5-ДГБК снижает количество Akt1, однако экспрессия киназы восстанавливается до нормального уровня в течение 48 ч после удаления полимеров. Этот факт позволяет предположить, что изменения в фосфорилировании и, следовательно, в активности ряда клеточных рецепторов, наблюдаемые в результате воздействия поли-2,5-ДГБК, являются временными, и функция рецепторов нормализуется после удаления индуктора роста клеток в 3D-культурах.

Наиболее близкой из существующих технологий к созданной нами методике является способ получения сфероидов с использованием производных RGD-пептида (аминокислотная последовательность Arg-Gly-Asp, узнаваемая интегринами). В данной методике производные RGD-пептида (например, циклический пептид Arg-GlyAsp-D-Phe-Lys (цикло-RGDfK) или циклоRGDfK, модифицированный 4-карбокситил-трифенилфосфонийбромидом (цикло-RGDfK (TRP)) добавляют в суспензию клеток, культивируемых в обычной культуральной посуде, затем в течение нескольких дней образуются сфероиды в результате самоагрегации клеток [62]. К

недостаткам метода относится факт наличия у растворимых низкомолекулярных RGD-содержащих пептидов выраженной способности индуцировать апоптоз [63], что может вносить искажения в результаты тестирования противоопухолевых препаратов с целью определения их цитотоксичности. Кроме того, известно, что лиганды интегринов, такие как RGD-пептид, используются как эффективные противоопухолевые препараты [64–66]. Следовательно, биологическая активность RGD-пептида может существенно искажать результаты тестирования фармакологических препаратов при использовании сфероидов, полученных по данному методу.

В настоящей работе мы показали, что сфероиды, полученные в результате воздействия поли-2,5-ДГБК, восстанавливают экспрессию Akt1 через 48 ч после удаления соединения, и вероятно, что снижение уровня Akt1 в присутствии индуктора связано с ингибированием функции вышестоящих тирозинкиназных рецепторов. Мы можем предположить, что изменения в активности рецепторов, приводящие к формированию сфероидов, происходят только в присутствии полимера и после удаления поли-2,5-ДГБК гомеостаз клеток восстанавливается до нормального уровня. Следовательно, полученные с использованием нашей методики сфероиды можно применять для скрининга биологической активности различных соединений или фармакологических препаратов через 48 ч после удаления поли-2,5-ДГБК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез поли-2,5-ДГБК. Синтез полимеров проводили окислением 2,5-ДГБК (Sigma-Aldrich, США) под действием лакказы, выделенной из гриба *Trametes versicolor*, как это описано в работе Lisov et al. [35]. Реакцию проводили в 20 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5.0. Концентрация 2,5-ДГБК составляла 20 мМ, а лакказы – 10 ед./мл. Реакцию проводили при 30°C и перемешивании (200 об/мин) в течение 15 ч. Через 15 ч реакцию останавливали путем нагревания реакционной смеси на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Далее осадок удаляли из реакционной смеси центрифугированием, супернатант диализовали против дистиллированной воды (пропускная способность мембраны – 10 кДа). После диализа препарат высушивали в роторном вакуумном испарителе при 40°C, взвешивали для определения количества вещества и растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) до концентрации 1 мг/мл. Для работы с культурами клеток раствор поли-2,5-ДГБК стерилизовали посредством фильтрования через

мембрану с диаметром пор 0.22 мкм и использовали для добавления с ростовую среду в указанных концентрациях. Гель-фильтрацию проводили на колонке HiLoad 26/60 Superdex 200 (Sigma-Aldrich, США), подвижная фаза – 20 мМ ацетатный буфер (pH 5.0), содержащий 15 М NaCl, скорость элюции 1 мл/мин.

Антитела. В качестве первичных антител для иммуноблоттинга использовали моноклональные антитела мыши (анти-AKT1 (Santa Cruz Biotechnology, США) и анти-β-актин, конъюгированные с пероксидазой (Sigma, Германия)) и антитела кролика (анти-фосфо-AKT1 (S473) (D9E) (Cell Signaling Technology, США)). В качестве вторичных антител для визуализации белка в вестерн-блот-анализе использовали конъюгированные с пероксидазой антитела против иммуноглобулинов мыши (H&L, goat) и кролика (H&L, goat) (Rockland, США).

