

## Масштабируемая биофабрикация и морфологическая оценка тканевых сфероидов

А.А. Грядунова<sup>1,2</sup>, Е.А. Буланова<sup>1</sup>, Е.В. Кудан<sup>1</sup>, Ф.Д.А.С. Перейра<sup>1</sup>, Ю.Д. Хесуани<sup>1</sup>, В.А. Миронов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ЧУ «Лаборатория биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Обзор посвящен масштабируемой биофабрикации тканевых сфероидов единого размера и формы и оценке их морфологических и биологических свойств. Проведен сравнительный анализ существующих методов, позволяющий выбрать оптимальный протокол получения и характеристики тканевых сфероидов.

**Ключевые слова:** тканевые сфероиды, биофабрикация, биопечать, поиск новых лекарственных средств, морфологическая оценка

**Для корреспонденции:** Анна Александровна Грядунова. E-mail: agryadunova@bioprinting.ru.

**Для цитирования:** А.А. Грядунова, Е.А. Буланова, Е.В. Кудан, Ф.Д.А.С. Перейра, Ю.Д. Хесуани, В.А. Миронов. Масштабируемая биофабрикация и морфологическая оценка тканевых сфероидов. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(2): 12-20. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-12-20.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 01.04.2019. Статья принята в печать 04.06.2019

## Scalable biofabrication and morphology evaluation of tissue spheroids

А.А. Gryadunova<sup>1,2</sup>, Е.А. Bulanova<sup>1</sup>, Е.В. Koudan<sup>1</sup>, F.D.A.S. Pereira<sup>1</sup>, Yu.D. Khesuani<sup>1</sup>, V.A. Mironov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions» Moscow, Russia

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

The review focuses on techniques for scalable standardized tissue spheroids biofabrication, on tissue spheroids biological properties and the methods for its morphology evaluation. The comparative analysis of existing approaches provided here will guide to the optimal protocol for tissue spheroids fabrication and characterization.

**Key words:** tissue spheroids, biofabrication, bioprinting, drug discovery, morphology evaluation

**Corresponding author:** Anna A. Gryadunova. E-mail: agryadunova@bioprinting.ru.

**For citation:** A.A. Gryadunova, E.A. Bulanova, E.V. Koudan, F.D.A.S. Pereira, Yu.D. Khesuani, V.A. Mironov. Scalable biofabrication and morphology evaluation of tissue spheroids. Clin. exp. morphology (In Russ.). 2019; 8(2): 12-20. DOI: 10.31088/2226-5988-2019-30-2-12-20.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 01.04.2019. Accepted 04.06.2019

### 1. Методы биофабрикации тканевых сфероидов

Тканевые сфероиды представляют собой трехмерные плотно упакованные агрегаты клеток шарообразной формы [1]. Плотная упаковка клеток, трехмерная структура и способность к слиянию при непосредственном контакте друг с другом позволяют использовать сфероиды в качестве строительных блоков для биопечати конструкторов человеческих органов и тканей [2]. Благодаря этому сфероиды находят применение в тканевой инженерии при изготовлении функциональных тканей и конструкторов органов, пригодных для трансплантации [3]. В настоящее время такие тка-

неинженерные структуры все чаще используют для тестирования новых лекарственных средств как более адекватную и информативную модель в сравнении с классической двумерной. Следовательно, необходимы эффективные методы биофабрикации, позволяющие одновременно получать большое количество тканевых сфероидов единого размера и формы.

Формирование тканевых сфероидов происходит путем самосборки различных типов клеток в трехмерные шарообразные структуры. Тканевые сфероиды могут быть получены из клеточной суспензии, содержащей первичные или иммортализованные клетки [4]. Возможно также использование линий раковых клеток или

опухолевых клеток, выделенных непосредственно из организма пациента, или биофабрикация тканевых сфероидов из стволовых клеток с их последующей дифференцировкой [5, 6]. Иной принцип формирования тканевых сфероидов предполагает выделение небольших фрагментов эмбриональной ткани с последующим их округлением [7]. Данный метод является технически более сложным, так как требует осторожного обращения с эмбриональной тканью, которая крайне чувствительна к факторам внешней среды (рис. 1). В некоторых случаях может также использоваться ткань взрослых организмов [8].

Широко используемыми методами биофабрикации тканевых сфероидов являются а) культивирование во вращающейся колбе [9], б) культивирование с постоянным перемешиванием [10], в) метод висячей капли [11], г) использование агарозных форм [12], д) использование низкоадгезивных коммерческих многолуночных планшетов [13, 14], е) фабрикация сфероидов с применением акустических или магнитных полей [15, 16] и т.д. Несмотря на многообразие существующих методов, в настоящее время только некоторые из них позволяют формировать тканевые сфероиды в большом количестве, необходимом и достаточном для использования в биопечати и скрининге при разработке новых лекарственных средств. Большое количество тканевых сфероидов необходимо для полноценного и всестороннего анализа их морфологического статуса. Значительное число сфероидов также позволяет производить тканевые и органные конструкторы крупных размеров. Еще одним чрезвычайно важным требованием при использовании тканевых сфероидов в указанных областях является стандартизация, то есть возможность биофабрикации сфероидов единого размера и формы. Это особенно важно при роботизированном получении трехмерных конструкторов согласно цифровой модели. К масштабируемым методам биофабрикации сфероидов единого размера и формы относятся а) метод висячей капли, б) использование агарозных форм в) получение сфероидов в низкоадгезивных коммерческих многолуночных планшетах (табл. 1).

