

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 57.085.2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ:
ОТ ОРГАНОВ В ЧАШКЕ ПЕТРИ ДО “ОРГАНОВ-НА-ЧИПАХ”Е.В. Алпеева^{1,2,*}, А.Ф. Сидоренкова¹, Е.А. Воротеляк^{1,2}¹Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

*e-mail: alpееva_l@mail.ru

В обзоре отражена история появления и усовершенствования клеточных моделей и различных способов и систем культивирования клеток животных и человека для исследований биологической активности различных веществ *in vitro*. Культуры органов и традиционные двухмерные культуры диссоциированных клеток различных типов, таких как первичные, опухолевые, индуцированные плюрипотентные, стволовые и другие, имеют преимущества и недостатки, однако зачастую не являются адекватными моделями для изучения биологических процессов, происходящих в живых организмах. В настоящее время на ранних фазах разработки лекарственных препаратов для отбора наиболее активных соединений и оценки их цитотоксического действия широко используется высокопроизводительный клеточный скрининг с применением различных способов детекции сигнала: оптических на основе колориметрических, люминесцентных и флуоресцентных методов и электрохимических. Использование животных в качестве моделей для тестирования препаратов все больше подвергается критике из-за низкой степени корреляции между результатами, получаемыми в исследованиях с их использованием, и результатами, получаемыми на человеке, а также из-за дороговизны и этических вопросов. Поэтому много усилий направлено на создание моделей на основе клеток человека. Так появились культуры с трехмерным каркасом для имитации архитектуры тканей *in vivo*, а затем и микроинженерные конструкции на основе законов микрогидродинамики, объединяющие несколько типов клеток, так называемые “органы-на-чипах”, позволяющие воссоздавать физические и химические параметры микроокружения клеток в естественных условиях. Таким образом, экспериментальные клеточные системы с момента появления прошли путь от культивируемых в питательной среде целых органов до практически полной реконструкции органов *in vitro* с использованием различных типов клеток и передовых инженерных решений, что позволяет в настоящее время воссоздавать *in vitro* сложные биологические процессы и более успешно изучать влияние на них различных химических веществ и физических факторов.

Ключевые слова: культура клеток, опухолевые клетки, первичные клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, органотипическая культура, живой эквивалент кожи, высокопроизводительный скрининг, тестирование лекарственных препаратов, 3D-культура, микрогидродинамика, “органы-на-чипах”

Культивирование клеток и органов млекопитающих *in vitro* имеет более чем столетнюю историю. Культивирование целых органов является одним из самых ранних способов культивирования тканей и датируется 1897 г., когда Лео Леб, один из первых исследователей канцерогенеза, поддерживал печень, почки, щитовидную железу и яичник кролика на небольших сгустках плазмы *ex vivo* до трех дней [1]. Уже в 1908 г. ученые смогли продемонстрировать культивирование клеток животных отдельно от организма в течение дней и даже месяцев. Однако еще несколько десятилетий после этих первых шагов сложная технология культивирования, недостаток информации о физических и химических требованиях к данному процессу и среде культивирования и просто отсутствие коли-

чественных методов оставались серьезной преградой для развития этого направления клеточной биологии. В 40-е гг. XX века Уилтон Эрл, Дж. О. Гей и их коллеги показали, что клетки из различных тканей можно успешно поддерживать *in vitro* в достаточно простой по составу среде, однако строго придерживаясь определенных принципов культивирования. Начиная с того времени, клеточная культура стала незаменимым объектом для исследований клеточного цикла, взаимодействий цитоплазмы и ядра, заражения различными патогенами, отношений хозяин-паразит, канцерогенеза, действия радиации, выработки различных веществ, в том числе гормонов, клетками, а в дальнейшем и для широчайшего спектра исследований на молекулярном и биохимическом уровне.

Уже на заре развития техники культивирования клеток вне организма клеточные и органные культуры использовались для изучения биологической активности различных химических веществ, включая фармацевтические препараты. Померат и Лик [2] исследовали токсичность более 100 различных веществ на первичных эксплантатах из различных органов куриных эмбрионов и кожи взрослых людей. В своей статье 1954 г. они отмечают ряд преимуществ использования клеточных и органных культур для тестирования лекарственных препаратов по сравнению с исследованиями, проводимыми на животных. К этим преимуществам относятся возможность более тщательного контроля условий проведения эксперимента, получение из одного источника достаточно однородного материала, использование которого позволяет осуществлять статистический анализ результатов, относительная простота методологии, используемых вспомогательных материалов и оборудования, возможность наблюдения на клеточном уровне и получения динамических результатов.

С тех пор методы изучения влияния на организм различных веществ и факторов, используемые *in vitro*, претерпели значительные изменения. В последние десятилетия в связи с быстрым развитием комбинаторной химии и биологии количество и разнообразие соединений, рассматриваемых в качестве лекарственных препаратов, стремительно увеличивается. Путь от «открытия» препарата до его коммерциализации занимает около десяти лет, а затраты составляют сотни миллионов долларов США [3, 4], даже не смотря на то что для ранних фаз разработки лекарственных препаратов в настоящее время используется быстрый, селективный и надежный высокопроизводительный скрининг (ВПС).

С середины 90-х гг. прошлого столетия ВПС дал возможность десятикратного уменьшения стоимости тестирования так называемых библиотек соединений в поисках кандидатов на взаимодействие с белками-мишенями. Скрининг — это оптимизированная конвейерная и зачастую роботизированная процедура, в ходе которой большое количество химических соединений (более 10 тыс.) одновременно проверяется на аффинность или активность по отношению к специальной тестовой системе, имитирующей биологическую. Его принцип заключается в следующем: в специальные планшеты с сотнями лунок малого объема, содержащими тестовую систему (например, иммобилизованную мишень или специальным образом модифицированные целые клетки), робот раскапывает минимальные количества исследуемых веществ или смеси веществ. После внесения пробы данные с планшета считываются, и выявляются лунки с биологической активностью [5]. В зависимости от используемой технологии может детектироваться радиоактивный сигнал, флуоресценция, биолюминесценция, поляризация излучения и т.д. Два самых распространенных вида ВПС — это так называемый фармаколо-

гический скрининг и скрининг с использованием живых клеток *in vitro*. Мишень-ориентированный фармакологический скрининг основан, главным образом, на реакциях ингибирования ферментов и связывания лигандов с рецепторами, которые проводят в тестовой системе без участия живых клеток. Необходимо отметить, что активность молекул лекарственных средств, наблюдаемая при таком виде скрининга, отличается от их активности в живых клетках *in vitro* и тем более *in vivo*. Поэтому компании, проводящие тестирование токсичности препаратов, постепенно переходят к ВПС с использованием клеток, который имеет три основных разновидности: анализ вторичных мессенджеров, анализ генов-репортеров и анализ клеточной пролиферации [6]. Данный вид скрининга проводится в более релевантном микроокружении и, таким образом, является компромиссным вариантом между тестированием на целом организме и фармакологическим скринингом.

