

БИОЛОГИЯ

Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2024. Т. 24, вып. 2. С. 163–171

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2024, vol. 24, iss. 2, pp. 163–171
<https://ichbe.sgu.ru> <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-2-163-171>

EDN: BWUINF

Научная статья
УДК 577.359

Оценка накопления полимерных субмикронных микрокапсул в клеточном и межклеточном пространствах 3D сфероидов

А. А. Абалымов¹, М. В. Ломова¹✉, М. В. Новоселова², Д. А. Горин²

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Сколковский институт науки и технологий, Россия, 121205, г. Москва, ул. Нобеля, д. 3

Абалымов Анатолий Анатольевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научного медицинского центра, anatolii.abalymov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3957-2706>

Ломова Мария Владимировна, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры материаловедения, технологии и управления качеством, Lomovamv85@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7464-1754>

Новоселова Марина Владимировна, научный сотрудник, novoselovama2310@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6268-5058>

Горин Дмитрий Александрович, доктор химических наук, профессор, D.Gorin@skoltech.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8760-615X>

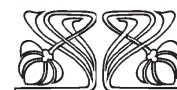
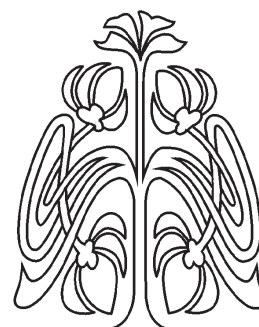
Аннотация. Многоклеточные сфероиды представляют собой трехмерные *in vitro* модели органов и тканей. Многоклеточные сфероиды приобрели большой интерес в области биотехнологий, так как они являются воспроизводимыми и имитирующими реальные органы и ткани тест-системами для новых форм лекарственных средств, позволяя минимизировать использование животных моделей *in vivo*. Для описания накопления субмикронных полимерных микрокапсул в клеточных сфероидах использовали метод проточной цитометрии, позволивший выявить основные аспекты взаимодействия носителей лекарств и клеток внутри сфероида. Сфероиды были получены с помощью клеток рака молочной железы мыши 4T1 и здоровых клеток фибробластов мыши L929. Расположение микрокапсул с диаметром 300, 500, 1000 нм с биосовместимыми оболочками в клеточных сфероидах было оценено в их межклеточном и внутриклеточном пространствах.

Ключевые слова: сфероиды, проточная цитометрия, микрокапсулы, доставка лекарств, тераностика

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых – кандидатов и докторов наук (МК-933.2022.3).

Для цитирования: Абалымов А. А., Ломова М. В., Новоселова М. В., Горин Д. А. Оценка накопления полимерных субмикронных микрокапсул в клеточном и межклеточном пространствах 3D сфероидов // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2024. Т. 24, вып. 2. С. 163–171. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-2-163-171>, EDN: BWUINF

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





Article

Evaluation of polymeric submicron microcapsule accumulation in cellular and intercellular space of 3D spheroids

A. A. Abalymov¹, M. V. Lomova¹✉, M. V. Novoselova², D. A. Gorin²

¹ Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

²Skolkovo Institute of Science and Technology, 3 Nobel St., 121205 Moscow, Russia

Anatolii A. Abalymov, anatolii.abalymov@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-3957-2706>

Maria V. Lomova, lomovamv85@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7464-1754>

Marina V. Novoselova, novoselovama2310@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6268-5058>

Dmitry A. Gorin, D.Gorin@skoltech.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8760-615X>

Abstract. Multicellular spheroids are three-dimensional *in vitro* models of organs and tissues. Multicellular spheroids have gained great interest in the field of biotechnology as they are reproducible and mimic real organs and tissues so can be used as test systems for new forms of drugs, allowing minimizing the use of *in vivo* animal models. Flow cytometry was used to describe the accumulation of submicron polymeric microcapsules in cellular spheroids, which allowed us to identify the main aspects of drug carrier-cell interactions within the spheroid. Spheroids were generated using 4T1 mouse breast cancer cells and healthy L929 mouse fibroblast cells. The arrangement of microcapsules with 300, 500, 1000 nm diameter with biocompatible shells in cell spheroids was evaluated in their intercellular and intracellular spaces.

Keywords: spheroids, flow cytometry, microcapsules, drug delivery, theranostics

Acknowledgements. The work was carried out with the financial support of a grant from the President of the Russian Federation for young scientists – candidates of sciences and doctors of sciences (MK-933.2022.3).

For citation: Abalymov A. A., Lomova M. V., Novoselova M. V., Gorin D. A. Evaluation of polymeric submicron microcapsule accumulation in cellular and intercellular space of 3D spheroids. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2024, vol. 24, iss. 2, pp. 163–171 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-2-163-171>, EDN: BWUINF

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Контролируемая дистанционно управляемая доставка лекарств с использованием полимерных субмикронных носителей представляет собой область активных научных исследований, обладающую огромным потенциалом для лечения различных заболеваний, в том числе онкологических [1]. Точное направленное терапевтическое воздействие на пораженные ткани становится возможным благодаря эффективной доставке терапевтических молекул. В этом контексте актуальным становится исследование влияния различных параметров полимерных микрокапсул на их взаимодействие со сфероидами, имитирующими ткань или орган, что предоставляет ценную информацию для усовершенствования терапевтических стратегий [2].

Полимерные субмикронные капсулы, получаемые для доставки терапевтических агентов, играют важную роль в современной наномедицине [3]. Большим преимуществом полимерных капсул является их многослойность, что позволяет широко варьировать их физико-химические свойства, а именно поверхностный заряд [4], гидродинамический диаметр [5], жесткость [6], противобактериальную активность [7], способность к активной доставке и управляемому высвобождению лекарственных средств [8–10] и др.