Культуры клеток. Клетки первичной культуры фибробластов человека (выделенной из хирургического материала тканей предстательной железы) и ММСК культивировали в среде DMEM/F12. Клетки линий рака предстательной железы (LNCaP, DU145, PC3) и рака мочевого пузыря (T24) культивировали в среде RPMI 1640. Клетки линий рака молочной железы (MCF7, MDA-MB-231, BT474 и MDA-MB-231) культивировали в среде DMEM. Для культивирования использовали ростовые среды с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), стрептомицина, пенициллина (50 мкг/мл) и L-глутамина (ПанЭко, Россия) Культивирование проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Формирование сфероидов. Способ 1: после достижения клетками 90% монослоя (3 × 10⁶ клеток) ростовую среду удаляли, клетки открепляли от подложки обработкой раствором 0.05%-ного трипсина с ЭДТА (ПанЭко, Россия). Клетки ресуспендировали в соответствующей для каждой клеточной линии ростовой среде, центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 4 мл ростовой среды, переносили в 6-см чашку Петри (Corning, США) и добавляли раствор поли-2,5-ДГБК до конечной концентрации 200 мкг/мл. После этого клетки инкубировали в течение 72 ч в CO₂-инкубаторе MCO-19AIC(UV) (Sanyo, Япония). Среду со сформированными сфероидами переносили в 15-мл пробирку типа Falcon (Corning, США) и отстаивали 15 мин для осаждения сфероидов. Супернатант удаляли, добавляли 10 мл ростовой среды и перемешивали сфероиды плавным покачиванием вручную. Процедуру смены среды по-

вторяли суммарно 3 раза для полного удаления поли-2,5-ДГБК. Затем сфероиды в 6.5 мл ростовой среды переносили во флаконы T25 с неадгезивным покрытием (SPL LIFESCIENCES, Республика Корея) и использовали в дальнейших исследованиях.

Способ 2: по достижению клетками 100% моно слоя ростовую среду удаляли, клетки промывали PBS. После удаления PBS на клетки наносили 2 мл раствора поли-2,5-ДГБК с концентрацией 1 мг/мл, после чего инкубировали 5 мин в CO₂-инкубаторе при 37°C. Далее клетки механически отделяли от поверхности чашки Петри при помощи скребка и несколько раз ресуспендировали посредством 1-мл пипетки-дозатора, не допуская полного разделения клеточных агрегатов на отдельные клетки. К раствору поли-2,5-ДГБК добавляли 8 мл ростовой среды (конечная концентрация поли-2,5-ДГБК после разведения – 250 мкг/мл) и инкубировали 48 ч в CO₂-инкубаторе (5% CO₂) при 37°C. Среду со сформированными сфероидами переносили в пробирку и отстаивали 15 мин для осаждения сфероидов. Процедуру полного удаления поли-2,5-ДГБК проводили, как описано выше. Затем сфероиды ресуспендировали в 6.5 мл ростовой среды и переносили во флаконы T25 с неадгезивным покрытием (SPL LIFESCIENCES, Республика Корея), культивировали до 340 ч.

Способ 3: заранее подготавливали 96-луночные культуральные планшеты для придания им низкоадгезивных свойств (Greiner Bio-One GmbH, Германия): в стерильных условиях в каждую лунку добавляли 200 мкл стерильного минерального масла (MP Biomedicals, Франция) и оставляли на 1 ч. После этого минеральное масло удаляли с максимально возможной полнотой. Далее планшет повторно стерилизовали облучением УФ-светом в течение 1 ч в ламинарном шкафу. Клетки линии LNCaP (рак предстательной железы) открепляли от подложки, как это описано выше в способе 1. После подсчета клеток суспензию клеток разбавляли ростовой средой до достижения концентрации 1 клетка в 100 мкл среды и помещали в подготовленные культуральные планшеты (100 мкл на лунку), т.е. большинство лунок 96-луночного планшета содержали 1 клетку. Далее клетки инкубировали в течение 120 ч в CO₂-инкубаторе для прикрепления клеток к подложке и формирования колонии-клона. После инкубации ростовую среду удаляли и в каждую лунку добавляли 100 мкл ростовой среды, содержащей поли-2,5-ДГБК (200 мкг/мл). После замены среды планшет несильно ударяли сбоку несколько раз, в