Классический метод висячей капли предполагает равномерное распределение суспензии клеток в подвешенных каплях питательной среды, где клетки образуют плотные трехмерные структуры под действием силы тяжести [17, 18]. В висячих каплях сложно и трудозатратно производить смену питательной среды и добавлять тестируемые соединения к тканевым сфероидам, поэтому данный метод не подходит для долговременного культивирования и тестирования лекарственных средств. Более того, часто наблюдается образование так называемых сателлитов – округлых агрегатов небольшого размера, располагающихся рядом с основным тканевым сфероидом. Тем не менее современные планшеты позволяют автоматизировать метод и значительно упрощают последующий анализ тканевых сфероидов [19].

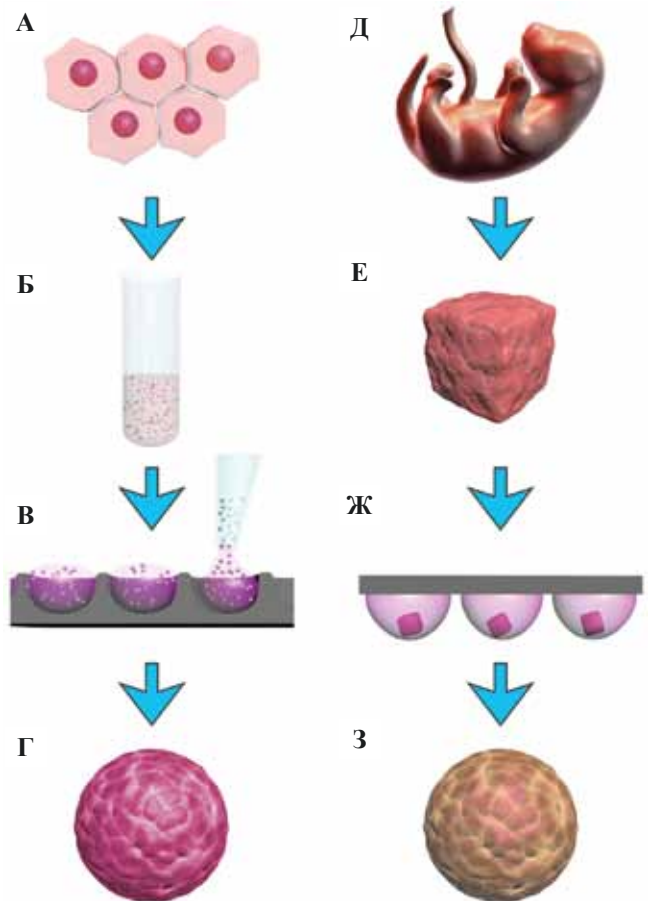


Рис. 1. Методы получения тканевых сфероидов:

1. из клеточной суспензии: А – клетки культивируют до достижения 90% конфлюентности; Б – после снятия с культуральной фляжки клетки суспендируют в питательной среде; В – клеточную суспензию помещают в ячейки низкоадгезивного планшета; Г – через 24 часа происходит формирование тканевого сфероида.
2. из выделенных фрагментов тканей: Д – источником получения сфероидов служит эмбрион животного; Е – из эмбриона выделяют желаемую ткань; Ж – полученные эмбриональные экспланты помещают в висячие капли в питательной среде; З – через 24 часа округлившись эксплант формирует тканевый сфероид

Fig. 1. Methods for tissue spheroids production:

1. single cell suspension: А – cells are cultured until 90% confluency; Б – after detaching from the flask surface cells are resuspended in cell culture medium; В – cell suspension is dispensed to the wells of low-adhesive microplate; Г – after 24 hours, tissue spheroid is formed.
2. tissue fragments: Д – the source of tissue spheroids is the animal embryo; Е – the tissue is isolated from the embryo; Ж – embryonic explants are placed in the hanging drop culture o/n for rounding; З – the resulted tissue spheroid is formed after 24 hours

**Сравнительный анализ масштабируемых методов биофабрикации тканевых сфероидов единого размера и формы**  
**The comparative analysis of the scalable methods for biofabrication of tissue spheroids of the same size and shape**

Метод	Преимущества	Недостатки	Ссылки
Висячая капля	Невысокая стоимость Простота извлечения и переноса сфероидов Возможность автоматизации последующего анализа	Высокие трудовые и временные затраты Сложность в смене среды и добавления тестируемых соединений Образование сателлитов	[1], [9], [10], [14], [24]
Низкоадгезивные планшеты	Однородный диаметр стероидов Простая процедура смены среды Простота анализа сфероидов Возможность автоматизации	Высокая стоимость Однократное использование	[11], [12], [17], [25]
Агарозные формы	Невысокая стоимость Доступность сырья Возможность одновременного получения большого количества сфероидов Многokrатное использование силиконовых штампов	Менее однородные диаметр сфероидов Сложность в извлечении сфероидов Неудобство последующего анализа Образование сателлитов	[3], [7], [16], [17], [21]

При применении низкоадгезивных планшетов клетки опускаются на дно ячейки под воздействием силы тяжести. Низкоадгезивная поверхность и округлая форма ячейки препятствуют взаимодействию клеток с субстратом и расплыванию на дне, что способствует установлению межклеточных контактов и слиянию клеток между собой с образованием сфероида, размер которого зависит от начальной концентрации клеток в суспензии. Низкоадгезивные планшеты позволяют получать сфероиды единого размера и формы в значительных количествах, данный метод может быть автоматизирован и позволяет легко производить смену питательной среды и добавление тестируемых соединений. К недостаткам метода можно отнести высокую стоимость и невозможность многократного использования коммерческих низкоадгезивных планшетов.