Разнообразие варьируемых свойств носителей позволяет подбирать требуемую конфигурацию носителей в зависимости от цели исследования и последующей стратегии терапии.

Однако исследования, производимые большинством групп, направленные на изучение интернализации полимерных микрокапсул в клетки, связаны с классическими 2D клеточными культурами, которые не позволяют объективно оценивать эффективность используемых капсул в трехмерных биологических матрицах [11]. Одной из важных задач использования систем тестирования клеток *in vitro* является воссоздание микросреды *in vivo* [12]. Клетки в тканях окружены микросредой, состоящей из соседних клеток и внеклеточных матриц (ВМ), которые связаны с клетками сигнальными путями, например, каскадом биохимических и механических сигналов. 3D клеточный сфероид, полученный на основе взаимодействия клетка–клетка и клетка–внеклеточный матрикс, поддерживает специфичность и гомеостаз ткани, из которой взяты клетки для его формирования. Клетки, выращенные в 2D монослоях, часто теряют свойства тканей. 3D клеточные модели могут имитировать специфику природных тканей, в отличие от клеток, выращенных в монослоях [13]. В настоящее время 3D клеточные культуры в виде многоклеточных сфероидов используют



ся в широком спектре исследований, включая клеточную биологию, изучение опухолей, морфогенез эпителия, скрининг лекарств и оценку наночастиц [14]. Сложная 3D сеть микросреды опухоли влияет не только на проникновение и распределение терапевтических агентов, но и на ее функционирование. Кроме того, традиционные животные тесты часто не способны предсказать фактические результаты из-за сложности их моделей [15].

В нашем исследовании мы сформировали полимерные капсулы со средними диаметрами 300, 500 и 1000 нм (средняя погрешность в распределении диаметров капсул не превышала 10%), которые состояли из компонентов, таких как дубильная кислота (ДК), бычий сывороточный альбумин (БСА) и полиаргинин (ПАРГ). Заряд на поверхности капсул у одной группы был положительный, у другой – отрицательный. Для оценки проникновения данных микрокапсул мы использовали сфероиды культур 4T1 (раковая культура клеток мыши) и L929 (культура клеток фибробластов мыши). Модель предоставит нам данные о взаимодействии капсул с опухолевыми и нормальными тканями. Наша работа представляет возможность понять, как размер и заряд на поверхности капсул влияют на их распределение во внутриклеточной и внеклеточной средах сфероидов, полученных из раковых и здоровых клеток, что необходимо для расширения знаний в области доставки лекарств с использованием полимерных субмикронных капсул и развития прецизионных методов лечения рака.

Материалы и методы

Получение субмикронных полимерных капсул

Протокол получения частиц CaCO₃

Формирование капсул происходит путем послойной адсорбции полимеров, белков на поверхность экстрагируемого ядра, которое и определяет финальный диаметр частиц. Субмикронные частицы ватерита, являющиеся ядрами для получения микрокапсул размером 300 нм (средняя погрешность в распределении диаметров ядер не превышала 10%), синтезировали с использованием следующей процедуры: раствор 10 мл 5 мМ CaCl₂ (в 85% водном растворе этиленгликоля) смешивали с раствором 10 мл 25 мМ NaHCO₃ (в 85% водном растворе этиленгликоля) на магнитной мешалке (700 об/мин, комнатная температура). Через 15 мин раствор становился мутным, что указывало на осаждение

CaCO₃. Затем суспензию центрифугировали при 6000 об/мин, а полученный осадок несколько раз промывали этиловым спиртом для удаления этиленгликоля и высушивали.

Для получения субмикронных частиц ватерита с диаметром 500 нм (средняя погрешность в распределении диаметров ядер не превышала 10%) выполняли следующие шаги: глицерин (4 г) смешивали с эквимолярными концентрациями (0.5 М) водных растворов CaCl₂ (0,4 мл) и Na₂CO₃ (0,4 мл) в водных растворах. Смесь интенсивно перемешивали на магнитной мешалке (700 об/мин, комнатная температура). Через 60 мин раствор становился мутным, указывая на осаждение CaCO₃. После 60 мин непрерывного перемешивания полученную суспензию подвергали центрифугированию при 6000 об/мин, а осадок промывали пять раз дистиллированной водой для удаления глицерина.

Для приготовления частиц ватерита размером 1 мкм (средняя погрешность в распределении диаметров ядер не превышала 10%) эквимолярные концентрации (0,33 М) водных растворов солей CaCl₂ (2 мл) и Na₂CO₃ (2 мл) смешивали с 10 мл этиленгликоля. Затем полученную реакционную смесь перемешивали с использованием магнитной мешалки со скоростью 700 об/мин в течение 3 ч. Образовавшиеся частицы осаждали центрифугированием при 6000 об/мин, затем промывали три раза водой и один раз этанолом.

Протокол получения полимерных субмикронных капсул

Капсулы формировали на полученных ранее ядрах ватерита путем последовательной адсорбции БСА и ДК, или ПАРГ (2 мг/мл, водный раствор, ПАРГ был приготовлен в водном растворе 0.15 М NaCl). После формирования оболочек ядра капсул экстрагировали с помощью инкубирования в растворе 0.1 М HCl с последующей промывкой дистиллированной водой.

Характеризация полимерных микрокапсул

Концентрацию капсул измеряли с использованием NTA (анализ частиц наноразмера) NanoSight (MalvernIns. Ltd., Worcestershire, UK). Получение изображений капсул методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа (Helios G4 Plasma FIB Uxe). Образцы подготавливали, нанося каплю суспензии капсул на кремниевую подложку и давая им высохнуть при комнатной температуре. На сухие образцы с помощью вакуумного распыления наносили золотое покрытие (5 нм, комплекс Denton). Для измерения дзета-потен-



циала и диаметра капсул использовали Zetasizer Nano ZS (MalvernIns. Ltd., Worcestershire, UK).

