

Х. Д. Непийвода, Л. В. Гарманчук, О. М. Перепелиціна,
О. В. Скачкова, Н. М. Храновська, М. В. Сидоренко,
Л. І. Остапченко

Вживаність 3D-культури клітин MCF-7 у безсироватковому середовищі

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

Показано вищу резистентність сферійної культури (3D-модель) пухлинних клітин MCF-7 до відсутності в середовищі культивування сироваткових факторів у порівнянні зі стандартними умовами культивування та з моношаровим ростом (2D-модель), про що свідчить показник живих клітин, апоптичний індекс, розподіл клітин за фазами циклу та адгезивні характеристики.

Відомо, що прогресія пухлинних клітин забезпечується їх неконтрольованою проліферацією в первинних пухлинах і метастатичних вузлах за умов гіпоксії та дефіциту трофічних речовин; це пов'язано як з постійною мітогенною активністю, так і з порушеннями апоптичного шляху загибелі клітин. Вживання трансформованих клітин в умовах сироваткового голодування може бути зумовлено входженням клітин у фазу проліферативного спокою (G_0) та здатністю до субстратнезалежного росту (3D-ріст у багатоклітинних пухлинних сфероїдах). Активація міграції та проліферації у 3D-культурах у системі *in vitro* моделює інвазивний ріст та метастазування *in vivo*. Зафіксоване нами раніше зниження адгезивних властивостей клітин MCF-7 (рак молочної залози) у сфероїдах на 25%, у порівнянні з моношаровим ростом [1], може свідчити про більший метастатичний потенціал та субстратнезалежність клітин при сферійному типі росту [2, 3]. Було показано [3, 4], що за умов 3D-росту трансформовані клітини проявляють меншу чутливість до дії протипухлинних препаратів та дефіцитних за трофічними субстратами умов мікрооточення.

У зв'язку з наведеним вище, нами поставлено за мету дослідити основні параметри росту клітин, а саме: вживаність, розподіл за фазами клітинного циклу, рівень апоптозу та адгезивні характеристики при культивуванні сфероїдів за стандартних умов у повному поживному середовищі, яке містило ембріональну сироватку теляти (ЕТС) та в безсироваткових умовах. Зазначені параметри порівнювали з ростом клітин у моношаровій моделі (у 2D-культурах), яка була представлена клітинною лінією MCF-7, люб'язно наданою доктором І. Гуттом (Людвіговський раковий інститут, Лондон).

Моделювання 2D- й 3D-росту клітин MCF-7 проводили за методикою, описаною в медичному віснику [5]. Клітинам, які досягли повного моношару в 2D-культурах та концентрації $2 \cdot 10^6$ кл./мл, у 3D-культурах замінювали середовище на таке, що не містило сироваткових факторів, термін культивування за даних умов становив 48 год. Контролем для моделей 2D- й 3D-росту слугували клітини, які культивували в повному поживному середовищі з додаванням 15%-ї ЕТС. По досягненню кінцевого терміну культивування визначали основні характеристики функціонування клітин: вживаність за підрахунком живих і мертвих клітин з трипановим синім та за МТТ-тестом, апоптичний індекс й розподіл за фазами клітинного циклу з використанням протокової цитофлуориметрії. Визначення

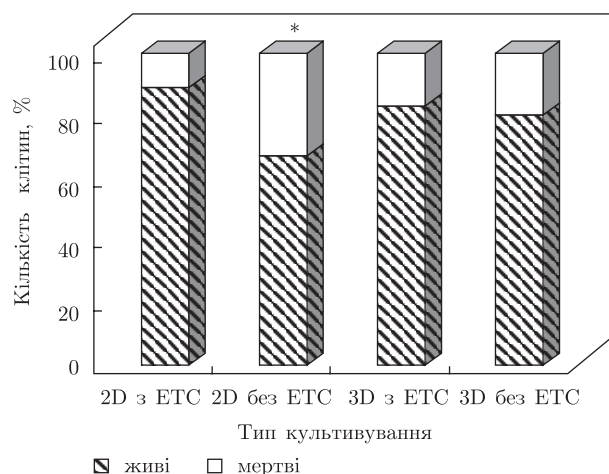


Рис. 1. Співвідношення живих та мертвих клітин

цитофлуориметричних параметрів проводили із розрахунку на 10000 клітин ($p < 0,001$). Адгезію визначали за відсотком прикріплених клітин до субстрату (термін експозиції становив 1 та 3 год) після забарвлення фіолетовим кристалічним за оптичним поглинанням ($\lambda = 535$ нм), яке вимірювали на мультилунковому спектрофотометрі (Labsystems Multiskan MS, Фінляндія) [6, 7]. Статистичну обробку результатів проводили за критерієм Стюдента.