Формирование тканевых сфероидов в агарозных формах также основано на неадгезивности материала. Горячий раствор агарозы заливается в силиконовый штамп, охлаждается и застывает. Извлеченный обратный слепок с ячейками из агарозы – агарозная форма – заполняется клеточной суспензией, клетки опускаются на дно формы под воздействием силы тяжести, устанавливаются межклеточные контакты и формируются тканевые сфероиды в течение 24 часов [20]. Применение агарозных форм делает возможным получение большого количества сфероидов, при этом силиконовый штамп можно использовать многократно. И тем не менее по сравнению с низкоадгезивными планшетами данный метод проигрывает в однородности диаметров образующихся сфероидов. Использование агарозных форм в некоторых случаях не исключает образование сателлитов.

При использовании тканевых сфероидов в области трехмерной биопечати перед исследователями

встает вопрос, какой метод предпочтительнее использовать для решения конкретных задач исследования. Метод висячей капли хорошо подойдет в тех случаях, когда необходимо приготовить небольшое количество сфероидов с заданным диаметром. Если нужно получить большое количество сфероидов с минимальными трудовыми и денежными затратами, рекомендуется использование агарозных форм. В тех же случаях, когда требуется достижение максимального единообразия диаметров, для получения сфероидов рекомендуется использовать низкоадгезивные планшеты. Они также хорошо зарекомендовали себя при тестировании новых лекарственных препаратов, так как позволяют наблюдать за изменениями, происходящими с каждым отдельным сфероидом, что является критичным требованием для построения концентрационных кривых.

## 2. Методы визуализации и морфологической оценки тканевых сфероидов

Морфологическая оценка тканевых сфероидов с применением комплекса современных методов анализа позволяет подтвердить нормальное функционирование клеток внутри сфероида, вовремя отследить неподходящие условия культивирования и модифицировать их. Существующие методы можно условно разделить на две группы: высокопроизводительные методы с быстрой обработкой большого объема данных (англ. high-throughput) и низкопроизводительные точные методы глубокого анализа (англ. high-content). К первой группе методов можно отнести фазово-контрастную микроскопию и количественную оценку жизнеспособности клеток в сфероидах. Ко второй группе относятся конфокальная и двухфотонная микроскопия, сканирующая и трансмиссионная



электронная микроскопия, гистохимические и иммуногистохимические исследования.

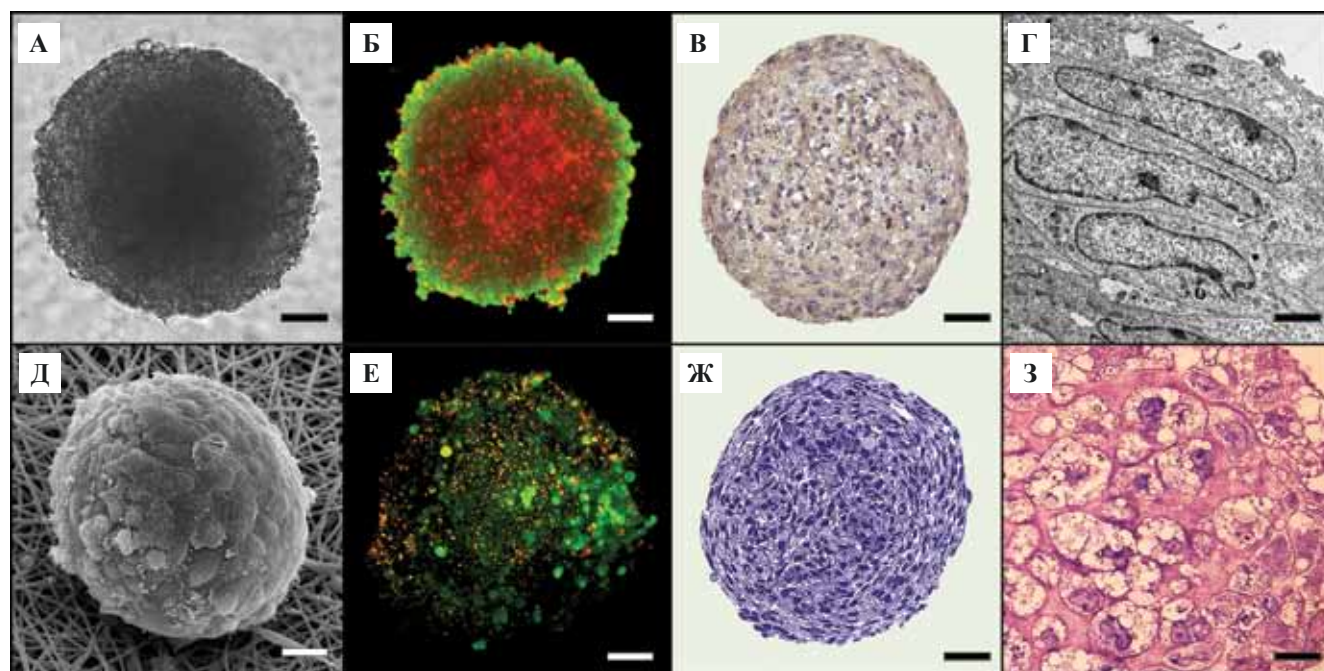
**2.1. Фазово-контрастная микроскопия**

Фазово-контрастная микроскопия вследствие своей простоты и доступности является наиболее широко используемым методом оценки состояния тканевых сфероидов (рис. 2 А). Она не требует дорогостоящего оборудования, дополнительных реактивов и проводится с использованием обычного оптического инвертированного микроскопа (например, Nikon Eclipse Ti-S, Olympus IX73 и т.д.). Основное преимущество метода – возможность прижизненного неинвазивного неdestructивного наблюдения за одним и тем же тканевым сфероидом в течение всего времени культивирования без риска контаминации. Тем не менее, поскольку тканевые сфероиды являются трехмерными структурами, оценить состояние клеток во всем объеме сфероида с использованием данного метода довольно затруднительно.