Культивирование клеток

Клетки 4T1 и L929 культивировали в DMEM (ThermoFisher, кат. # 10564011, США) и RPMI 1640 (ThermoFisher, кат. # 11875093, США), дополненных 10% FBS (ThermoFisher, кат. # A4766801, США), и 100 $\mu\text{g}/\text{мл}$ пенициллин/стрептомицин (ThermoFisher, кат. # 15140148, США) соответственно. Среду меняли каждые 3 дня, и клетки поддерживали при влажности в инкубаторе при 5% CO_2 и 37 °C (Innova CO-170, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, США).

Формирование сфероидов

Клеточные сфероиды были созданы из клеток 4T1 и L929 с использованием 96-луночных микропланшетов для сфероидов с ультранизкой адгезией Corning (Corning, кат. # 4520, США). Монослой клеток с конфлюэнтностью 95% промывали раствором PBS, затем клетки собирали из культурных флаконов с помощью 0,25% трипсина/0,53 мМ ЭДТА (ThermoFisher, кат. # 25300062, США) и затем суспендировали в среде для культивирования клеток. Концентрация клеток составляла 1×10^6 клеток/мл. 10 мкл суспензии клеток наносили в ячейки микроплашек для сфероидов Corning, добавляя 90 мкл среды для культивирования. Микроплашки для сфероидов Corning инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO_2 в течение 3 дней.

Проточная цитометрия

Сфероиды формировали в течение 3 дней, после чего полимерные капсулы добавляли к сфероидам с концентрацией 100 носителей на клетку. Сфероиды инкубировали вместе с носителями в течение 24 ч, после чего сфероиды промывали трижды в растворе фосфатного буфера. Далее сфероид помещали в пробирку с раствором трипсина, которую ставили на мешалку. Пробирку с клетками перемешивали в течение 20 мин, чтобы разделить клетки друг от друга внутри сфероида. Затем клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, после чего раствор трипсина заменяли снова на PBS. Клетки окрашивали при помощи Hoechst (ThermoFisher, кат. # 62249, США). Проточная цитометрия проводилась с использованием проточного цитометра Cytotflex (BekmanCoulter, США). Для получения статистически значимых результатов было записано 50 000 событий (объектов), включая клетки (только флуоресценция Хоэста, (450/45)), живые клетки с носителями (флуоресценция Хоэста и Су5, (690/50)), носители (флуоресценция Су5(646/662)).

Флуоресцентная микроскопия

Для визуализации сфероидов мы использовали флуоресцентную микроскопию. Флуоресцентные изображения получали с помощью микроскопа Operetta CLS (PerkinElmer, США) с объективами 2 \times , 20 \times и 60 \times , а также с соответствующими фильтрами. Сфероиды 4T1 и L929 окрашивали с использованием CalceinAM (ThermoFisher; кат. # C1430, США), Propidium iodide (ThermoFisher, кат. # P1304MP, США), Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, кат. # C11252, США) и Hoechst (ThermoFisher, кат. # 62249, США). Для этой цели в 2 мл среды для клеток добавляли 0,5 мкг красителей CalceinAM и Propidium iodide вместе с тремя сфероидами с одним из типов носителей. Клетки инкубировали в термостате в течение 15 мин, а затем дважды промывали с помощью фосфатного буфера, после чего сфероиды помещались в новую культуральную среду. Для получения трехмерных стеков было сделано 50 фотографий сфероидов L929 и 4T1 вдоль оси z с шагом 10 мкм.

Результаты и их обсуждение

Варьирование диаметра и поверхностного заряда капсул

Для проведения работы по исследованию прохождения субмикронных полимерных капсул в клеточные сфероиды наиболее оптимально использовать ряд частиц с различным диаметром и поверхностным зарядом. В качестве матрицы для послойной сборки полимерных микрокапсул мы выбрали частицы ватерита, диаметр которых можно варьировать от 50 нм до 15 мкм при одновременном уровне пористости, что позволяет их дополнительно допировать лекарственными веществами или наночастицами.

На первом этапе частицы ватерита синтезировали методом минерализации путем смешивания солей CaCl_2 и Na_2CO_3 в глицероле для частиц размером 500 нм, и CaCl_2 и NaHCO_3 в этиленгликоле для частиц размером 1000 и 300 нм (рис. 1, а–г). Диаметры частиц исследовали с использованием дзета-сайзера Malvern. Изображение сформированных частиц, полученное с помощью СЭМ, представлено на рис. 1, б–г. Частицы имеют чрезвычайно развитую морфологию поверхности и высокую пористость. Для формирования носителей использовался метод послойной адсорбции молекул полимеров, белков и т.д. (Layer-by-layer, LbL) (см. рис. 1, д). Для формирования оболочки на поверхности полученных частиц использовали