У результаті проведеного дослідження було виявлено, що виживаність клітин MCF-7 через 48 год в умовах інкубації у 3D-культурах по досягненні стаціонарної фази росту в безсироваткових умовах перевищувала аналогічний показник для 2D-культур (рис. 1). Отже, було встановлено, що відсоток живих клітин у 3D-культурі з ETC через 48 год культивування дорівнював (83 ± 5)% і майже не відрізнявся від такого при культивуванні в безсироваткових умовах — ($80 \pm 3,7$)%. Водночас при інкубації клітин у 2D-культурах за умов відсутності сироваткових факторів через 2 доби кількість живих клітин знижувалася в 1,3 раза ($p < 0,05$) і становила ($67 \pm 4,5$)% проти ($89 \pm 2,3$)% при культивуванні клітин з ETC.

При визначенні апоптичного індексу клітин (за стандартних умов та у відсутності сироваткових факторів) було встановлено, що за умов дефіциту поживних субстратів у 2D-культурах рівень апоптозу через 48 год інкубації дорівнював ($39,2 \pm 7,3$)% проти ($19,04 \pm 1,3$)% у контролі (рис. 2). Однак за умов дефіциту сироваткових факторів у кондиційоване середовище 2D-культури секретується більш високий рівень ЕФР-подібних пептидів [8], що може впливати на проліферативний пул цієї культури (табл. 1). Для 3D-культури рівень апоптичних клітин за умов дефіциту та в присутності сироваткових факторів вірогідно не відрізнявся.

Таблиця 1. Розподіл клітин MCF-7 за фазами мітотичного циклу

Типи культивування	Фази клітинного циклу			
	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	G ₂ /M + S
2D із ETC	56,26 ± 1,45	13,96 ± 0,37	29,78 ± 0,74	43,74 ± 1,6
2D без ETC	54,09 ± 1,37	11,93 ± 0,26	33,98 ± 0,85	45,91 ± 1,1
3D із ETC	40,93 ± 1,03**	22,71 ± 0,71**	36,36 ± 0,82**	59,07 ± 1,4**
3D без ETC	66,82 ± 1,56* **	6,39 ± 0,12* **	26,79 ± 0,66* **	33,18 ± 0,75* **

* — $p < 0,05$ порівняно з умовами культивування в присутності ETC; ** — $p < 0,05$ порівняно з культивуванням клітин у 2D-моделі.

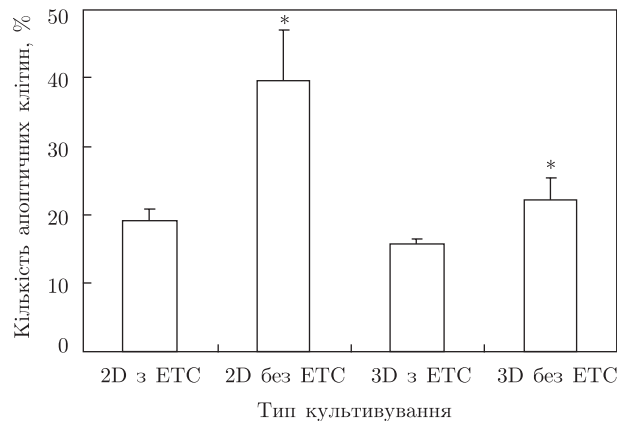


Рис. 2. Апоптичний індекс

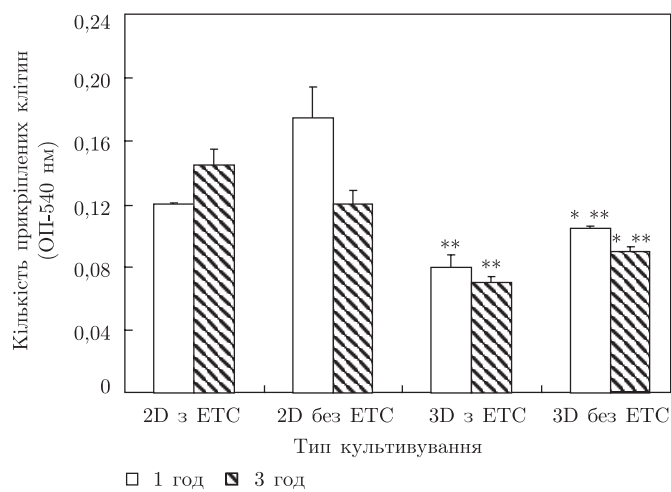


Рис. 3. Показник адгезії клітин MCF-7.

* — $p < 0,05$ порівняно з умовами культивування в присутності ETC; ** — $p < 0,05$ порівняно з культивуванням клітин у 2D моделі

При визначенні розподілу клітин за фазами циклу відсоток їх для $G_2/M+S$ в 2D-культури в безсироватковому середовищі становив $(45,91 \pm 1,1)\%$ проти $(33,18 \pm 0,75)\%$ в 3D-культури (див. табл. 1). Проте при порівнянні клітин MCF-7 з 2D- й 3D-типом росту, які культивували в безсироватковому середовищі із відповідним контролем, було виявлено, що 2D-культура за параметрами клітинного циклу практично не залежить від наявності та відсутності в мікрооточенні сироваткових факторів. У той самий час як у 3D-культури проліферативний пул ($G_2/M+S$) у присутності сироватки в середовищі культивування досягав $(59,07 \pm 1,4)\%$, що майже вдвічі вище аналогічного показника при культивуванні клітин у безсироваткових умовах $(33,18 \pm 0,75)\%$.