результате чего колония клеток отделялась от подложки без разделения на отдельные клетки. Далее клетки инкубировали в течение 48 ч в CO₂-инкубаторе. Затем сфероиды отмывали от поли-2,5-ДГБК, как описано выше, эту процедуру можно проводить как в лунках 96-луночного планшета, содержащих индивидуальные клоны клеток, так и перенести полученные клоны в культуральные планшеты любого формата (24- или 12-луночные) с неадгезивным покрытием для дальнейшего роста сфероидов в условиях эксперимента.

Формирование гетерологичных сфероидов. Фибробласты стромы предстательной железы и клетки LNCaP культивировали и трипсинизировали, как это описано в способе 1 получения сфероидов. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин, супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в 7.5 мл PBS и далее центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. Процедуру центрифугирования повторяли 2 раза для удаления остатков ростовой среды. Затем фибробласты стромы предстательной железы ресуспендировали в 1 мл PBS, содержащего краситель для прижизненного окрашивания Vibrant Cell Tracer Kit (25 мМ; Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 15 мин в CO₂-инкубаторе, после чего центрифугировали 5 мин при 1200 об/мин. Процедуру центрифугирования повторяли 2 раза для удаления остатков красителя с последующим ресуспендированием в ростовой среде и подсчетом клеток. Суспензию окрашенных клеток стромы предстательной железы смешивали с суспензией клеток LNCaP в соотношении 1 : 1 по количеству клеток (5×10^6 кл./мл), полученную суспензию переносили в лунку 24-луночного планшета в среде объемом 500 мкл. В суспензию клеток добавляли поли-2,5-ДГБК до концентрации 200 мкг/мл и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч. Среду со сформированными сфероидами переносили в пробирку и оставляли на 15 мин для осаждения сфероидов. Супернатант удаляли, добавляли ростовую среду и перемешивали сфероиды плавным покачиванием. Процедуру смены среды повторяли 3 раза для полного удаления поли-2,5-ДГБК. Затем сфероиды в ростовой среде переносили во флаконы T25 с неадгезивным покрытием (SPL LIFESCIENCES, Республика Корея) для дальнейшего наблюдения. Флуоресценцию окрашенных клеток стромы наблюдали при помощи инвертированного микроскопа Микромед И (ЛОМО, Россия).

Проверка стабильности и жизнеспособности сфероидов. Сфероиды, сформированные по вышеописанным методикам, после удаления поли-

2,5-ДГБК инкубировали в течение двух недель в CO₂-инкубаторе во флаконах T25 с неадгезивным покрытием с заменой среды каждые три дня на свежую. По истечении данного срока сфероиды сохраняли характерную 3D-структуру, активно росли, увеличиваясь в размерах. После 340 ч инкубации во флаконах T25 с неадгезивной поверхностью ростовую среду со сфероидами переносили в 6-см чашку Петри для наблюдения за прикреплением сфероидов к подложке и миграцией клеток из сфероида на поверхность чашки.