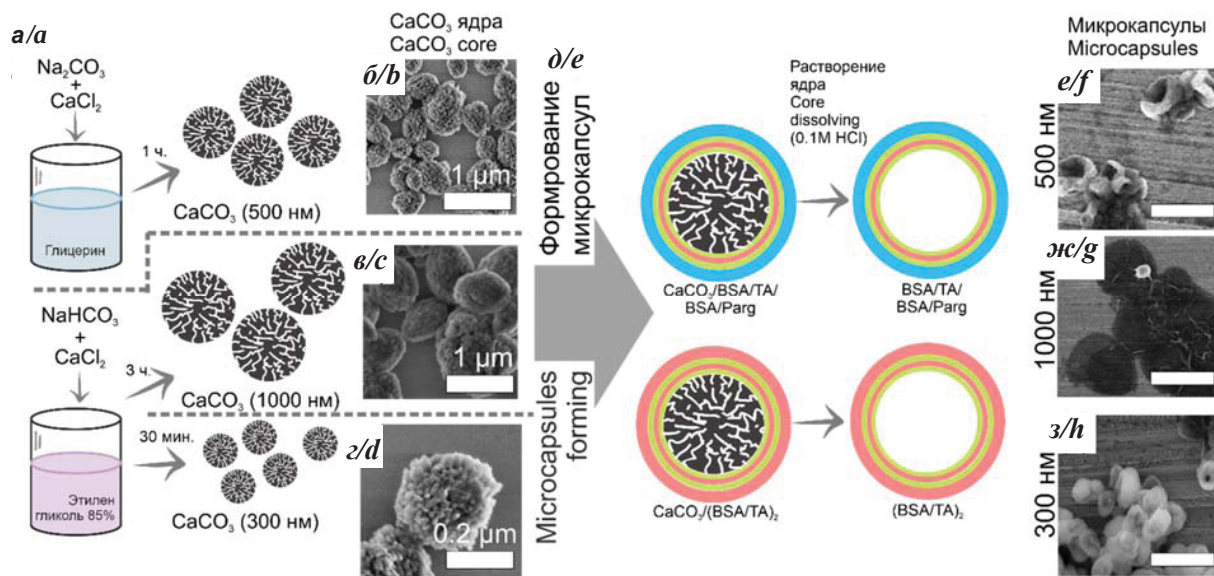


Рис. 1. Схема синтеза частиц ватерита (а). Микрофотографии частиц ватерита разного диаметра (нм), полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии: б – 500, в – 1000 и з – 300. Схема формирования полимерных микрокапсул с различным зарядом на их поверхности (д). Микрофотографии полимерных микрокапсул разного диаметра (нм), полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии: е – 500, ж – 1000 и з – 300

Fig. 1. Scheme of synthesis of vaterite particles (a). Microphotographs of vaterite particles of different diameters (nm) obtained by scanning electron microscopy: b – 500, c – 1000 and d – 300. Schematic of the formation of polymer microcapsules with different charge on their surface (e). Scanning electron microscopy micrographs of polymer microcapsules with different diameters (nm): f – 500 nm, g – 1000 and h – 300

водные растворы БСА и ДК, при этом основой взаимодействия альбумина и танната являются водородные связи. Внешний слой капсул определяя заряд частиц. В случае, если последним слоем адсорбировали таниновую кислоту, то заряд был отрицательным, при этом последующая адсорбция ПАРГ приводила к смене заряда на положительный (вид взаимодействия между ДК и ПАРГ менялся на электростатический). В результате частицы получили заряд, соответствующий последнему полимерному слою – частицы с внешним слоем ПАРГ имеют заряд +24 мВ, частицы с внешним слоем ДК имеют заряд –19–21 мВ. На микрофотографиях (см. рис. 1, е–з) отчетливо видно, что после воздействия 0,1М НСl ядра полностью экстрагировали, и полимерные слои сформировали полые капсулы.

Морфология сфероидов и определение их специфических зон

Следующим этапом нашего исследования было изучение сфероидов с использованием флуоресцентной микроскопии. На микрофотографиях показано, что сфероиды обеих культур имеют яркую и стабильную зеленую флуоресценцию (рис. 2, а, верхний ряд), которая говорит об активном метаболизме клеток и их высокой жизнеспособности после формирования сфероидов. Красный флуоресцентный сигнал (окраска

клеток с помощью propidiumiodide) говорит о наличии небольшого числа мертвых клеток, что является нормой в сфероидах, так как часть клеток в центре сфероида погибает от гипоксии и недостатка питательных веществ. Данная особенность делает многоклеточные сфероиды еще более приближенными к реальным тканям и органам *in vivo*. Также на флуоресцентных микрофотографиях видно четкую флуоресценцию актина (красная флуоресценция) (см. рис. 2, а, нижний ряд) у обеих культур, что говорит о хорошей клеточной адгезии и успешном формировании сфероида.

Сферичность сфероидов была оценена. Как видно из рис. 2, б, в статистическое различие в сферичности двух видов сфероидов крайне незначительно. Сферичность сфероидов может повлиять на проникновение лекарств, наночастиц или лечебных агентов. Сфероиды с менее сферической формой имеют тенденцию к более равномерному распределению лекарств за счет более поверхностного слоя клеток с большей пористостью, что может повлиять на их общую эффективность. Сфероиды с правильной формой обладают компактностью за счет активной выработки внеклеточной матрицы, что делает их менее проницаемыми для частиц нано и микрометрового размера. Также мы оценили



размер сфероидов (см. рис. 2, *з*). Конкретно для сфероидов, полученных из клеточных линий L929, средний диаметр равен 619 мкм, а для

4T1 – 387 мкм, при одинаковом количестве клеток, составляющих сфероид – 10^4 клеток/сфероид.