Модели культивирования *in vitro* для ВПС с использованием живых клеток

Органная культура/культура эксплантатов

В органной культуре отдельные органы или их кусочки (эксплантаты) культивируют на границе раздела фаз жидкость-газ на плотике из ацетата вискозы, металлической сетке или гелевой подложке, поскольку многочисленные эксперименты показали, что большинство органов или их фрагментов растут на твердом субстрате лучше, чем в жидкости, а воздушная среда предотвращает развитие в них некрозов. При этом они сохраняют, по крайней мере, частично, структурно-функциональные характеристики, что позволяет изучать *ex vivo* происходящие в них нативные процессы. Эксплантаты или срезы ткани сходны по свойствам и возможностям с культурой целых органов, но имеют ряд преимуществ, в частности, они больше подходят для исследований, которые требуют визуальной оценки, иммуногистохимического окрашивания и т.д. Основными ограничениями использования органной культуры и эксплантатов на практике являются высокая трудоемкость их получения, отсутствие протоколов, гарантирующих удовлетворительную жизнеспособность тканей после цикла замораживание-размораживание, и невозможность долгого их поддержания *in vitro*. Поэтому их применение при ВПС ограничено.

Органотипическая культура

При данном способе совместно культивируется несколько типов клеток. Могут использоваться как клетки с ограниченным митотическим потенциалом, так и иммортализованные. Органотипические культуры могут также включать в себя поддерживающий матрикс или трехмерный каркас для имитации архитектуры и морфологии тканей *in vivo*.

Было показано, что комбинирование различных типов клеток имеет решающее значение для создания определенной клеточной организации, при которой клетки функционируют практически так же, как в естественных условиях, т.е. в целом организме. Модели кожи — это достаточно хорошо охарактеризованные органотипические системы, которые могут служить так называемым живым эквивалентом кожи (ЖЭК) в клинической практике. О них мы хотели бы рассказать подробнее.

ЖЭК — это тканевая трехмерная конструкция, состоящая из слоя кератиноцитов и лежащего под ним слоя фибробластов, погруженных в матрицу, имитирующую внеклеточный матрикс [7]. Сейчас существуют и широко применяются несколько коммерческих вариантов ЖЭК, пригодных для изучения токсического действия веществ *in vitro*: StrataTest®, EpiDerm®, EpiSkin®, EST-1000®, эпидермальная модель кожи Лейдена [8]. Необходимость создания этих моделей была продиктована, с одной стороны, запретом тестирования косметической продукции на животных в Европе, а с другой стороны, результатами исследований, показавшими, что реакция кожи животных на различные химические раздражители отличается от реакции на них кожи человека. Так, например, только пять из 16 раздражителей являются сходными для кожи человека и кролика [9]. Перечисленные ЖЭК стандартизованы и дают одинаковые результаты испытаний вне зависимости от партии, что является их весомым преимуществом. Они обладают морфологической структурой, схожей с таковой кожи человека, но, как правило, имеют более тонкий слой ороговевающего эпителия [7]. Эпидермис этих ЖЭК имеет хорошую барьерную функцию, что и позволяет использовать их в дерматологических исследованиях.

Обширное применение ЖЭК находят в исследованиях, посвященных изучению коррозии кожи под влиянием различных раздражителей. Одним из критериев для оценки действия веществ на кожу служит уровень экспрессии в ней провоспалительного цитокина интерлейкина 1, альфа, секретируемого кератиноцитами и нейтрофилами. Он индуцирует спонтанное воспаление, вызывает различные поражения, стимулирует пролиферацию клеток и ангиогенез [10]. Другим критерием является количество живых клеток после воздействия раздражителя. Согласно международным нормам, вещество считается безвредным, если выживаемость нижних слоев кератиноцитов после трех минут его воздействия на роговой слой кожи составляет больше 50%, а после 60 мин. — больше 15%. Много работ посвящено изучению влияния додецилсульфата натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS) на моделях ЖЭК. SDS — сильный детергент, широко используемый в косметической и бытовой промышленности, вызывающий при воздействии на кератиноциты кожи экспрессию провоспалительных цитокинов и воспалительных хемокинов по сигнальному пути фактора некроза опухоли [11]. При воздействии в течение

4 ч 1%-ным SDS на EST-1000® процент живых клеток составил более половины от изначального количества, что говорит о хорошей барьерной функции данной модели [12]. Результаты исследований влияния SDS на StrataTest® также свидетельствуют о возможности применения этого вида ЖЭК для изучения действия раздражителей разной силы на кожу человека [13].

В исследованиях воздействия озона (O_3) на ЖЭК, которое вызывало в клетках EpiSkin® образование карбоксильных соединений и большого количества окисленных белков, продемонстрировано антиоксидантное действие витамина С, тиольных производных и растительного экстракта зеленого чая [14].

В экспериментах со StrataTest® были получены аналогичные результаты. Кроме того, был изучен окислительный стресс в результате воздействия на StrataTest® сигаретного дыма. Дым одной сигареты вызывал увеличение концентрации активных форм кислорода в клетках почти в 4 раза [13]. Таким образом, при помощи StrataTest® и EpiSkin® можно моделировать окислительный стресс и изучать эффективность действия антиоксидантов на кожу человека *in vitro*.

StrataTest® также использовали в экспериментах по изучению негативного действия ультрафиолетового излучения (УФ), которые показали, что этот ЖЭК реагирует на УФ аналогично коже человека. При этом экранирование УФ с помощью солнцезащитного крема, наносимого на StrataTest®, способствовало снижению в его клетках уровня образования активных форм кислорода и тиминовых димеров, свидетельствующих о повреждении ДНК [13].

Приведенные выше данные говорят о том, что коммерческие модели эквивалентов кожи являются адекватной системой для фармакологических и токсикологических исследований.

Культура диссоциированных клеток

В настоящее время основной моделью клеточной биологии, использующейся в том числе для исследования воздействия различных веществ и факторов на живые системы *in vitro*, является диссоциированная двухмерная клеточная культура (2D-культура). Успех применения данной модели обусловлен свойством большинства видов клеток животных и человека пролиферировать вне организма в специальных питательных средах и образовывать однородные колонии. К преимуществам культуры диссоциированных клеток можно отнести простоту поддержания *in vitro*, большое количество доступных на рынке расходных материалов, специальных сред, наборов, оборудования для получения и поддержания культур в искусственных условиях, возможность заказа тысяч различных проверенных и охарактеризованных клеточных линий

в специальных клеточных банках, наличие разнообразных молекулярных методик, позволяющих модифицировать линии, изменять в них транскрипцию и трансляцию генов, и, конечно, возможность использовать их при ВПС.

Первичные клеточные линии — культуры клеток, полученные в результате диспергирования ткани или органа протеолитическими ферментами или механическими средствами. В русскоязычной литературе первичной культурой называют гетерогенную совокупность клеток после их выделения из ткани и до первого пассажа, однако за рубежом первичной культурой чаще считают любые линии/штаммы клеток, обладающие ограниченным митотическим потенциалом и, как следствие, ограниченной продолжительностью жизни. Из-за этого, а также потому, что эти линии достаточно сложно культивировать и трансфицировать, их применение для различных исследований ограничено. Однако они обладают определенными преимуществами, такими как неизменные биохимические или структурные свойства и фенотип, и часто реагируют на внешние воздействия так же, как клетки *in vivo* [15].