**2.2. Оценка жизнеспособности клеток в сфероидах**

Оценка жизнеспособности клеток в тканевом сфероиде может производиться качественными и количественными методами. Традиционно количественную оценку проводят с помощью МТТ-теста, по определению активности лактатдегидрогеназы либо с использованием индикатора аламарового синего. Более современными являются реактивы, выявляющие количество живых (CellTiter-Glo®) или мертвых (CellTox™ Green) клеток в сфероиде, которое оценивают по интенсивности либо люминесцентного, либо флуоресцентного сигнала, считываемого с использованием планшетного анализатора (например, VictorX3 PerkinElmer и подобных).

Для качественной оценки жизнеспособности рекомендуется метод Live/Dead, который используется для одновременной флуоресцентной окраски живых и мертвых клеток (рис. 2 Б). Реактивы ацетоксиметилловый эфир кальцеина (англ. calceinacetoxymethyl,



**Рис. 2.** Морфологическую оценку и визуализацию тканевых сфероидов проводят несколькими методами. А – фазово-контрастная микроскопия; Б – анализ жизнеспособности клеток методом Live/Dead, сфероид из клеток HepG2, 10000 клеток/сфероид, культивирование в течение 3 дней [33]; В – иммуногистохимическое исследование, окраска на агрекан; Г – трансмиссионная электронная микроскопия; Д – сканирующая электронная микроскопия; Е – двухфотонная микроскопия, сфероид из клеток HCT116, 100 клеток/сфероид, культивирование в течение 7 дней [34]; Ж – оценка полутонких срезов; З – гистологическое исследование. А, В, Г, Д, Ж, З – сфероид из первичных хондроцитов барана, 8000 клеток/сфероид, культивирование в течение 7 дней [29]. Размерная шкала: А–В, Д–Ж – 50 мкм; Г – 20 мкм; З – 5 мкм

**Fig. 2.** Different methods are used for morphology evaluation and visualization of tissue spheroids: А – phase-contrast microscopy; Б – Live/Dead cell viability assay, HepG2 spheroid, 10000 cells/spheroid, 3 days in culture [33]; В – immunohistochemical analysis, aggrecan is highlighted brown; Г – transmission electron microscopy; Д – scanning electron microscopy; Е – two-photon microscopy, spheroid from HCT116 cells, 100 cells/spheroid, 7 days in culture [34]; Ж – evaluation of semi-thin sections; З – histological examination. А, В, Г, Д, Ж, З – spheroid from primary sheep chondrocytes, 8000 cells/spheroid, 7 days in culture [29]. Scalebars: А, Б, В, Д, Е, Ж – 50 μm; Г – 20 μm; З – 5 μm

Calcein-AM) и йодид пропидия (англ. propidium iodide, PI) окрашивают живые и мертвые клетки, соответственно. В качестве красителя мертвых клеток также может использоваться бромистый этидий (англ. ethidiumbromidehomodimer, EthD-1).

### 2.3. Иммуногистохимическое исследование

Данный метод позволяет следить за изменениями морфологии и состава тканевых сфероидов при помощи окраски определенных компонентов клеток с использованием специфических антител. Содержание интересующих компонентов можно изучать по изменению интенсивности окраски гистологических срезов на заданных этапах культивирования (рис. 2 В). Будучи широко распространенным и относительно недорогим, указанный метод тем не менее требует привлечения высококвалифицированного персонала и сложен для проведения количественного анализа.

### 2.4. Трансмиссионная электронная микроскопия

Трансмиссионная электронная микроскопия позволяет определить состояние клеток, находящихся в тканевом сфероиде – не только на поверхности, но и в толще сфероиды – при анализе его ультратонких срезов (рис. 2 Г). Метод подходит для прослеживания изменений в клетках, включая, например, признаки клеточной дегенерации, индуцированной гипоксией, позволяющие предположить неподходящие условия культивирования. Одновременно с этим трансмиссионная электронная микроскопия является чрезвычайно трудоемким и дорогостоящим методом.

### 2.5. Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия часто используется для оценки статуса и морфологии клеток на поверхности сфероиды, а также для оценки расщепления последнего на адгезивной поверхности (рис. 2 Д). Основным достоинством метода является высокая разрешающая способность. К недостаткам можно отнести относительно высокую стоимость и специфическую пробоподготовку. Кроме того, сканирующая электронная микроскопия без дополнительной обработки образцов дает информацию только о структурных свойствах поверхности без оценки внутреннего строения сфероиды [21, 22].