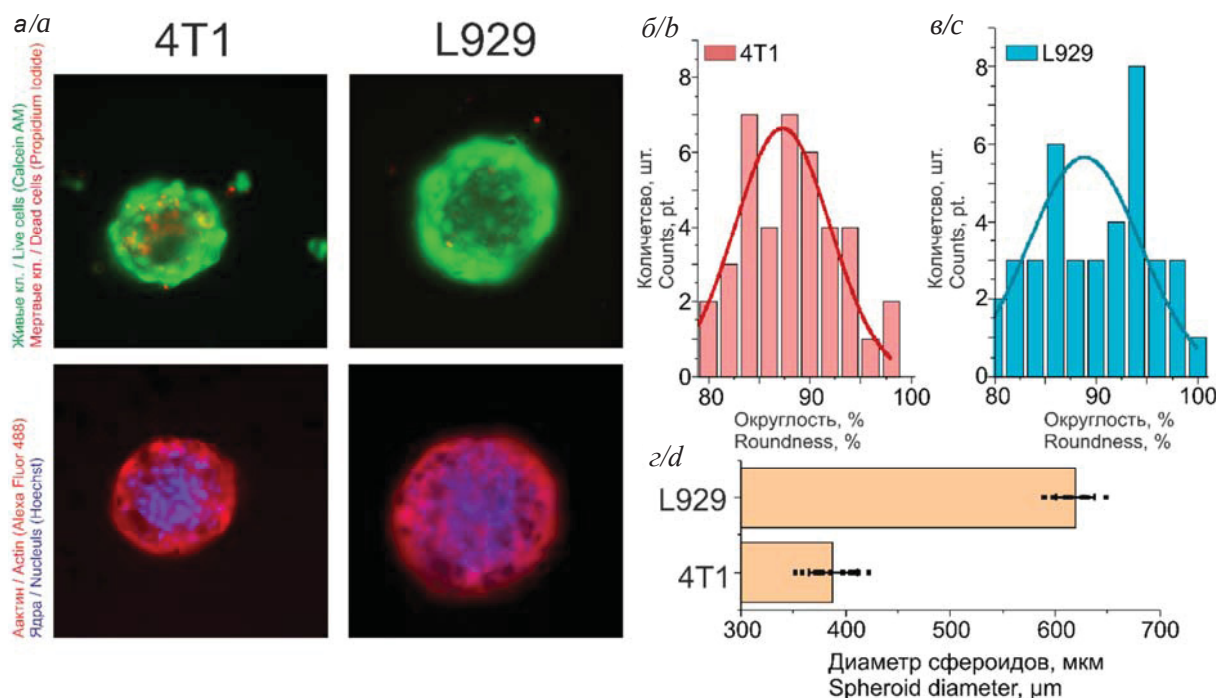


Рис. 2. Флуоресцентные микрофотографии многоклеточных сфероидов культур 4T1 и L929 (а), полученные с помощью флуоресцентной микроскопии. Гистограмма (б, в), описывающая сферичность клеточных сфероидов, полученных из клеток линий: б – 4T1 и в – L929. Гистограмма (з), показывающая диаметр клеточных сфероидов, сформированных из клеток линий 4T1 и L929 (цвет онлайн)

Fig. 2. Fluorescence micrographs of multicellular spheroids of 4T1 and L929 cultures (a) obtained by fluorescence microscopy. Histogram describing the sphericity of cell spheroids derived from cell lines: б – 4T1 and в – L929. Histogram (d) showing the diameter of cell spheroids formed from cell lines 4T1 and L929 (color online)

Исследование проникновения полимерных капсул в клеточные сфероиды с помощью проточной цитометрии

Для определения количества носителей, проникших в сфероид, мы использовали метод проточной цитометрии (рис. 3). Для этого сфероид инкубировали с полимерными микрокапсулами в течение 24 ч, после чего трижды промывали в растворе фосфатного буфера, затем подвергали процессу трипсинизации, чтобы разделить его на отдельные клетки. Далее эту суспензию клеток и носителей анализировали с помощью проточной цитометрии. Все полученные данные делили на 3 группы событий: первая группа – события, имеющие только сигнал красителя Hoechst (клетки без капсул), вторая группа – события, имеющие сигнал Hoechst Cy5 (клетки имеющие капсулы во внутриклеточном пространстве) и третья группа – события, имеющие сигнал только Cy5 (капсулы из межклеточного пространства). Для определения наиболее успешного сочетания

размера и заряда полимерных микрокапсул на прохождение в многоклеточные сфероиды мы определяли процент событий, относящийся к клеткам с капсулами во внутриклеточном пространстве, и процент капсул из межклеточного пространства.

Прежде всего мы подтвердили с помощью метода флуоресцентной микроскопии, что полимерные микрокапсулы успешно интернализировались в клеточные сфероиды (рис. 4, а, з). На ортогональных проекциях флуоресцентных микрофотографий отчетливо видна красная флуоресценция микрокапсул внутри зеленой флуоресценции клеток, что говорит о том, что капсулы успешно вошли в клеточный сфероид.

Данные проточной цитометрии, представленные на рис. 4, б, показывают, что среди всех капсул капсулы размером 500 нм положительно заряда имеют наибольший процент вхождения в клетки внутри сфероида (8,14%), результат