Линии иммortalизованных (спонтанно или искусственно трансформированных первичных) клеток широко используются для скрининга препаратов, потому что они дешевы, надежны и воспроизводимы, их легко наращивать и поддерживать в культуре, они хорошо переносят криоконсервацию и при размораживании не теряют своих свойств. Обычно иммortalизованные, т.е. “бессмертные” клетки получают из первичных путем генетических модификаций. Однако необходимо отметить, что в результате генетических преобразований эти клетки перестают быть фенотипически идентичными первичным, часто становятся анеуплоидными, дедифференцируются и в итоге лишь незначительно похожи на своих предшественников, т.е. сильно отличаются по характеристикам от аналогичных клеток *in vivo* [16, 17]. Поэтому при их использовании в качестве модели для изучения каких-либо биологических процессов или скрининга лекарств необходимо обязательно проводить оценку адекватности и репрезентативности данной модели.

Линии опухолевых клеток представляют собой клетки той опухоли, из которой они произошли, и широко используются для скрининга противораковых препаратов в фармацевтических исследованиях [18]. Впервые в 1951 г. из клеток опухоли, выделенных у человека, была получена клеточная линия, названная HeLa (клетки карциномы шейки матки), которая до сих пор поддерживается и используется в исследованиях. Несмотря на популярность, линии опухолевых клеток также не являются идеальной моделью для исследований, поскольку имеют и накапливают мутации, которые могут повлиять на результаты экспериментов с их использо-

ванием. Например, клеточная линия рака молочной железы MCF-7 не экспрессирует фермент каспазу-3, который участвует в индукции апоптоза [19].

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) человека обладают неограниченной способностью к самообновлению и могут быть дифференцированы в любой тип клеток. Таким образом, из них можно получить достаточное для ВПС и токсикологических исследований количество нормальных клеток. Использование ЭСК в биологии, фармацевтике и медицине ограничено из-за этических вопросов, поскольку необходимо разрушать эмбрион при выделении этих клеток. Поэтому получение первых иПСК произвело практически революцию в области стволовых клеток и их применения [20]. иПСК представляют собой плюрипотентные клетки, искусственно получаемые из дифференцированных соматических клеток путем индукции функциональных генов плюрипотентности. Эти клетки теряют свойства соматических и становятся похожими на ЭСК с точки зрения морфологии, пролиферации, профиля генной экспрессии и дифференцировочного потенциала. Поскольку иПСК могут быть получены от пациентов с генетическими заболеваниями, они расширяют возможности для разработки лекарств [21].

Системы культивирования клеток

Несмотря на более чем вековой опыт по исследованию на клеточных культурах *in vitro* влияния различных химических соединений и физических факторов, животные до сих пор используются в качестве моделей для проверки критериев “ADMET” (абсорбции, распространения, метаболизма, элиминации и токсичности) при тестировании соединений во время их регистрации в качестве лекарственных препаратов. Хотя данный подход дает возможность анализировать физиологические реакции на уровне целого организма, в исследованиях достаточно часто отмечается низкая степень корреляции между результатами, получаемыми на животных, и результатами, получаемыми на человеке, поскольку имеются значительные межвидовые различия в вызванных болезнью ключевых каскадах реакций и изменениях профилей экспрессии генов [22, 23]. Кроме того, тестирование препаратов на животных дорогое, низкопроизводительное и, как отмечалось выше, часто не удовлетворяет этическим нормам. Также становится все более очевидным, что традиционные 2D-культуры не могут в полной мере воспроизводить биологические свойства тканей *in vivo*, которые существуют в организме в трехмерном (3D) пространстве [24].

Все это подчеркивает критическую потребность в еще более усовершенствованных подходах к моделированию условий *in vitro*, специфичных для человеческого организма.

Сравнение 2D- и 3D-способов культивирования

Автоматизированный скрининг с использованием 2D-культуры клеток в многолуночных планшетах может давать ошибочные результаты при прогнозировании тканеспецифичных ответов, т.к. клетки в монослое теряют свою исходную морфологию и по-другому взаимодействуют с матриксом и между собой. Известно, что клетки, выращенные на двухмерных плоских поверхностях, ведут себя и дифференцируются не так, как клетки в 3D-системах или тканях *in vivo* [25]. Третье измерение обеспечивает дополнительное направление межклеточных взаимодействий, миграции клеток и их морфогенеза, которые имеют решающее значение для регулирования клеточного цикла и функционирования ткани *in vivo*. Так, на 2D-культурах было показано, что гемцитабин является эффективным ингибитором пролиферации опухолевых клеток толстой кишки и яичников. Однако в экспериментах на 3D-системах это не подтвердилось. Более того, клетки рака толстой кишки в 3D-культурах оказались в 180 раз более устойчивыми к противоопухолевым препаратам, чем в 2D-культурах [26]. Подобные результаты позволяют полагать, что при тестировании противораковых препаратов с помощью 3D-моделей опухолей можно получать более достоверную информацию. В целом приведенные выше данные свидетельствуют о том, что 3D-культура клеток (3D-культура) является более подходящей платформой для разработки лекарственных средств.

Статичные и перфузионные клеточные культуры

Широко распространенные платформы ВПС с использованием многолуночных планшетов предполагают анализ в статичном микроокружении: среда заливается в лунки и удаляется из них дискретно и порционно. Такая система не дает возможности долгосрочного поддержания культуры клеток. Кроме того, смена среды в лунках приводит к большим колебаниям параметров микроокружения культуры [27]. Хотя дальнейшая миниатюризация подобных систем могла бы иметь большой потенциал для повышения производительности, относительно высокое отношение площади поверхности к объему жидкости в микролунках приведет к неконтролируемому испарению жидкости и, таким образом, к нежелательным условиям культивирования. Поэтому были предложены модифицированные многолуночные планшеты с интегрированной микрогидродинамической (микрофлюидной) системой, которые показали еще большую производительность при скрининге лекарственных соединений [28] и оценке цитотоксичности противоопухолевых препаратов [29]. Такие перфузионные системы, в которых достигается компенсация испарения жидкости, могут поддерживать культуру клеток в те-

чение длительного времени и использоваться для оценки длительного воздействия на нее лекарств.

Помимо поддержания стабильности клеточной культуры посредством непрерывного обеспечения питательными веществами и удаления отходов жизнедеятельности перфузия также может использоваться для создания градиентов концентрации лекарственного средства, определенного физического микроокружения (например, напряжения сдвига или интерстициального потока жидкости) и создания системы циркуляции веществ для более точной имитации условий *in vivo* [28]. Например, при сравнении хондрогенеза в статичной и перфузионной культуре в последней была выявлена более активная пролиферация хондроцитов и более интенсивный синтез внеклеточного матрикса [30].