### 2.6. Двухфотонная и конфокальная микроскопия

Преимуществами данной группы методов являются высокая разрешающая способность, возможность наблюдения клеток внутри сфероиды и получение серийных оптических срезов, позволяющих при помощи программного обеспечения произвести трехмерную реконструкцию исследуемого тканевого сфероиды и получить его трехмерное изображение без использования трудоемкой методики по изготовлению и фотографированию серийных гистологических срезов (рис. 2 Е). Основным недостаток – высокая стоимость оборудова-

ния. Метод требует привлечения специально обученного специалиста.

### 2.7. Оценка полутонких срезов, гистохимические исследования

Полутонкие срезы позволяют дать представление о строении клеток внутри всего объема сфероиды с визуализацией ядер, цитоплазмы, внеклеточного матрикса и других компонентов в зависимости от типа окраски и выбрать интересующие зоны для последующего электронномикроскопического анализа. Наиболее используемой для тканевых сфероиды является окраска полутонких срезов толуидиновым синим (рис. 2 Ж). Гистологические и гистохимические исследования, например окраска гематоксилином и эозином и азуром и эозином, также получили широкое распространение благодаря простоте и доступности (рис. 2 З).

### 2.8. Морфометрия и автоматический анализ изображений

Используя клеточные суспензии с разными начальными концентрациями, можно получать сфероиды различного диаметра. Изменения внешнего вида и размера полученных сфероиды последовательно фиксируют в течение 1–2 недель, производя смену питательной среды каждые 2–3 дня. Одной из основополагающих характеристик сфероиды является его округлость (англ. roundness, circularity), которая показывает, насколько форма сфероиды приближена к идеальному кругу. При этом термин «округлость» употребляют, когда оценивают двухмерную структуру, тогда как более показательными являлись бы термины «сферичность», «шарообразность» (англ. sphericity), описывающие, насколько форма сфероиды приближена к идеальному шару. Тканевый сфероид является трехмерной структурой, но на стандартном оптическом инвертированном микроскопе оценить трехмерное строение сфероиды не представляется возможным, поэтому при использовании такого оборудования верным будет употребление термина «округлость».

Еще одна характеристика размера сфероиды – их диаметр. Исследования показали, что оптимальным для сфероиды является диаметр, не превышающий 400 мкм, что вытекает из установленного предела пассивной диффузии кислорода и питательных веществ в невакуляризованных тканях, который равен 200 мкм [23–25]. При превышении этого значения в центре сфероиды неизбежно образуется некротическая зона. Удобный инструмент для подсчета диаметров сфероиды – свободное программное обеспечение ImageJ, созданное сотрудниками национальных институтов здравоохранения США (англ. National Institutes of Health, NIH). Программное обеспечение ImageJ позволяет одновременно обрабатывать большое количество фотографий разных форматов и систематизировать данные, облегчая их последующую статистическую обработку.

Необходимо учитывать, что при приготовлении сфероидов разными методами их диаметры могут незначительно отличаться даже при использовании одинаковых концентраций клеточной суспензии. Это связано с геометрией лунки или ячейки, в которой происходит формирование сфероидов, и ошибками дозирования, неизменно возникающими при ручном пипетировании. Опыт показывает, что использование только что приготовленных агарозных форм значительно снижает разброс диаметров сфероидов по сравнению с агарозными формами, приготовленными заранее и предварительно хранившимися в течение 1–2 недель. При изготовлении сфероидов в агарозных формах с использованием высоких концентраций клеточной суспензии размеры лунки физически ограничивают увеличение диаметра сфероидов в ходе культивирования.

Морфометрия тканевых сфероидов позволяет получить количественную информацию об их размерах и форме. Современные методы анализа изображений предоставляют возможность делать это автоматически и статистически достоверно [26].

### 3. Биологические свойства тканевых сфероидов

Оценка биологических свойств тканевых сфероидов позволяет, с учетом данных по диаметрам и форме, отобрать сфероиды, наиболее подходящие для конкретных задач.

#### 3.1. Изменение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность является важной характеристикой тканевых сфероидов, поэтому оценка статуса клеток в составе сфероида представляет собой необходимый этап анализа, который желательно проводить на протяжении всего времени культивирования. Соотношение живых и мертвых клеток в сфероиде находится в обратной зависимости от размера и возраста сфероида (рис. 3 А). Обычно чем больше концентрация клеток в сфероиде и продолжительнее период культивирования, тем больше вероятность появления некротической центральной зоны. Данные по жизнеспособности клеток помогают выбрать оптимальный срок использования сфероида, который для большинства клеток составляет 3–4 дня. Существуют и исключения из этого правила: например, для сфероидов, приготовленных из первичных хондроцитов барана или первичных остеобластов человека, оптимальным возрастом считается 7–14 дней, когда внеклеточный матрикс накапливается в достаточном количестве и значительно возрастает прочность сфероида, что особенно важно для хрящевой и костной ткани [27].