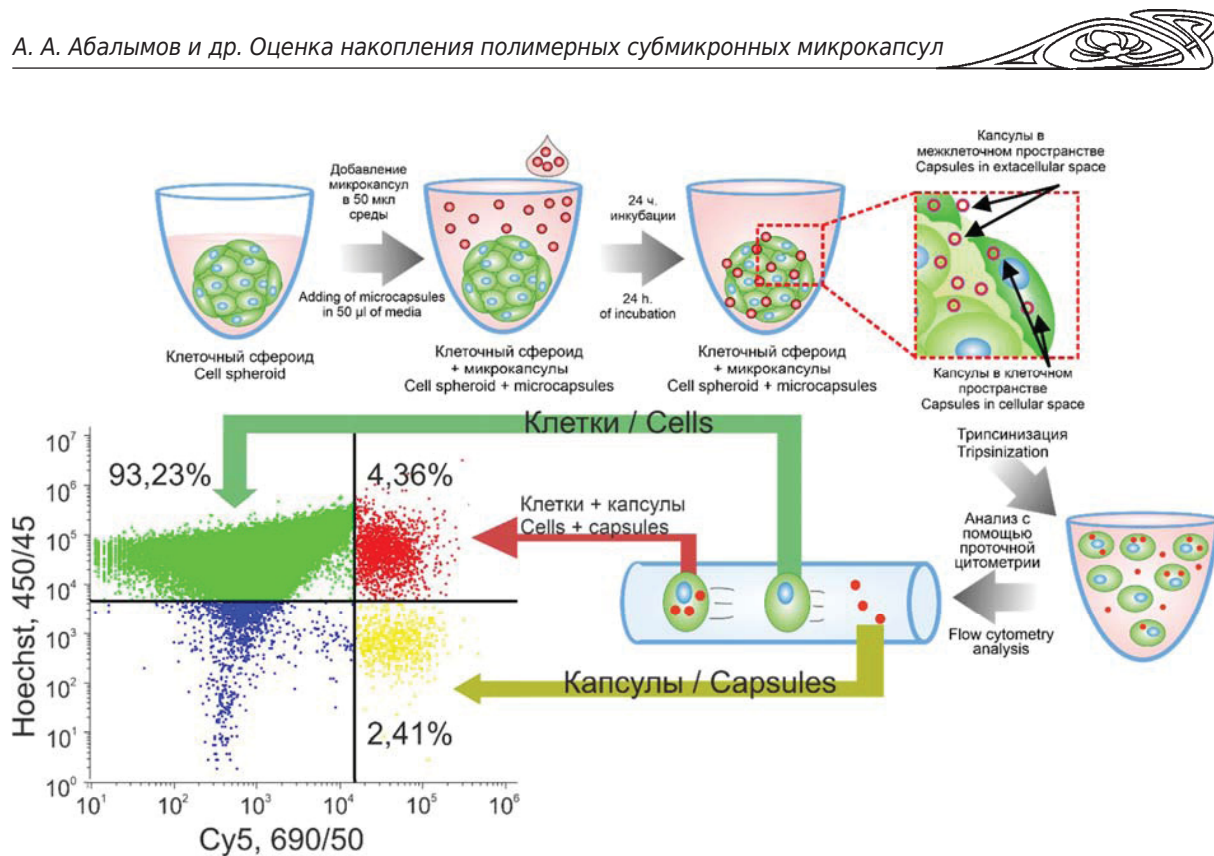


Рис. 3. Схематическое изображение эксперимента по определению % носителей в межклеточном и внутриклеточном пространствах (цвет онлайн)

Fig. 3. Schematic representation of the experiment to determine the % of carriers in the intercellular and intracellular space (color online)

имеет статистически достоверное различие с частицами 500 нм отрицательного заряда (2,46%). Капсулы размером 300 нм обоих зарядов имеют результат прохождения в клетки немного хуже и не имеют различия в зависимости от заряда: 4,36% для положительно заряженных и 4,97% для отрицательно заряженных. Худший результат по прохождению в клетки имеют капсулы размером 1000 нм: 1,37% для положительно заряженных капсул и 1,75% для отрицательно заряженных капсул. По данным результатам отчетливо видно, что с уменьшением размера капсул до 300 нм и увеличением до 1000 нм заряд поверхности капсул перестает играть роль в поглощении клетками сфероидов 4Т1. Подобное улучшенное поглощение частиц размером 500 нм положительного заряда может зависеть от отрицательного заряда клеточной мембраны. В случае контакта с положительными микрокапсулами электростатическое взаимодействие будет намного сильнее. Также отчетливо видна разница между поглощением капсул в зависимости от их размера. Эксперименты подтверждаются литературными данными, где похожие результаты были получены на двухмерных клеточных системах [16].

Капсулы, которые инкубировали со сфероидами культуры L929, имеют уровень поглощения клетками от 2,93 до 1,02% для всех типов капсул (см. рис. 4, д). Определенно можно наблюдать прямую зависимость поглощения капсул клетками от их размера. В данном случае мы видим, что с увеличением размера капсул количество клеток с капсулами внутри сфероидов снижается.

Также нами оценивалось количество капсул в межклеточном пространстве сфероидов (см. рис. 4, в, е). Для этого мы рассчитали количество объектов, обладающих флуоресценцией красителя Cy5, которым были отмечены полимерные микрокапсулы. Для сфероидов 4Т1 мы можем наблюдать результаты схожие с результатами для внутриклеточных капсул (см. рис. 4, в). Наибольший процент носителей, которые располагались в межклеточном пространстве, наблюдается для 500 нм: положительно заряженных капсул – 7,99%, а отрицательно заряженные капсулы находятся на втором месте среди всех образцов (4,37%). Процент остальных капсул не является высоким и составляет от 2,41 (для 300 нм положительных) до 1,06% (для 1000 нм отрицательных).