Методы подсчета клеток и определения клеточной активности

Неспособность выявить токсическое действие соединений на ранних фазах разработки новых лекарственных препаратов приводит к тому, что около 30% новых кандидатов на роль лекарств в итоге отвергается [31]. Поэтому тестирование на цитотоксичность, которое обычно основывается на подсчете числа клеток и определении их жизнеспособности, стало одним из наиболее важных этапов разработки лекарственных препаратов. Для обычных способов подсчета количества клеток, которые являются трудоемкими и времязатратными, используют гемоцитометр, счетчики клеток или проточную цитометрию. В то же время методы определения жизнеспособности клеток, основанные, например, на выбросе живыми клетками трипанового синего сразу после его поглощения или на поглощении (без выброса) нейтрального красного после добавления данных веществ в среду культивирования, требуют, соответственно, инвазивного применения химических реактивов. Эти методы достаточно низкопроизводительны и, следовательно, плохо подходят для использования при ВПС. Также при ВПС отбор проб ограничен небольшими объемами [32], поэтому необходимо применять прижизненные методы исследования. Методы детектирования, используемые при ВПС на основе клеточных культур, можно разделить главным образом на две группы: электрохимические и оптические.

Электрохимические методы

Электрохимические методы могут быть основаны на выявлении изменений внутриклеточных процессов, барьерных свойствах клеток или образовании электрического потенциала определенными видами клеток [33]. Для данных методов были разработаны различные электрохимические биосенсоры, которые объединяют элементы биологического распознавания и электрохимического преобразования сигнала.

Электрохимические методы, основанные на выявлении изменений внутриклеточных процессов. Живую клетку можно рассматривать как электрохимическую систему [34]. Образование электронов и перенос заряда, вызванные окислительно-восстановительными реакциями, изменение состава и концентрации ионов в живых клетках могут быть использованы для характеристики жизнеспособности клеток в гомогенном растворе [35]. Помимо этого клеточный метаболизм вызывает изменения продуктов обмена (например, молочной кислоты и углекислоты) или субстратов (например, глюкозы и растворенного в цитоплазме кислорода). Различные электрохимические биосенсоры были разработаны для выявления изменений среды культивирования и самих клеток в результате их метаболизма [36–38]. Электрохимические методы, основанные на клеточной активности, включают потенциометрию и амперометрию. Известно, что на метаболическую активность клеток может влиять множество неконтролируемых факторов окружающей среды, что ограничивает применение данного подхода для ВПС на основе клеточных культур.

Электрохимический метод, основанный на барьерных свойствах клеток. Ионный состав среды вокруг погруженного в нее электрода изменяется в присутствии клеток. Как правило, клетки с изолирующими свойствами значительно увеличивают сопротивление электрода [39]. Поэтому жизнеспособность, морфологию, количество клеток, их апоптоз и адгезию, можно оценивать с помощью метода электрохимической импедансной спектроскопии. Например, для количественного анализа живых клеток был разработан новый датчик сопротивления, встраиваемый в дно планшета. С помощью данного устройства можно проводить оценку цитотоксичности и острой токсичности веществ в режиме реального времени [39].

Электрохимический метод, основанный на возбуждении/записи электрического потенциала клеток. Такие клетки и ткани, как сердечная мышца, бета-клетки поджелудочной железы, нервные клетки, способны генерировать биоэлектрические сигналы, возникающие в результате организованной работы ионных каналов клеточной мембраны [33]. Регистрация этих биоэлектрических сигналов может использоваться при тестировании лекарств против сердечной аритмии, гипертонии, болезни Паркинсона, диабета, нейропатической боли и т.д. Данный метод обладает высокой производительностью, высокой чувствительностью, простотой использования и хорошо подходит для неинвазивной детекции клеточной активности электрогенных клеток с возможностью длительного их культивирования.

Хотя электрохимические методы являются неинвазивными и достаточно производительными, они не позволяют получать информацию о конкретных клеточных реакциях, непосредственно связанных с определенными функциями клеток, биомаркерами или сигнальными путями, которая

важна для понимания механизмов действия лекарственных препаратов. Более того, электрохимические методы не применимы для 3D-культур, поскольку требуют прямого контакта клеток с электродом.

Оптические методы

Анализ жизнеспособности клеток и подсчет их количества при ВПС на основе клеточных культур обычно проводят с помощью колориметрических, люминесцентных или флуоресцентных методов.

Колориметрический метод основан на изменении цвета среды после реакции клеточных метаболитов со специальными химическими реагентами. Разработаны колориметрические анализы с использованием рутениевого красителя [40] и аламарового синего [41]. Однако низкая чувствительность рутениевого красителя и низкая надежность аламарового синего ограничивают их применение при ВПС. В продаже имеются наборы для оценки метаболической активности клеточной культуры с использованием солей тетразолия, таких как МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид) [42], МТС (3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий) [43] и ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид), которые восстанавливаются активно растущими клетками до цветного продукта формазана, количественно определяемого при помощи спектрофотометра.

Несмотря на популярность, данные колориметрические методы требуют многократного добавления в культуру химических веществ по определенной схеме, что может нарушать жизнедеятельность клеток [44]. Эти методы являются инвазивными, трудоемкими и времязатратными, а также имеют относительно низкую чувствительность. Кроме того, они обычно позволяют получить данные только в конечной точке эксперимента, что является существенным недостатком для тестов на цитотоксичность *in vitro*. Предпочтительными являются динамические данные, которые более подробно описывают реакции клеток на воздействие лекарств.

Люминесцентные методы. Окисление люциферина, катализируемое ферментом люциферазой, дает свечение, которое можно детектировать при помощи светочувствительных аппаратов, таких как люцинометр или оптический микроскоп [45]. Люцифераза светлячков широко используется в качестве репортера в трансфицированных клетках, в которые введен ген люциферазы под контролем интересующего промотора для оценки его транскрипционной активности [46]. Во многих коммерческих наборах на основе анализа клеточной активности киназ люцифераза используется в качестве репортера. Ее можно также применять для определения клеточного уровня АТФ при тестировании жизнеспособности клеток. Кроме того, некоторые

ферменты, такие как каспаза и цитохром P450, способны превращать в люциферин специальные молекулы-предшественники. Таким образом, активность этих ферментов может быть обнаружена в совмещенном или двухступенчатом анализе на люциферазу [47].

Недостатком люминесцентных методов является то, что на интенсивность биолюминесценции помимо количества люциферазы может влиять множество других факторов, таких как неучтенное поглощение люциферина, наличие кофакторов, прозрачность и рН культуральной среды или буфера, вызывающих расхождения между детектируемым уровнем сигнала и фактическими изменениями клеточной активности [48].

Флуоресцентные методы по сравнению с люминесцентными имеют более высокую чувствительность, и их легче адаптировать для работы с очень малыми объемами проб при высокопроизводительном анализе токсичности химических соединений, клеточных реакций на экзогенные стимулы и активации сигнальных путей [49]. Недавно в качестве флуоресцентных меток стали широко использоваться наночастицы, такие как “квантовые точки”. Эти полупроводниковые нанокристаллы легко вводить в клетки, они фотохимически устойчивы, могут обеспечивать узкое и регулируемое излучение и возбуждаться светом любой длины волны. Различные цвета эмиссии могут быть одновременно получены с использованием наночастиц разного размера, возбуждаемых одноволновым светом [50, 51]. Недостатком “квантовых точек” является то, что они могут обладать клеточной токсичностью. Кроме того, как и при колориметрических методах, их можно использовать только для количественного анализа клеток или клеточной активности в конечной точке, что не дает возможности оценивать динамику клеточной пролиферации или гибели.