#### 3.2. Изменение размера сфероидов

В ходе культивирования сфероиды могут менять свой диаметр: демонстрировать постепенное его уменьшение (рис. 3 Б) или увеличение (рис. 3 В). В частности, компактизации подвержены сфероиды,

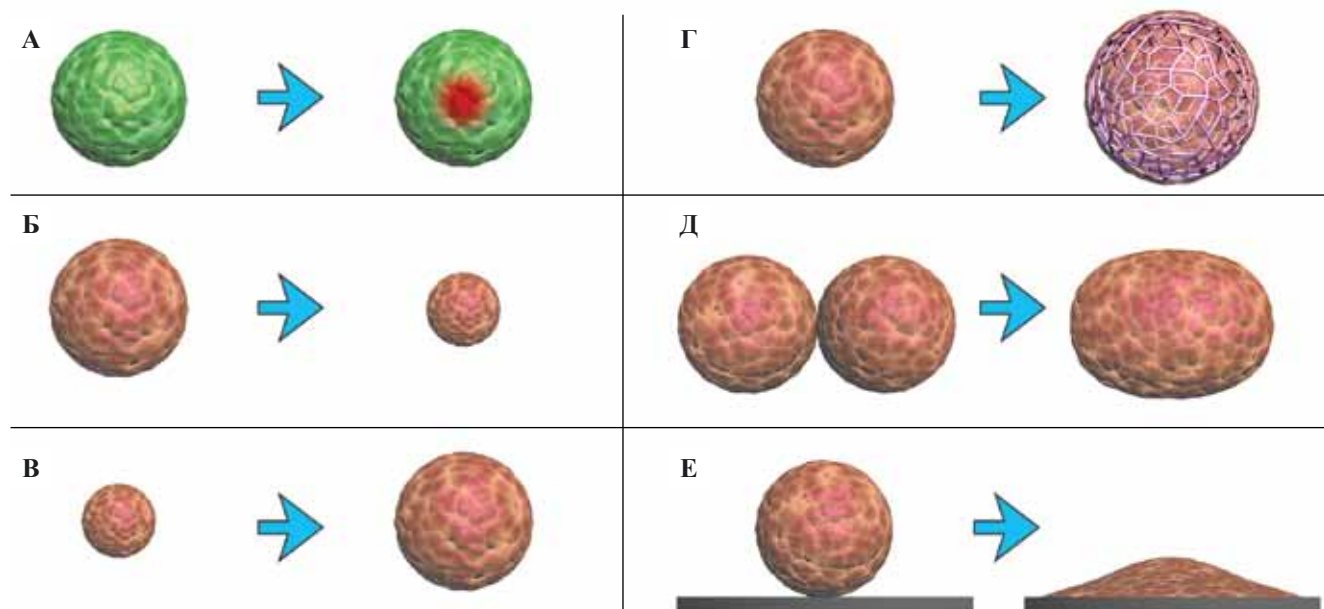


Рис. 3. Характеристики тканевых сфероидов: А – в сфероиде выделяют несколько зон по жизнеспособности, при превышении оптимального диаметра 400 мкм в центре часто формируется некротическая зона; Б – уменьшение размера сфероида (компактизация); В – увеличение размера сфероида; Г – накопление внеклеточного матрикса внутри сфероида; Д – слияние сфероидов; Е – распластывание сфероида на адгезивной поверхности

Fig. 3. The properties of tissue spheroids: А – the gradient of viability zones, and when the optimal diameter of 400  $\mu\text{m}$  is exceeded, a central necrotic zone is often formed; Б – reduction of the spheroid size or compaction; В – increase in the size of the spheroid; Г – extracellular matrix accumulation; Д – tissue spheroids fusion; Е – spreading on the adhesive surface



сформированные из первичных хондроцитов и остеобластов барана и первичных фибробластов человека [14]. Уменьшение размера сфероидов может быть следствием разных факторов – компактизации клеток в составе сфероидов, клеточной гибели – и требует дальнейшего изучения. Постепенное увеличение диаметра характерно для большинства сфероидов, состоящих из эпителиальных клеток, например линии НЕК 293 (клеточная линия эмбриональных почек человека), и связано в первую очередь с сохранением пролиферации клеток в составе сфероида, отсутствием компактизации и синтезом компонентов внеклеточного матрикса. Похожую динамику роста также демонстрируют некоторые сфероиды из раковых клеток, например клеток MCF7 (клеточная линия аденокарциномы протоков молочной железы) и OVCAR8 (клеточная линия карциномы яичника) [28].

### 3.3. Синтез и накопление внеклеточного матрикса

Клетки в составе сфероида способны синтезировать внеклеточный матрикс, обеспечивающий механическую поддержку и миграцию клеток, а также транспорт различных соединений (рис. 3 Г). Характер и количество матрикса зависят от типа клеток и времени культивирования тканевых сфероидов, а также от добавления активных соединений, стимулирующих его синтез. Так, для тканевых сфероидов из первичных хондроцитов барана характерно значительное накопление внеклеточного матрикса при продолжительном культивировании. При этом синтезируемый матрикс является тканеспецифичным и в случае сфероидов из хондроцитов состоит преимущественно из коллагена типа II и агрекана, характерных для гиалинового хряща [29]. Для тканевых сфероидов из первичных гладкомышечных клеток крысы показано накопление коллагена типов I и IV, эластина и фибронектина [30]. Накопление внеклеточного матрикса также можно использовать как доказательство тканеспецифичной дифференцировки клеток внутри сфероида.

### 3.4. Слияние и распластывание сфероидов на адгезивной поверхности

Помещенные рядом тканевые сфероиды способны сливаться друг с другом с образованием единого конструкта (рис. 3 Д). Скорость слияния зависит от используемого типа клеток и времени культивирования сфероидов. Способность к слиянию – важнейшее свойство тканевых сфероидов, позволяющее использовать их в области трехмерной биопечати в качестве строительных блоков. Оценка кинетики слияния тканевых сфероидов *in vitro* позволяет прогнозировать поведение конструкта после имплантации *in vivo* и является важным этапом характеристики сфероидов.