Интерес вызывает тот факт, что процент капсул в межклеточном пространстве для сфе-

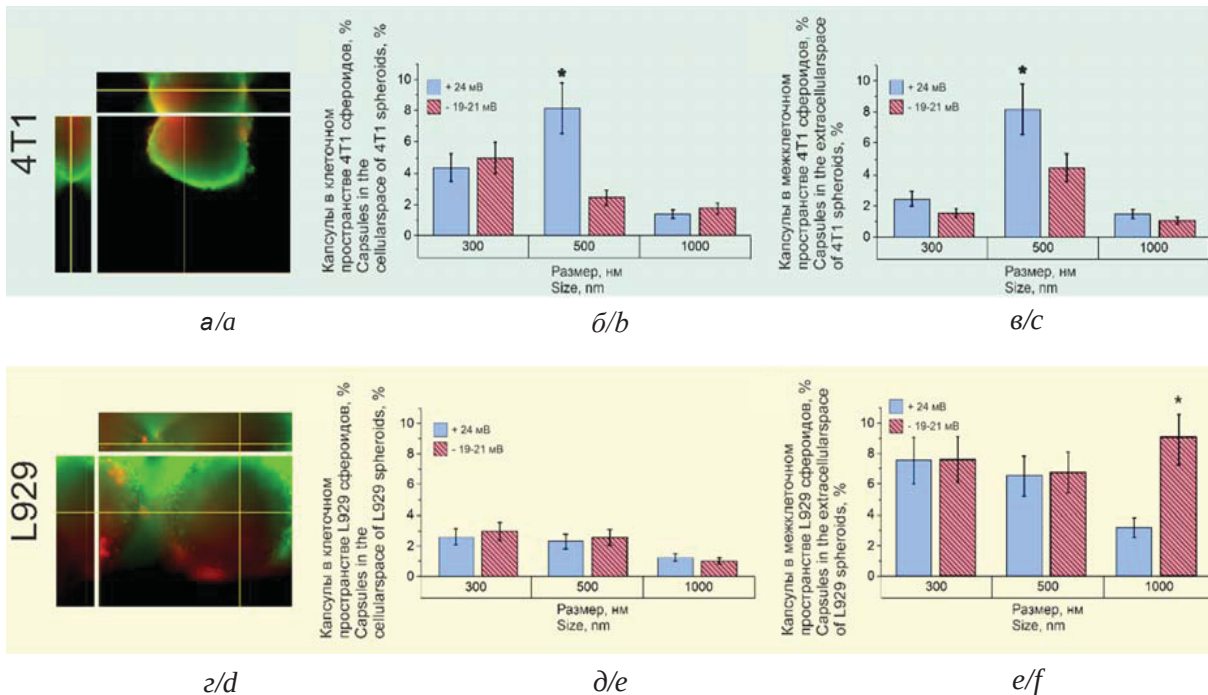


Рис. 4. Ортогональная флуоресцентная микрофотография клеточных сфероидов 4Т1 (а) (CalceinAM, зеленая флуоресценция) с частицами внутри (Су5, красная флуоресценция); б – гистограмма, описывающая процент носителей в межклеточном пространстве сфероидов 4Т1; в – гистограмма, описывающая процент клеток с носителями в сфероиде 4Т1; г – ортогональная флуоресцентная микрофотография клеточных сфероидов L929 (CalceinAM, зеленая флуоресценция) с частицами внутри (Су5, красная флуоресценция); д – гистограмма, описывающая процент носителей в межклеточном пространстве сфероидов L929; е – гистограмма, описывающая процент клеток с носителями в сфероиде L929. * указывает на статистически достоверную разницу для капсул различного заряда ($p < 0.05$) (цвет онлайн)

Fig. 4. Orthogonal fluorescence micrograph of 4T1 cell spheroids (a) (CalceinAM, green fluorescence) with particles inside (Su5, red fluorescence); b – histogram describing the percentage of carriers in the intercellular space of 4T1 spheroids; c – histogram describing the percentage of cells with carriers in 4T1 spheroids; d – orthogonal fluorescence micrograph of L929 cell spheroids (Calcein AM, green fluorescence) with particles inside (Su5, red fluorescence); e – histogram describing the percentage of carriers in the intercellular space of L929 spheroids; f – Histogram describing the percentage of cells with carriers in L929 spheroids; * indicates a statistically significant difference for capsules of different charge ($p < 0.05$) (color online)

роидов культуры L929 является достаточно высоким, (см. рис. 4, е). Сфероиды L929 состоят из клеток фибробластов, которые имеют наиболее развитый внеклеточный матрикс, что в теории должно затруднять прохождение микрокапсул внутрь. Однако по флуоресцентным микрофотографиям видно, что частицы накапливаются в основном на периферии сфероидов. Наибольший процент количества капсул, находящихся в межклеточном пространстве, относится к 1000-нанометровым отрицательно заряженным частицам (8,64%), что является наиболее интересным, эти данные показывают статистическую разницу с 1000-нанометровыми положительно заряженными капсулами (3,02%).

Таким образом, можно отметить, что наиболее важным фактором, влияющим на прохождение частиц как в клеточное пространство, так и в межклеточное, является размер носителей, что

наблюдается для обоих видов сфероидов и всех типов частиц. Заряд капсул на поверхности имеет менее важное значение по сравнению с их размерами при проникновении капсул в сфероиды, образованные раковыми и здоровыми клетками. Положительный заряд капсулы в сочетании с размером 500 нм может обеспечить наибольшее накопление капсул как во внутриклеточном, так и во внеклеточном пространствах опухолевых сфероидов культуры 4Т1.

Заключение

Нами были исследованы сформированные субмикронные и микронные полимерные капсулы с различным зарядом на поверхности, которые использовали для прохождения внутрь многоклеточных сфероидов. Данные частицы были охарактеризованы с помощью различных



методик, подтверждающих размер капсул и их поверхностный заряд. Клеточные сфероиды, которые мы использовали в данной работе, были приготовлены из клеточных культур 4T1 и L929 и качественно охарактеризованы методом флуоресцентной микроскопии. Интернализацию полимерных микрокапсул внутрь клеточных сфероидов оценивали с помощью метода проточной цитометрии, благодаря которому мы могли определить процент клеток сфероида с капсулами внутри, а также процент капсул из межклеточного пространства сфероида. Наилучшие результаты для опухолевого сфероида 4T1 продемонстрировали микрокапсулы размером 500 нм, с положительным зарядом на поверхности, имея самый высокий результат как накопления в клетках (8,14%), так и в межклеточном пространстве (7,99%), в отличие от сфероидов L929. Полученные результаты демонстрируют важность тестирования нано- и микрогабаритных лекарственных носителей на трехмерных клеточных культурах при подборе терапевтической стратегии.