Разработка методов на основе репортерных генов с использованием зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP) позволила проводить неинвазивный автоматизированный анализ клеточной пролиферации и специфических клеточных функций в реальном времени [52]. Впервые такой анализ был продемонстрирован на клетках яичника китайского хомячка (линия CHO), экспрессирующих GFP под контролем промотора цитомегаловируса человека (CMV) [53]. Со временем GFP и его мутантные формы были получены с цветами эмиссии от синего до желтого. GFP обычно нетоксичен для клеток. Кроме того, GFP может сочетаться с красным флуоресцентным белком *Discosoma species* (dsRed) для двухцветных или мультиплексных анализов [54].

В дополнение можно отметить, что техника на основе эффекта FRET (резонансного переноса энергии), при котором наблюдается изменение длины волны излучения комплекса из двух флуорофоров при разрушении связи в виде небольшого пептид-

ного линкера между ними, может использоваться, например, для изучения активации протеазы каспазы-3 в процессе апоптоза [55].

В целом, системы детекции флуоресценции в живых клетках являются неинвазивными и отвечают требованиям простоты и скорости для применения при ВПС, а также могут использоваться для получения динамических данных. В современных коммерческих ВПС подобного типа используют лазерные сканирующие системы с флуоресцентной микроскопией и количественной обработкой изображений для проведения кинетических анализов на основе живых клеток с высоким пространственным и временным разрешением. Их можно применять для изучения событий, происходящих в живых клетках, количественного определения сшитых с флуоресцентными репортерами внутриклеточных белков и наблюдения за их транспортом, а также за некоторыми субклеточными структурами [56]. Однако высокая стоимость и относительно низкая производительность данных ВПС ограничивают их использование поздними фазами исследований лекарственных препаратов [57]. Более того, системы визуализации на основе флуоресценции ограничены анализом плоских изображений клеток в 2D-культурах.

ВПС на основе 3D-культур для разработки лекарственных препаратов

Флуоресцентный анализ с использованием 3D-культур

Нужно отметить, что недостаточно мощные сигналы флуоресценции экспрессирующих GFP клеток в 2D-культуре могут маскироваться высоким уровнем флуктуирующих фоновых сигналов, наблюдаемым благодаря различным неспецифическим эффектам [58]. Это ограничение можно преодолеть путем культивирования трансфицированных клеток в каркасе из волоконистого полиэтилентерфталата (ПЭТ) в модифицированных лунках, что значительно увеличивает общее количество клеток на единицу площади и уменьшает фоновые шумы [59]. Такая 3D-культура может обеспечить в 20 раз более высокий уровень клеточной флуоресценции и значительно улучшить соотношение сигнал/шум, поскольку клетки концентрируются в каркасе в центре лунки, а фоновую флуоресценцию можно измерить отдельно и вычесть из общего показателя для получения величины истинного сигнала живых клеток. Эта новая платформа флуоресцентной 3D-культуры может давать возможность получения воспроизводимых кинетических данных, которые можно с большей степенью надежности использовать для оценки воздействия лекарств на пролиферацию клеток. Она была успешно применена для изучения цитотоксичности химических веществ и лекарств от рака, демонстрируя возможность использования на ранних стадиях разработки лекарственных препаратов.

Клеточный анализ с использованием микрогидродинамики

Микрогидродинамика — междисциплинарная наука, описывающая поведение малых (порядка микро- и нанолитра) объемов и потоков жидкостей, находящаяся на стыке физики, гидравлики, динамики, химии, биологии и инженерных знаний. Ее развитие способствовало возникновению технологии манипулирования малыми объемами жидкостей с использованием микроструктур, способной произвести революцию в области клеточных исследований. Контролируемое управление микрогидродинамическими устройствами при их размерах, близких к размерам клетки и биомолекул, позволяет использовать их на клеточном уровне, а сеть микроканалов, из которых они состоят, воссоздает микроокружение клеток *in vivo* [28]. Микрогидродинамические системы обладают возможностью очень быстрой доставки веществ клеткам для достижения высоких скоростей реакций и анализа и возможностью строго контролировать перемещение жидкостей и концентрацию в них веществ. Микрогидродинамические системы, оснащенные механизмами внешнего контроля и детекции в реальном времени, могут быть полностью автоматизированы при ВПС.

Были продемонстрированы микротехнологические устройства на основе культур гепатоцитов [60], клеток легких [61] и др. на поверхностях силиконов и полидиметилсилоксана (ПДМС). Ханг с коллегами впервые разработал микрогидродинамическую систему, оснащенную генератором градиента концентрации веществ и способную к длительному клеточному мониторингу [62]. Данное устройство состоит из генератора концентрации и массива микрочаеек 10×10 штук, что позволяет проводить параллельно 100 экспериментов с уникальными условиями в каждой ячейке. Подобные устройства можно применять для изучения влияния компонентов и pH культуральной среды, плотности клеток и скорости перфузии на экспрессию белков культурой.

Большинство микрогидродинамических платформ изготавливается с использованием ПДМС, который является оптически прозрачным, газопроницаемым и биосовместимым полимером [28]. Однако из-за своих гидрофобных свойств он может поглощать молекулы гидрофобных веществ. Су с соавт. тестировал цитотоксичность на культуре клеток НЕК с использованием устройств с микроканалами из трех различных пластиков: полистирола (ПС), циклоолефинового полимера (ЦОП) и ПДМС. Оказалось, что ПС и ЦОП могут быть более подходящими материалами при тестировании гидрофобных лекарственных препаратов, чем ПДМС [63].

Описанные выше устройства на основе микрогидродинамики все же не являются идеальной аль-

тернативой обычной клеточной культуре, поскольку все вещества и клетки в них расположены во взаимосвязанной сети замкнутых микроканалов, что затрудняет внесение новых клеток в данную систему. Для решения этой проблемы применяется цифровая микрогидродинамика, которая представляет собой технологию работы с каплями объемом порядка нанолитра на открытой поверхности группы электродов. Например, Барбулович-Над с коллегами представил первую платформу “лаборатория-на-чипе” с использованием данной технологии, способную реализовать основные этапы культивирования клеток млекопитающих: посев клеток, наращивание биомассы, снятие клеток и их пересев на новую поверхность [64].