Тканевые сфероиды, помещенные на адгезивную поверхность, способны прикрепляться к ней и распластываться с образованием одного или нескольких слоев клеток (рис. 3 Е). В качестве адгезивного материала

могут использоваться пластиковые покрытие чашек Петри, многолуночные планшеты, биосовместимый матрикс, полученный методом электроспиннинга, и другие субстраты. Было показано, что тканевые сфероиды, полученные из первичных фибробластов человека, прикрепляются к адгезивному матриксу из биосовместимого полиуретана за 4 часа и полностью распластываются на нем в течение 7 дней, а сфероиды из клеток H-1975 (клеточная линия аденокарциномы легкого) – в течение 36 часов [31, 32]. Оценка кинетики распластывания тканевых сфероидов позволяет охарактеризовать их способность восстанавливать структуру поврежденной ткани, что особенно важно для замещения кожных дефектов.

Если в сфероиде присутствует значительное количество нежизнеспособных клеток, расположенных на периферии, процесс слияния замедляется или совсем прекращается. Таким образом, тест на слияние может быть использован как косвенный метод оценки жизнеспособности клеток в сфероиде. Кинетику слияния обычно исследуют на неадгезивной поверхности, в противном случае одновременно со слиянием начинается распластывание, что полностью компрометирует процесс.

## 4. Заключение

Число методов получения тканевых сфероидов за последние десятилетия значительно увеличилось, однако до сих пор только некоторые из них позволяют получать сфероиды единого диаметра и формы в большом количестве. Для использования тканевых сфероидов в биопечати и при разработке новых лекарственных средств необходима их детальная предварительная характеристика. Выбор метода исследования зависит как от типа ткани, так и от цели исследования, при этом наиболее полно охарактеризовать тканевые сфероиды можно, комбинируя различные методы.

### Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – А.А.Г., В.А.М

Сбор и обработка материала – Ю.Д.Х.

Статистическая обработка – Ф.Д.С.П.

Написание текста – А.А.Г.

Редактирование – Е.А.Б., Е.В.К.

## Литература/References

1. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*. 2009;30(12):2164–74. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.084.
2. Laschke MW, Menger MD. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends Biotechnol*. 2017;35(2):133–44. doi:10.1016/j.tibtech.2016.08.004.
3. Fennema E, Rivron N, Rouwkema JC, de Boer J. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology*. 2013;31(2),108–15. doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.003.

4. Wang J, Miao Y, Huang Y, Lin B, Liu X1, Xiao S et al. Bottom-up Nanoencapsulation from Single Cells to Tunable and Scalable Cellular Spheroids for Hair Follicle Regeneration. *AdvHealthc Mater.* 2018;7(3). doi:10.1002/adhm.201700447.
5. Lee SI, Ko Y, Park JB. Evaluation of the maintenance of stemness, viability, and differentiation potential of gingiva-derived stem-cell spheroids. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2017;13(5):1757–64. doi:10.3892/etm.2017.4194.
6. Lin H, Li Q, Lei Y. Three-dimensional tissues using human pluripotent stem cell spheroids as biofabrication building blocks. *Biofabrication.* 2017;9(2):025007. doi:10.1088/1758-5090/aa663b.
7. Bulanova EA, Koudan EV, Degosserie J, Heymans C, Pereira FD, Parfenov VA et al. Bioprinting of a functional vascularized mouse thyroid gland construct. *Biofabrication.* 2017;9(3):034105. doi:10.1088/1758-5090/aa7fdd.
8. Wang S, Wang X, Boone J, Wie J, Yip KP, Zhang J et al. Application of Hanging Drop Technique for Kidney Tissue Culture. *Kidney and Blood Pressure Research.* 2017;42(2):220–31. doi:10.1159/000476018.
9. Chang TT, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(3):559–67. doi:10.1089/ten.tea.2007.0434.
10. Santos JM, Camões SP, Filipe E, Cipriano M, Barcia RN, Filipe M et al. Three-dimensional spheroid cell culture of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells leads to enhanced paracrine induction of wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):90. doi:10.1186/s13287-015-0082-5.
11. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol-Bioeng.* 2003;83(2):173–80. doi:10.1002/bit.10655.
12. Cui X, Dini S, Dai S, Bi J, Binder BJ, Green JEF et al. A mechanistic study on tumour spheroid formation in thermosensitive hydrogels: experiments and mathematical modelling. *RSC Adv.* 2016;6:73282–91. doi:10.1039/c6ra11699j.
13. Howes AL, Richardson RD, Finlay D, Vuori K. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems. *PLoS One.* 2014;9(9):e108283. doi:10.1371/journal.pone.0108283.
14. Koudan EV, Korneva JV, Karalkin PA, Gladkaya IS, Gryadunova AA, Mironov VA et al. The Scalable Standardized Biofabrication of Tissue Spheroids from Different Cell Types Using Nonadhesive Technology. *3D Printing and Additive Manufacturing.* 2017;4(1):53–60. <http://doi.org/10.1089/3dp.2016.0044>.
15. Bae JE, Huh MI, Ryu BK, Do JY, Jin SU, Moon MJ et al. The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles. *Biomaterials.* 2011;32(35):9401–14. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.075.
16. Chen K, Wu M, Guo F, Li P, Chan CY1, Mao Z et al. Rapid formation of size-controllable multicellular spheroids via 3D acoustic tweezers. *Lab Chip.* 2016;16(14):2636–43. doi:10.1039/c6lc00444j.
17. Amaral RLF, Miranda M, Marcato PD, Swiech K. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Frontiers in Physiology.* 2017;8:605. doi:10.3389/fphys.2017.00605.
18. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp.* 2011;51:e2720. doi:10.3791/2720.
19. Frey O, Misun PM, Fluri DA, Hengstler JG, Hierlemann A. Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis. *Nature Communications.* 2014;5(1):4250. doi:10.1038/ncomms5250.
20. Belair DG, Wolf CJ, Wood C, Ren H, Grindstaff R, Padgett W et al. Engineering human cell spheroids to model embryonic tissue fusion in vitro. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184155. doi:10.1371/journal.pone.0184155.
21. Ishiwata T, Hasegawa F, Michishita M, Sasaki N, Ishikawa N, Takubo K et al. Electron microscopic analysis of different cell types in human pancreatic cancer spheres. *Oncol Lett.* 2017;15(2):2485–90. doi:10.3892/ol.2017.7554.
22. No DY, Lee SA, Choi YY, Park D, Jang JY, Kim DS et al. Functional 3D Human Primary Hepatocyte Spheroids Made by Co-Culturing Hepatocytes from Partial Hepatectomy Specimens and Human Adipose-Derived Stem Cells. *PLoS One.* 2012;7(12):e50723. doi:10.1371/journal.pone.0050723.
23. Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D. Engineering vascularized tissue. *Nat Biotechnol.* 2005;23(7):821–3. doi:10.1038/nbt0705-821.
24. Kinney MA, Hookway TA, Wang Y, McDevitt TC. Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(2):352–67. doi:10.1007/s10439-013-0953-9.
25. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2008;26(8):434–41. doi:10.1016/j.tibtech.2008.04.009.
26. Shimoto T, Zhang XY, Akieda S, Ishikawa A, Higaki H, Nakayama K. Analysis of Cell Spheroid Morphological Characteristics Using the Spheroid Morphology Evaluation System. *Journal of Robotics and Mechatronics.* 2018;30(5):819–26. doi:10.20965/jrm.2018.p0819.
27. Restle L, Costa-Silva D, Lourenço ES, Bachinski RF, Batista AC, Linhares ABR et al. A 3D Osteoblast In Vitro Model for the Evaluation of Biomedical Materials. *Adv Mater Sci Eng.* 2015;2015:268930. doi:10.1155/2015/268930.
28. Raghavan S, Mehta P, Horst EN, Ward MR, Rowley KR, Mehta G. Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget.* 2016;7(13):16948–61. doi:10.18632/oncotarget.7659.
29. Omelyanenko NP, Karalkin PA, Bulanova EA, Koudan EV, Parfenov VA, Rodionov SA et al. Extracellular Matrix Determines Biomechanical Properties of Chondrospheres during Their Maturation In Vitro. *Cartilage.* 2018 Sep 15:1947603518798890. doi:10.1177/1947603518798890.
30. Casco M, Olsen T, Herbst A, Evans G, Rothermel T, Pruett L et al. Iron Oxide Nanoparticles Stimulates Extra-Cellular Matrix Production in Cellular Spheroids. *Bioengineering (Basel).* 2017;4(1):pii:E4. doi:10.3390/bioengineering4010004.