Анализ фосфорилирования рецепторных тирозинкиназ. Чтобы определить, приводит ли обработка поли-2,5-ДГБК к значительным изменениям клеточного гомеостаза, мы использовали Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array Kit (R&D Systems, США) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки LNCaP, посеянные в количестве 2×10^5 клеток на 6-см чашку Петри, через 24 ч обрабатывали поли-2,5-ДГБК (100 мкг/мл) или контролем-носителем (среда с добавлением PBS) в течение 24 ч. После обработки клетки промывали 3 раза охлажденным PBS, лизировали с использованием поставляемого буфера для лизиса и определяли концентрацию белков в каждом клеточном лизате (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные лизаты (300 мкг белка в 1 мл) наносили на мембраны, содержащие иммобилизованные антитела, специфичные к определенным клеточным рецепторам, и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем мембраны инкубировали с антителами против фосфорилированного тирозина, конъюгированными со стрептавидином-HRP для получения хемилюминесцентного сигнала после добавления реагента-субстрата. Уровень активности рецепторных киназ, связавшихся со специфическими антителами, определяли по интенсивности сигнала, отражающего количество фосфорилированного тирозина для каждой киназы, представленной в наборе. Для количественной оценки уровня фосфорилирования была проведена денситометрия интенсивности полученных сигналов с использованием программного обеспечения Studio Image Lite версии 5.2 (LI-COR Biosciences, США).

Вестерн-блот-анализ. Полученные, как описано в примере 2, сфероиды переносили во флаконы с неадгезивным покрытием (с заменой культуральной среды на свежую без добавления поли-2,5-ДГБК) и культивировали в течение 48 ч с отбором проб через 0, 24 и 48 ч. В качестве контроля использовали клетки LNCaP, выращенные до стадии монослоя в 2D-культуре в отсутствие поли-2,5-ДГБК. Клетки промывали холодным PBS