Микрогидродинамические системы на основе 3D-культур и “органы-на-чипах”

Изначально микрогидродинамические устройства заполнялись 2D-культурами. Затем появились микроустройства на основе 3D-культур. Последние являются релевантной биологической моделью для проведения микромасштабных исследований на основе клеток и для тестирования лекарственных средств. “Органы-на-чипе”, самый продвинутый на сегодняшний день вид данных систем, представляет собой микроинженерную систему, которая имеет в своем составе ключевые функциональные единицы органов человека. Обычно эти системы состоят из прозрачных полимерных 3D-микроканалов, выстланных живыми клетками, и, как и органы *in vivo*, обладают трехмерной микроархитектурой, определяемой пространственным распределением нескольких типов клеток и обеспечивающей их функциональное взаимодействие, а также сложным органоспецифическим микроокружением клеток с конкретными биохимическими и физическими параметрами [65–70]. Эти системы позволяют достаточно точно моделировать *in vitro* сложные биологические процессы.

В последние годы данный подход был использован для конструирования моделей, воссоздающих сложную структуру и функциональность таких органов, как печень, сердце, легкие, кишечник, почки, мозг и кости [65, 71–73]. Весьма показательным примером является микроустройство “легкое-на-чипе”, которое воспроизводит механически активный альвеолярно-капиллярный барьер [66]. Эта модель создана на основе разделенной на отсеки трехмерной микрогидродинамической системы, в которой альвеолярные эпителиальные клетки культивируются в тесном контакте с легочными микрососудистыми эндотелиальными клетками на тонкой пористой высокоэластичной искусственной мембране, образуя подобие альвеолярно-капиллярной мембраны *in vivo*. Эта система имеет контролируемый компьютером механизм на основе отрицательного давления, который обеспечивает циклическое растяжение альвеолярно-капиллярной

мембраны для имитации дыхательных движений. Важно отметить, что данное устройство позволяет воспроизводить и визуализировать комплексные интегрированные реакции на уровне органов, которые невозможно наблюдать в обычных моделях клеточной культуры, такие как увеличение количества иммунных клеток, мигрирующих из кровяного русла в ответ на бактериальное заражение, их фагоцитарную активность, появление воспалительных цитокинов и попадание наночастиц из окружающей среды [66]. Более того, способность этой модели воссоздавать механическую активность легкого позволила выявить неизученное ранее отрицательное влияние растяжения легочной ткани на ее повреждение и развитие в ней воспалительных процессов.

Ученые продолжают работы в направлении создания искусственных “органов-на-чипах”, расширяя свои модели путем добавления в систему нескольких “органов”, которые имеют тесную взаимосвязь, и получения практически автоматизированного “тела-на-чипе” с максимально возможной функциональностью [74, 75].

Таким образом, благодаря развитию химии, физики и инженерных технологий, в том числе появ-

лению нанотехнологий, биологи, начав в конце XX в. эксперименты по культивированию *in vitro* с культивирования целых органов, пройдя стадию 2D- и 3D-культивирования диссоциированных клеток, в конце концов снова пришли к “органной” культуре, уже представляющей собой биоинженерное устройство. Новая органная культура, “органы-на-чипах”, создается из живых и искусственных элементов по определенным принципам с учетом огромного опыта, накопленного на данный момент в области биологии и смежных наук, чтобы максимально приблизить функциональность данной системы к функциональности органов *in vivo*, но при этом контролировать в ней каждый элемент. Такой подход должен обеспечить в итоге получение идеальной модели, точно воссоздающей *in vitro* сложные биологические процессы для более успешного изучения влияния на них различных химических веществ и физических факторов и более эффективной разработки лекарственных препаратов.

Работа выполнена в рамках дополнительного государственного задания Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН по программе развития биоресурсных коллекций ФАНО на 2017 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Loeb L. Über die Entstehung von Bindegewebe, Leucocyten und roten Blutkörperchen aus Epithel und über eine Methode, isolierte Gewebsteile zu zuchten // Chicago: M. Stern and Co., 1897. 72 p.
2. Pomerat C.M., Leake C.D. Short term cultures for drug assays: general considerations // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1954. Vol. 58. P. 1110–1128.
3. DiMasi J.A., Hansen R.W., Grabowski H.G. The price of innovation: new estimates of drug development costs // J. Health Econ. 2003. Vol. 22. N 2. P. 151–185.
4. Morgan S., Grootendorst P., Lexchin J., Cunningham C., Greyson D. The cost of drug development: a systematic review // Health Policy. 2011. Vol. 100. N 1. P. 4–17.
5. Sundberg S.A. High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches // Curr. Opin. Biotech. 2000. Vol. 11. N 1. P. 47–53.
6. An W.F., Tolliday N. Cell-based assays for high-throughput screening // Mol. Biotechnol. 2010. Vol. 45. N 2. P. 180–186.
7. Ponc M., Boelsma E., Gibbs S., Mommaas M. Characterization of reconstructed skin models // Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol. 2002. Vol. 15. N 1. P. 4–17.
8. Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V., Zagaynova E.V. Tissue-engineered skin constructs and application of stem cells for creation of skin equivalents (review) // Sovr. Tehnol. Med. 2017. Vol. 9. N 1. P. 198–218.
9. Jírová D., Basketter D., Liebsch M., Bendová H., Kejlová K., Marriott M., Kandárová H. Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data // Contact Dermatitis. 2010. Vol. 62. N 2. P. 109–116.
10. Bou-Dargham M.J., Khamis Z.I., Cognetta A.B., Sang Q.A. The role of interleukin-1 in inflammatory and malignant human skin diseases and the rationale for targeting interleukin-1 alpha // Med. Res. Rev. 2017. Vol. 37. N 1. P. 180–216.
11. Wang C., An Q., Zhao D., Li M., Zheng H., Zhang J., Liu J., Yang L., Su N. Insight into the mechanism of SDS irritation on human skin keratinocytes by examination of changes in gene expression // Am. J. Biomed. Sci. 2016. Vol. 8. N 4. P. 311–321.
12. Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.-J., Vohr H.-W., Fuchs H.W. Epidermal-skin-test 1000 (EST-1000) — A new reconstructed epidermis for *in vitro* skin corrosivity testing // Toxicol. in Vitro. 2005. Vol. 19. N 7. P. 925–929.
13. Rasmussen C., Gratz K., Liebel F., Southall M., Garay M., Bhattacharyya S., Simon N., Vander Zanden M., Van Winkle K., Pirnstill J., Pirnstill S., Comer A., Allen-Hoffmann B.L. The StrataTest® human skin model, a consistent *in vitro* alternative for toxicological testing // Toxicol. in Vitro. 2010. Vol. 24. N 7. P. 2021–2029.
14. Cotovio J., Onno L., Justine P., Lamure S., Catroux P. Generation of oxidative stress in human cutaneous models following *in vitro* ozone exposure // Toxicol. in Vitro. 2001. Vol. 15. N 4–5. P. 357–362.
15. Eglén R., Reisine T. Primary cells and stem cells in drug discovery: emerging tools for high-throughput screening // Assay Drug Dev. Technol. 2011. Vol. 9. N 2. P. 108–124.
16. Allen D.D., Caviedes R., Cárdenas A.M., Shimahara T., Segura-Aguilar J., Caviedes P.A. Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies // Drug Dev. Ind. Pharm. 2005. Vol. 31. N 8. P. 757–768.
17. Donato M.T., Lahoz A., Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. Cell lines: a tool for *in vitro* drug metabolism studies // Curr. Drug Metab. 2008. Vol. 9. N 1. P. 1–11.
18. Sharma S.V., Haber D.A., Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents // Nat. Rev. Cancer. 2010. Vol. 10. N 4. P. 241–253.