31. *Chen D, Yang L, Chen X, Zhang X, Liu Y, Guo Z et al.* Automated contour analysis of multi-cellular spheroids spreading through high content imaging. *Phys Biol.* 2018;15(2):026006. doi:10.1088/1478-3975/aaa27b.
32. *Koudan EV, Bulanova EA, Pereira F DAS, Parfenov VA, Kasyanov VA, Hesuani I YD et al.* Patterning of tissue spheroids biofabricated from human fibroblasts on the surface of electropun polyurethane matrix using 3D bioprinter. *Int J Bioprint.* 2016;2(1):45–52. doi:10.18063/IJB.2016.01.007.
33. *Tseng H, Gage JA, Desai PK, Haisler WL, Shah J, Li W et al.* Luminescent Viability Assays in Magnetically Bioprinted 3D Cultures. *Promega Pubhub.* 2015;9(15):1–9.
34. *Rane TD, Armani AM.* Two-Photon Microscopy Analysis of Gold Nanoparticle Uptake in 3D Cell Spheroids. *PLoS One.* 2016;11(12):e0167548. doi:10.1371/journal.pone.0167548.

### Информация об авторах/Author information

Анна Александровна Грядунова – младший научный сотрудник лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», аспирантка Института регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Anna A. Gryadunova – Junior Researcher, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions», postgraduate student, Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-5189-8530>

Елена Анатольевна Буланова – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Elena A. Bulanova – Candidate of Biological Sciences, Head of the Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions».

<https://orcid.org/0000-0001-8460-3113>

Кудан Елизавета Валерьевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Elizaveta V. Kudan – Candidate of Chemical Sciences, Senior Researcher, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions».

<https://orcid.org/0000-0001-9377-8118>

Фредерико Давид Сена Перейра – инженер лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Frederico D.A.S. Pereira – Engineer, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions».

<https://orcid.org/0000-0002-0735-4245>

Юсеф Джоржевич Хесуани – управляющий партнер лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс».

Yusef D. Hesuani – Managing Partner, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions».

<https://orcid.org/0000-0001-8795-893X>

Владимир Александрович Миронов – кандидат медицинских наук, научный руководитель лаборатории биотехнологических исследований «3Д Биопринтинг Солюшенс», ведущий научный сотрудник Института регенеративной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Vladimir A. Mironov – Candidate of Medical Sciences, Head of Research, Private Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions», Leading Researcher, Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-5029-1462>