Іншим важливим показником, що визначається для ідентифікації пухлинного фенотипу, є адгезія клітин до субстрату. Раніше нами було показано, що адгезивні властивості клітин MCF-7 при довготривалому культивуванні корелюють з фазами клітинного циклу [9]. При порівнянні росту клітин у 2D-й 3D-культурах визначали рівень адгезії за відсутності сироваткових факторів (рис. 3).

Як видно з наведених даних, при відсутності сироваткових факторів у 3D-культурі фракція адгезивних клітин збільшується на 18% ($p < 0,05$) відносно клітин 3D-культури, які культивували в повному поживному середовищі. Також було показано, що в повному поживному середовищі в 3D-системі (порівняно з 2D-системою) здатність клітин до адгезії зменшувалась у 1,5 та 2 рази ($p < 0,01$) через 1 та 3 год експозиції відповідно. За відсутності ЕТС показник адгезії для клітин у 3D-культурі був у середньому в 1,6 раза меншим ($p < 0,05$) у порівнянні з 2D-моделлю. Слід зазначити, що для 2D-моделі культивування в безсироваткових умовах із збільшенням часу експозиції показник адгезивних клітин зменшувався, що може бути наслідком негативного впливу нестачі трофічних факторів у середовищі мікрооточення. В той самий час у 3D-моделі за аналогічних умов вірогідних змін виявлено не було. Даний факт імовірно пов'язаний з переходом більшості клітин за умов дефіциту трофічних факторів у фазу проліферативного спокою — G_0/G_1 (див. табл. 1).

Таким чином, виживаність пухлинних клітин сфероїдної культури при дефіциті сироваткових факторів у середовищі інкубації є вищою, ніж для моношарової культури; на це вказує співвідношення живих : мертвих клітин, апоптичний індекс, розподіл клітин за фазами циклу та показники адгезії.

Роботу виконано на базі Навчально-наукового центру “Інститут біології” Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

1. Perepelytsina O. M., Garmanchuk L. V., Sydorenko M. V., Ostapchenko L. I. Reactivity and sensibility of breast adenocarcinoma (MCF-7) in coculture depend on architecture of cells model // *Phys. Alive.* – 2008. – No 2. – С. 105–111.
2. Park C. C., Zhang H., Pallavicini M. et al. $\beta 1$ Integrin Inhibitory Antibody Induces Apoptosis of Breast Cancer Cells, Inhibits Growth, and Distinguishes Malignant from Normal Phenotype in the Three Dimensional Cultures and *in vivo* // *Cancer Res.* – 2006. – **66**, No 3. – P. 1526–1535.
3. Karen F. X., Burg J. L. Three-dimensional polymeric systems for cancer cell studies // *Cytotechnology.* – 2007. – **54**. – P. 135–143.
4. Kunz-Schughart L. A., Santini M. T., Rainaldi G. et al. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and *in vivo* tumor // *Cell Biol. Int.* – 1999. – **23**, No 3. – P. 157–161.
5. Перепелиціна О. М., Гарманчук Л. В., Сидоренко М. В. Багатоклітинні сфероїди клітин раку молочної залози MCF7: умови генерації та вплив сироваткових факторів // *Буковин. мед. вісн.* – 2007. – № 3. – P. 128–134.
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – **65**, No 1./2. – P. 55–63.
7. Бутаков А. А., Оганезов В. К., Пинегин Б. В., Черноусов А. Д. Спектрофотометрическое определение адгезивной способности полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови // *Иммунология.* – 1991. – № 5. – С. 71–72.
8. Гарманчук Л. В., Перепелиціна О. М., Непійвода Х. Д. та ін. Аутокринний механізм прогресії пухлинних клітин в 2-D та 3-D культурах // *Фізика живого.* – 2009. – **17**, № 1. – С. 169–171.
9. Гарманчук Л. В., Перепелиціна О. М., Гринюк І. І. та ін. Вплив фулеренів C_{60} на адгезивні властивості клітин раку молочної залози // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 4. – С. 164–167.

ННЦ “Інститут біології”
Київського національного університету
ім. Тараса Шевченка
Відділення біотехнічних проблем діагностики
Інституту проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Київ
Національний інститут раку МОЗ України, Київ

Надійшло до редакції 02.02.2011

**K. D. Nepyivoda, L. V. Garmanchuk, O. M. Perepelytsina, O. V. Skachkova,
N. M. Khranovskaya, M. V. Sydorenko, L. I. Ostapchenko**

Survival of 3D culture of cells MCF-7 under conditions without serum

We show the higher resistance of cancer cells MCF-7 spheroid culture (3D-model) to the absence of serum factors in culture medium in comparison with standard cultivation conditions and with monolayer growth (2D-model) that is evidenced by the index of living cells, apoptic index, distribution of the cells by cycle phases, and adhesive properties.