19. Jänicke R.U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3 // *Breast Cancer Res. Tr.* 2009. Vol. 117. N 1. P. 219–221.
20. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 26. N 4. P. 663–676.
21. Dashinimaev E.B., Artyuhov A.S., Bolshakov A.P., Vorotelyak E.A., Vasiliev A.V. Neurons derived from induced pluripotent stem cells of patients with Down syndrome reproduce early stages of Alzheimer's disease type pathology *in vitro* // *J. Alzheimers Dis.* 2017. Vol. 56. N 2. P. 835–847.
22. Mak I.W., Evaniew N., Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment // *Am. J. Transl. Res.* 2014. Vol. 6. N 2. P. 114–118.
23. Seok J., Warren H.S., Cuenca A.G., et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110. N 9. P. 3507–3512.
24. Fitzgerald K.A., Malhotra M., Curtin C.M., O'Brien F.J., O'Driscoll C.M. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery // *J. Control. Release*. 2015. Vol. 215. P. 39–54.
25. Basu S., Yang S.-T. Astrocyte growth and glial cell line-derived neurotrophic factor secretion in three-dimensional polyethylene terephthalate fibrous matrices // *Tissue Eng.* 2005. Vol. 11. N 5–6. P. 940–952.
26. Smitskamp-Wilms E., Pinedo H.M., Veerman G., Ruiz van Haperen V.W., Peters G.J. Postconfluent multilayered cell line cultures for selective screening of gemcitabine // *Eur. J. Cancer*. 1998. Vol. 34. N 6. P. 921–926.
27. Wu M.-H., Urban J.P., Cui Z., Cui Z.F. Development of PDMS microbio reactor with well-defined and homogeneous culture environment for chondrocyte 3-D culture // *Biomed. Microdevices*. 2006. Vol. 8. N 4. P. 331–340.
28. Wu M.-H., Huang S.-B., Lee G.-B. Microfluidic cell culture systems for drug research // *Lab Chip*. 2010. Vol. 10. N 8. P. 939–956.
29. Chen S.-Y., Hung P.J., Lee P.J. Microfluidic array for three-dimensional perfusion culture of human mammary epithelial cells // *Biomed. Microdevices*. 2011. Vol. 13. N 4. P. 753–758.
30. Pazzano D., Mercier K.A., Moran J.M., Fong S.S., DiBasio D.D., Rulfs J.X., Kohles S.S., Bonassar L.J. Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture // *Biotechnol. Progr.* 2000. Vol. 16. N 5. P. 893–896.
31. Hughes J.D., Blagg J., Price D.A., et al. Physiochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. Vol. 18. N 17. P. 4872–4875.
32. Betts J.I., Baganz F. Miniature bioreactors: current practices and future opportunities // *Microb. Cell Fact.* 2006. Vol. 5, 21.
33. Ding L., Du D., Zhang X., Ju H. Trends in cell-based electrochemical biosensors // *Curr. Med. Chem.* 2008. Vol. 15. N 30. P. 3160–3170.
34. Berry M.N., Grivell M.B. An electrochemical description of metabolism // *Bioelectrochemistry of cells and tissues* / Eds. D. Walz, H. Berg, and G. Milazzo. Basel: Birkhauser Verlag, 1995. P. 134–158.
35. Nonner W., Eisenberg B. Electrodiffusion in ionic channels of biological membranes // *J. Mol. Liq.* 2000. Vol. 87. N 2. P. 149–162.
36. Borgmann S., Radtke I., Erichsen T., Blöchl A., Heumann R., Schuhmann W. Electrochemical high-content screening of nitric oxide release from endothelial cells // *Chembiochem.* 2006. Vol. 7. N 4. P. 662–668.
37. Kamei K., Haruyama T., Mie M., Yanagida Y., Aizawa M., Kobatake E. The construction of endothelial cellular biosensing system for the control of blood pressure drugs // *Biosens. Bioelectron.* 2004. Vol. 19. N 9. P. 1121–1124.
38. May K.M., Wang Y., Bachas L.G., Anderson K.W. Development of a whole-cell-based biosensor for detecting histamine as a model toxin // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. N 14. P. 4156–4161.
39. Yeon J.H., Park J.-K. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip // *Anal. Biochem.* 2005. Vol. 341. N 2. P. 308–315.
40. Wodnicka M., Guarino R.D., Hemperly J.J., Timmins M.R., Stitt D., Pitner J.B. Novel fluorescent technology platform for high throughput cytotoxicity and proliferation assays // *J. Biomol. Screen.* 2000. Vol. 5. N 3. P. 141–152.
41. O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. N 17. P. 5421–5426.
42. Derfus A.M., Chan W.C., Bhatia S.N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots // *Nano Lett.* 2004. Vol. 4. N 1. P. 11–18.
43. Malich G., Markovic B., Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines // *Toxicology*. 1997. Vol. 124. N 3. P. 179–192.
44. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. On the constructing of survival curves for cultured cells in cytogerontological experiments: A brief note with three hierarchy diagrams // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 2. P. 67–71.
45. Durick K., Negulescu P. Cellular biosensors for drug discovery // *Biosens. Bioelectron.* 2001. Vol. 16. N 7–8. P. 587–592.
46. Fan F., Wood K.V. Bioluminescent assays for high-throughput screening // *Assay Drug Dev. Technol.* 2007. Vol. 5. N 1. P. 127–136.
47. Meisenheimer P.L., O'Brien M.A., Cali J.J. Lumino-genic enzyme substrates: The basis for a new paradigm in assay design // *Promega Notes*. 2008. Vol. 100. P. 22–26.
48. Inoue Y., Tojo A., Sekine R., Soda Y., Kobayashi S., Nomura A., Izawa K., Kitamura T., Okubo T., Ohtomo K. *In vitro* validation of bioluminescent monitoring of disease progression and therapeutic response in leukaemia model animals // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2006. Vol. 33. N 5. P. 557–565.
49. Gribbon P., Sewing A. Fluorescence readouts in HTS: no gain without pain? // *Drug Discov. Today*. 2003. Vol. 8. N 22. P. 1035–1043.
50. Beske O.E., Goldbard S. High-throughput cell analysis using multiplexed array technologies // *Drug Discov. Today*. 2002. Vol. 7. N 18. P. S131–S135.
51. Michalet X., Pinaud F.F., Bentolila L.A., Tsay J.M., Doose S., Li J.J., Sundaresan G., Wu A.M., Gambhir S.S., Weiss S. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics // *Science*. 2005. Vol. 307. N 5709. P. 538–544.
52. Yang S.T., Zhang X., Wen Y. Microbioreactors for high-throughput cytotoxicity assays // *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.* 2008. Vol. 11. P. N 1. 111–127.
53. Hunt L., Jordan M., De Jesus M., Wurm F.M. GFP-expressing mammalian cells for fast, sensitive, noninvasive cell growth assessment in a kinetic mode // *Biotechnol. Bioeng.* 1999. Vol. 65. N 2. P. 201–205.
54. Wolff M., Wiedenmann J., Nienhaus G.U., Valler M., Heilker R. Novel fluorescent proteins for high-content