и лизировали в 200 мкл буфера для лизиса (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA), содержащего ингибиторы (Protease Inhibitor Cocktail Set V; Calbiochem, США) и ингибиторы фосфатаз (10 mM β -глицерофосфат, 10 mM ортованадат натрия, 10 mM пиррофосфат натрия и 5 mM флуорит натрия). Концентрацию белка измеряли с использованием набора для анализа белка Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточные лизаты (30 мкг тотального белка) разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ, затем белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio-Rad Laboratories, США) и инкубировали с первичными антителами (разведение 1 : 1000 в буфере TBST, содержащем 5% BSA). После промывки мембраны инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (разведение 1 : 5000 в буфере TBST, содержащем 5% обезжиренного молока). Визуализацию белка обеспечивали добавлением пикохемиллюминесцентного субстрата (Thermo Fisher Scientific, США) с последующей детекцией хемилюминесцентных сигналов с помощью станции визуализации Fusion Fx (Vilber Lourmat, Франция). Относительные уровни экспрессии белка определяли денситометрией сигналов с использованием программного обеспечения Studio Image Lite (версия 5.2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан новый метод быстрого получения 3D-культур клеток. Методы формирования сфероидов с применением поли-2,5-ДГБК, предложенные в настоящем исследовании (патент RU 2742689 C1, 2021) [67], имеют много преимуществ в лабораторном использовании и представляют собой простую и недорогую процедуру, которая вызывает минимальное вмешательство в жизнедеятельность клеток для их организации в 3D-структуру. Таким образом, новый метод 3D-культивирования может быть применен для исследований солидных опухолей человека или других экспериментальных целей.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Egeblad M., Nakazone E.S., Werb Z.* // *Dev. Cell.* 2010. V. 18. P. 884–901.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>
2. *Mulholland T., McAllister M., Patek S., Flint D., Underwood M., Sim A., Edwards J., Zagnoni M.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 14672.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33055-0>
3. *Lin R.Z., Chang H.Y.* // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. P. 1172–1184.
<https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
4. *Harrison R.G., Greenman M.J., Mall P., Jackson C.M.* // *Anat. Rec.* 1907. V. 1. P. 116–128.
<https://doi.org/10.1002/ar.1092340113>
5. *Breslin S., O'Driscoll L.* // *Drug Dis. Today.* 2013. V. 18. P. 240–249.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>
6. *Desoize B., Jardillier J.* // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000. V. 36. P. 193–207.
7. *Dardousis K., Voolstra C., Roengvoraphoj M., Sekandarzad A., Mesghenna S., Winkler J., Ko Y., Hescheler J., Sachinidis A.* // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. P. 94–102.
<https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300003>
8. *Ghosh S., Joshi M.B., Ivanov D., Feder-Mengus C., Spagnoli G.C., Martin I., Erne P., Resink T.J.* // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 4523–4528.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.08.038>
9. *Feder-Mengus C., Ghosh S., Weber W.P., Wyler S., Zajac P., Terracciano L., Oertli D., Heberer M., Martin I., Spagnoli G., Reschner A.* // *Br. J. Cancer.* 2007. V. 96. P. 1072–1082.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603664>
10. *Durand R.E.* // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990. V. 26. P. 198–204.
<https://doi.org/10.1007/bf02897199>
11. *Bartholoma P., Reiningger-Mack I.A., Zhang Z., Thielecke H., Robitzki A.* // *J. Biomol. Screen.* 2005. V. 10. P. 705–714.
<https://doi.org/10.1177/1087057105277841>
12. *Friedrich J., Seidel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A.* // *Nature Protoc.* 2009. V. 4. P. 309–324.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
13. *Kunz-Schughart L.A., Freyer J.P., Hofstaedter F., Ebner R.* // *J. Biomol. Screen.* 2004. V. 9. P. 273–285.
<https://doi.org/10.1177/1087057104265040>
14. *Dubessy C., Merlin J.M., Marchal C., Guillemain F.* // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000. V. 36. P. 179–192.
[https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(00\)00085-8](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(00)00085-8)
15. *Lin R.Z., Chu W.C., Chiang C.C., Lai C.H., Chang H.Y.* // *Tissue Eng. Part. C Methods.* 2008. V. 14. P. 197–205.
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0061>
16. *Steer D.L., Nigam S.K.* // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2004. V. 1. P. 1–7.
17. *Ivascu A., Kubbies M.* // *J. Biomol. Screen.* 2006. V. 11. P. 922–932.
<https://doi.org/10.1177/1087057106292763>
18. *Friedrich J., Seidel C., Ebner R., Kunz-Schughart L.A.* // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. P. 309–324.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>
19. *Klinder A., Markhoff J., Jonitz-Heincke A., Sterna P., Salamon A., Bader R.* // *Exp. Ther. Med.* 2019. V. 17. P. 2004–2012.
<https://doi.org/10.3892/etm.2019.7204>
20. *Keller G.M.* // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995. V. 7. P. 862–869.
[https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80071-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80071-9)
21. *Kelm J.M., Timmins N.E., Brown C.J., Fussenegger M., Nielsen L.K.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 83. P. 173–180.
<https://doi.org/10.1002/bit.10655>
22. *Kurosawa H.* // *J. Biosci. Bioeng.* 2007. V. 3. P. 389–398.
<https://doi.org/10.1263/jbb.103.389>
23. *Timmins N.E., Nielsen L.K.* // *Methods Mol. Med.* 2007. V. 140. P. 141–151.
https://doi.org/10.1007/978-1-59745-443-8_8
24. *Kim J.B.* // *Semin. Cancer Biol.* 2005. V. 5. P. 365–377.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.002>
25. *Barrila J., Radtke A.L., Crabbé A., Sarker S.F., Herbst-Kralovetz M.M., Ott C.M., Nickerson C.A.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. P. 791–801.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2423>
26. *Lin R.Z., Chang H.Y.* // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. P. 1172–1184.
<https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
27. *Lü W.D., Zhang L., Wu C.L., Liu Z.G., Lei G.Y., Liu J., Gao W., Hu Y.R.* // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e103672.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103672>
28. *Hughes C.S., Postovit L.M., Lajoie G.A.* // *Proteomics.* 2010. V. 10. P. 1886–1890.
<https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>
29. *Porzionato A., Stocco E., Barbon S., Grandi F., Macchi V., De Caro R.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 4117.
<https://doi.org/10.3390/ijms19124117>
30. *Nath S., Devi G.R.* // *Pharmacol. Ther.* 2016. V. 163. P. 94–108.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>
31. *Sodunke T.R., Turner K.K., Caldwell S.A., McBride K.W., Reginato M.J., Noh H.M.* // *Biomaterials.* 2007. V. 28. P. 4006–4016.
32. *Zaki M.Y.W., Shetty S., Wilkinson A.L., Patten D.A., Oakley F., Reeves H.* // *J. Vis. Exp.* 2021. V. 175. P. e62868.
<https://doi.org/10.3791/62868>
33. *Sourla A., Doillon C., Koutsilieris M.* // *Anticancer Res.* 1996. V. 16. P. 2773–2780.
34. *Jiang T., Munguia-Lopez J.G., Flores-Torres S., Grant J., Vijayakumar S., De Leon-Rodriguez A., Kinsella M.J.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 4575.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04691-9>
35. *Lisov A., Vrublevskaya V., Lisova Z., Leontievsky A., Morenkov O.* // *Viruses.* 2015. V. 7. P. 5343–5360.
<https://doi.org/10.3390/v7102878>

36. Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., Yang L. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2014. V. 12. P. 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>
37. Lin R.Z., Chang H.Y. // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. P. 1172–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
38. Benien P., Swami A. // *Future Oncol.* 2014. V. 10. P. 1311–1327. <https://doi.org/10.2217/fon.13.274>
39. Archibald M., Pritchard T., Nehoff H., Rosengren R.J., Greish K., Taurin S. // *Int. J. Nanomed.* 2016. V. 11. P. 179–200. <https://doi.org/10.2147/IJN.S97286>
40. Roberts G.C., Morris P.G., Moss M.A., Maltby S.L., Palmer C.A., Nash C.E., Smart E., Holliday D.L., Speirs V. // *PLoS One.* 2016. V. 11. e0157004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157004>
41. Takir G.G., Debele-Butuner B., Korkmaz K.S. // *Proceedings.* 2018. V. 2. P. 1555. <https://doi.org/10.3390/proceedings2251555>
42. Kim C.J., Terado T., Tambe Y., Mukaisho K., Sugihara H., Kawachi A., Inoue H. // *Int. J. Oncol.* 2018. V. 52. P. 231–240. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4194>
43. Zhao L., Xiu J., Liu Y., Zhang T., Pan W., Zheng X., Zhang X. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 19717. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56241-0>
44. Froehlich K., Haeger J.D., Heger J., Pastuschek J., Photini S.M., Yan Y., Lupp A., Pfarrer C., Mrowka R., SchleuBner E., Markert U.R., Schmidt A. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2016. V. 21. P. 89–98. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2>
45. Rodríguez C.E., Reidel S.I., Bal de Kier Joffé E.D., Jasnis M.A., Fiszman G.L. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0137920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137920>
46. Djordjevic B., Lange C.S. // *Acta Oncol.* 2006. V. 45. P. 412–420. <https://doi.org/10.1080/02841860500520743>
47. Kim H., Phung Y., Ho M. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e39556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039556>
48. Betson M., Lozano E., Zhang J., Braga V.M. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 36962–36969. <https://doi.org/10.1074/jbc.m207358200>
49. Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 12937. <https://doi.org/10.3390/ijms222312937>
50. Kitajima D., Kasamatsu A., Nakashima D., Miyamoto I., Kimura Y., Endo-Sakamoto Y., Shiiba M., Tanzawa H., Uzawa K. // *Oncology Lett.* 2018. V. 15. P. 7237–7242. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8212>
51. Fukuhara S., Sako K., Noda K., Nagao K., Miura K., Mochizuki N. // *Exp. Mol. Med.* 2009. V. 41. P. 133–139. <https://doi.org/10.3858/emmm.2009.41.3.016>
52. Weinberg F., Han M.K.L., Dahmke I.N., Del Campo A., de Jonge N. // *PLoS One.* 2020. V. 15. P. e0234430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234430>
53. Singh A., Winterbottom E., Daar I.O. // *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2012. V. 17. P. 473–497. <https://doi.org/10.2741/3939>
54. Godoy-Parejo C., Deng C., Liu W., Chen G. // *Stem. Cells.* 2019. V. 37. P. 1030–1041. <https://doi.org/10.1002/stem.3026>
55. Cockburn J.G., Richardson D.S., Gujral T.S., Mulligan L.M. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010. V. 95. P. 342–346. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0771>
56. Henry C., Hacker N., Ford C. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. P. 112727–112738. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22559>
57. Shin W.S., Park M.K., Lee Y.H., Kim K.W., Lee H., Lee S.T. // *Cancer Sci.* 2020. V. 111. P. 3292–3302. <https://doi.org/10.1111/cas.14568>
58. Chiasson-MacKenzie C., McClatchey A.I. // *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* 2018. V. 10. P. a029215. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029215>
59. Kim Y.B., Nikoulina S.E., Ciaraldi T.P., Henry R.R., Kahn B.B. // *J. Clin. Invest.* 1999. V. 104. P. 733–741. <https://doi.org/10.1172/JCI16928>
60. Mackenzie R., Elliott B. // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2014. V. 7. P. 55–64. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S48260>
61. Li G., Ji X.D., Gao H., Zhao J.S., Xu J.F., Sun Z.J., Deng Y.Z., Shi S., Feng Y.X., Zhu Y.Q., Wang T., Li J.J., Xie D. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 667. <https://doi.org/10.1038/ncomms1675>
62. Akasov R., Gileva A., Zaytseva-Zotova D., Burov S., Chevalot I., Guedon E., Markvicheva E. // *Biotechnol. Lett.* 2017. V. 39. P. 45–53.
63. Buckley C.D., Pilling D., Henriquez N.V., Parsonage G., Threlfall K., Scheel-Toellner D., Simmons D.L., Akbar A.N., Lord J.M., Salmon M. // *Nature.* 1999. V. 397. P. 534–539. <https://doi.org/10.1038/17409>
64. Kang I.C., Kim D.S., Jang Y., Chung K.H. // *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 2000. V. 275. P. 169–173. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3130>
65. Ritchie C.K., Giordano A., Khalili K. // *J. Cell Physiol.* 2000. V. 184. P. 214–221. [https://doi.org/10.1002/1097-4652\(200008\)184:2%3C214::aid-jcp9%3E3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1097-4652(200008)184:2%3C214::aid-jcp9%3E3.0.co;2-z)
66. Anuradh, C., Kanno S., Hirano S. // *Cell Biol. Toxicol.* 2000. V. 16. P. 275–283. <https://doi.org/10.1023/a:1026758429238>
67. Рыццов Г.К., Лусов А.В., Земскова М.Ю. // Патент RU 2742689 C1, 2021.