Список литературы / References

- Voronin D. V., Abalymov A. A., Svenskaya Y. I., Lomova M. V. Key points in remote – controlled drug delivery: From the carrier design to clinical trials. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, vol. 22, article number 9149. <https://doi.org/10.3390/ijms22179149>
- Saveleva M. S., Eftekhari K., Abalymov A., Douglas T. E. L., Volodkin D., Parakhonskiy B. V., Skirtach A. G. Hierarchy of hybrid materials-the place of inorganics-in-organics in it, their composition and applications. *Front. Chem.*, 2019, vol. 7, pp. 1–21. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00179>
- De Koker S., Hoogenboom R., De Geest B. G. Polymeric multilayer capsules for drug delivery. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, vol. 41, article number 2867. <https://doi.org/10.1039/c2cs15296g>
- Tong W., Dong W., Gao C., Möhwald H. Charge-controlled permeability of polyelectrolyte microcapsules. *J. Phys. Chem. B*, 2005, vol. 109, pp. 13159–13165. <https://doi.org/10.1021/jp0511092>
- Van der Meeren L., Li J., Konrad M., Skirtach A. G., Volodkin D., Parakhonskiy B. V. Temperature window for encapsulation of an enzyme into thermally shrunk, CaCO₃ templated polyelectrolyte multilayer capsules. *Macromol. Biosci.*, 2020, vol. 20. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000081>
- Ejima H., Yanai N., Best J. P., Sindoro M., Granick S., Caruso F. Near-incompressible faceted polymer microcapsules from metal – organic framework templates. *Adv. Mater.*, 2013, vol. 25, pp. 5767–5771. <https://doi.org/10.1002/adma.201302442>
- Li J., Khalenkow D., Volodkin D., Lapanje A., Skirtach A. G., Parakhonskiy B. V. Surface enhanced Raman scattering (SERS)-active bacterial detection by Layer-by-Layer (LbL) assembly all-nanoparticle microcapsules. *Colloids* <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129547>
- Vidiashva I. V., Abalymov A. A., Kurochkin M. A., Mayorova O. A., Lomova M. V., German S. V., Khalenkow D. N., Zharkov M. N., Gorin D. A., Skirtach A. G. Transfer of cells with uptaken nanocomposite, magnetite-nanoparticle functionalized capsules with electromagnetic tweezers. *Biomater. Sci.*, 2018, vol. 6, pp. 2219–2229. <https://doi.org/10.1039/c8bm00479j>
- Demina P. A., Abalymov A. A., Voronin D. V., Sadovnikov A. V., Lomova M. V. Highly-magnetic mineral protein-tannin vehicles with anti-breast cancer activity. *Mater. Chem. Front.*, 2021, vol. 5, pp. 2007–2018. <https://doi.org/10.1039/d0qm00732c>
- Lengert E., Saveleva M., Abalymov A., Atkin V., Wuytens P. C., Kamyshinsky R., Vasiliev A. L., Gorin D. A., Sukhorukov G. B., Skirtach A. G. Silver alginate hydrogel micro- and nanocontainers for theranostics: synthesis, encapsulation, remote release, and detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, vol. 9, pp. 21949–21958. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b08147>
- Abalymov A. A., Verkhovskii R. A., Novoselova M. V., Parakhonskiy B. V., Gorin D. A., Yashchenok A. M., Sukhorukov G. B. Live-cell imaging by confocal raman and fluorescence microscopy recognizes the crystal structure of calcium carbonate particles in hela cells. *Biotechnol. J.*, 2018, vol. 13, article number 1800071. <https://doi.org/10.1002/biot.201800071>
- German S. V., Abalymov A. A., Kurochkin M. A., Kan Y., Gorin D. A., Novoselova M. V. Plug-and-play lymph node-on-chip: secondary tumor modeling by the combination of cell spheroid, collagen sponge and T-cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, vol. 24, article number 3183. <https://doi.org/10.3390/ijms24043183>
- Anisimov R. A., Gorin D. A., Abalymov A. A. 3D Cell spheroids as a tool for evaluating the effectiveness of carbon nanotubes as a drug delivery and photothermal therapy agents. *J. Carbon Res. C*, 2022, vol. 8, pp. 56. <https://doi.org/10.3390/c8040056>
- Lu H., Stenzel M. H. Multicellular tumor spheroids (MCTS) as a 3D *in vitro* evaluation tool of nanoparticles. *Small*, 2018, vol. 14, article number 1702858. <https://doi.org/10.1002/sml.201702858>
- Moshksayan K., Kashaninejad N., Warkiani M. E., Lock J. G., Moghadas H., Firoozabadi B., Saidi M. S., Nguyen N. T. Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sensors Actuators, B Chem.*, 2018, vol. 263, pp. 151–176. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.01.223>
- Parakhonskiy B., Zyuzin M. V., Yashchenok A., Carregal-Romero S., Rejman J., Möhwald H., Parak W. J., Skirtach A. G. The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO₃ particles on their uptake by cells. *J. Nanobiotechnology*, 2015, vol. 13, iss. 1, pp. 53. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0111-7>

Поступила в редакцию 18.11.2023; одобрена после рецензирования 20.11.2023; принята к публикации 28.11.2023
The article was submitted 18.11.2023; approved after reviewing 20.11.2023; accepted for publication 28.11.2023