Polymers of 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Induce Formation of Spheroids in Mammalian Cells

G. K. Rystsov*, #, A. V. Lisov*, and M. Yu. Zemskova*, #

#Phone: +7 (999) 963-15-47; +7 (929) 913-27-56; e-mail: gleb.8.ristsoff@gmail.com; mzemskova@ibpm.pushchino.ru

*Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, prosp. Nauki 5, Pushchino, 142290 Russia

Cells attached to a substrate and grown in two dimensions (2D) or suspended culture cannot accurately replicate intercellular interactions in tissues and organs. Spheroids, being three-dimensional (3D) formations, are more accurately reproduce the structure of organs or neoplasms. Spheroids compared to 2D cultures demonstrate an increased survival, corresponding morphology, and a hypoxic core, which is observed in native tumors in vivo. Tumor cell spheroids also represent models of the metastatic process. Therefore, spheroids are currently widely used for testing new anticancer drugs. However, obtaining and using 3D cultures can be associated with a number of difficulties, such as the need for expensive reagents and equipment, the low rate of formation of spheroids of the required size, and the occurrence of long-term changes in cell metabolism, which depend on the methods used to create spheroids. We have found that incubation of tumor and normal cells in the presence of polymers of 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA) that are nontoxic to cells can induce the formation of 3D structures. Based on this, a new method for the rapid production of 3D cultures is developed and this approach does not require the use of additional equipment, expensive reagents, and does not have a long-term effect on cell homeostasis. The spheroids obtained by this method represent models of three-dimensional structures and can be used for biological studies of intercellular interactions and detection of pharmaceutical products.

Keywords: 3D cultures, spheroids, pharmacological screening, cell cultures, lignin-like polymers, 2,5-dihydroxybenzoic acid polymers