- screening // *Drug Discov. Today*. 2006. Vol. 11. N 23–24. P. 1054–1060.
55. Xu X., Gerard A.L., Huang B.C., Anderson D.C., Payan D.G., Luo Y. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer // *Nucleic Acids Res.* 1998. Vol. 26. N 8. P. 2034–2035.
56. Abraham V.C., Taylor D.L., Haskins J.R. High content screening applied to large-scale cell biology // *Trends Biotechnol.* 2004. Vol. 22. N 1. P. 15–22.
57. Haney S.A., LaPan P., Pan J., Zhang J. High-content screening moves to the front of the line // *Drug Discov. Today*. 2006. Vol. 11. N 19–20. P. 889–894.
58. Girard P., Jordan M., Tsao M., Wurm F.M. Small-scale bioreactor system for process development and optimization // *Biochem. Eng. J.* 2001. Vol. 7. N 2. P. 117–119.
59. Zhang X., Yang S.-T. High-throughput 3-D cell-based proliferation and cytotoxicity assays for drug screening and bioprocess development // *J. Biotechnol.* 2011. Vol. 151. N 2. P. 186–193.
60. Leclerc E., Sakai Y., Fujii T. Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane) // *Biomed. Microdev.* 2003. Vol. 5. N 2. P. 109–114.
61. Viravaidya K., Sin A., Shuler M.L. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity // *Biotechnol. Progr.* 2004. Vol. 20. N 1. P. 316–323.
62. Hung P.J., Lee P.J., Sabounchi P., Lin R., Lee L.P. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays // *Biotechnol. Bioeng.* 2005. Vol. 89. N 1. P. 1–8.
63. Su X., Young E.W., Underkofler H.A., Kamp T.J., January C.T., Beebe D.J. Microfluidic cell culture and its application in high-throughput drug screening: cardiotoxicity assay for hERG channels // *J. Biomol. Screen.* 2011. Vol. 16. N 1. P. 101–111.
64. Barbulovic-Nad I., Au S.H., Wheeler A.R. A microfluidic platform for complete mammalian cell culture // *Lab Chip*. 2010. Vol. 10. N 12. P. 1536–1542.
65. Huh D., Hamilton G.A., Ingber D.E. From 3D cell culture to organs-on-chips // *Trends Cell Biol.* 2011. Vol. 21. N 12. P. 745–754.
66. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip // *Science*. 2010. Vol. 328. N 5986. P. 1662–1668.
67. Inamdar N.K., Borenstein J.T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering // *Curr. Opin. Biotech.* 2011. Vol. 22. N 5. P. 681–689.
68. Huh D., Leslie D.C., Matthews B.D., Fraser J.P., Jurek S., Hamilton G.A., Thorneioe K.S., McAlexander M.A., Ingber D.E. A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice // *Sci. Transl. Med.* 2012. Vol. 4. N 159. 159ra147.
69. Khetani S.R., Bhatia S.N. Microscale culture of human liver cells for drug development // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26. N 1. P. 120–126.
70. Bhatia S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells // *FASEB J.* 1999. Vol. 13. N 14. P. 1883–1900.
71. Huh D., Torisawa Y.S., Hamilton G.A., Kim H.J., Ingber D.E. Microengineered physiological biomimicry: Organs-on-chips // *Lab Chip*. 2012. Vol. 12. N 12. P. 2156–2164.
72. Ghaemmaghami A.M., Hancock M.J., Harrington H., Kaji H., Khademhosseini A. Biomimetic tissues on a chip for drug discovery // *Drug Discov. Today*. 2012. Vol. 17. N 3–4. P. 173–181.
73. Van der Meer A.D., van den Berg A. Organs-on-chips: breaking the *in vitro* impasse // *Integr. Biol. (Camb.)*. 2012. Vol. 4. N 5. P. 461–470.
74. Esch M.B., King T.L., Shuler M.L. The role of body-on-a-chip devices in drug and toxicity studies // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2011. Vol. 13. P. 55–72.
75. Eisenstein M. Artificial organs: Honey, I shrunk the lungs // *Nature*. 2015. Vol. 519. N 7544. P. S16–S18.

Поступила в редакцию
21.07.2017

Принята к печати
07.09.2017

CELL BIOLOGY

OVERVIEW OF CELL MODELS: FROM ORGANS CULTURED IN A PETRI DISH TO “ORGANS-ON-CHIPS”

E.V. Alpeeva^{1,2,*}, A.F. Sidorenkova¹, E.A. Vorotelyak^{1,2}

¹Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences,
Vavilov ul. 26, Moscow, 119334, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University,
Ostrovitianov ul. 1, Moscow, 117997, Russia

*e-mail: alpeeva_l@mail.ru

In this review, we tried to elucidate the origin and development of different animal and human cell culture methodologies used to evaluate the effects of various factors and substances *in vitro*. Organ cultures and conventional two-dimensional cultures of dissociated cells of various types, such as primary, tumor, induced pluripotent, stem, and etc. have their advantages and drawbacks but usually do not represent accurate models for studying biological processes that take place in living organisms. Nowadays high-throughput cell assays on the basis of various methods of signal detection (optical utilizing colorimetric, luminescent and fluorescent methods of detection and electrochemical) are widely used at early stages of drug development for selection of the most active compounds and evaluation of their cytotoxic effects. The use of animals as models for drug testing is being criticized because of the lack of correlation between the results

obtained in studies on them and on humans, and also because of the high cost and ethical issues. Therefore, much effort is put to create models based on human cells. This is how cultures emerged that utilize a three-dimensional network to simulate the architecture of tissues *in vivo*, and then so-called “organs-on-chips” – microfluidic microdevices combining several types of cells, that replicate physical and chemical parameters of the microenvironment of cells in living organisms. In summary, experimental cell models have come a long way from the whole organs cultivated in a growth medium to almost complete reconstruction of organs *in vitro* based on the cutting-edge engineering approach with the use of different cell types. This currently enables to replicate complex biological processes and study the influence of different substances and factors on them more successfully.

Keywords: *cell culture, tumor cells, primary cells, induced pluripotent stem cells, organotypic culture, living skin equivalent, high-throughput assay, drug testing, 3D culture, microfluidics, Organs-on-chips*

Сведения об авторах

Алеева Елена Викторовна – науч. сотр. Центра коллективного пользования ИБР РАН, инженер отдела регенеративной медицины НИИ Трансляционной медицины РНИМУ. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: alееva_l@mail.ru

Сидоренкова Анастасия Феликсовна – лаборант лаборатории клеточной биологии ИБР РАН. Тел. 8-499-135-40-81; e-mail: sidorenkova.anastasia@gmail.com

Воротеляк Екатерина Андреевна – зав. лабораторией клеточной биологии ИБР РАН, руководитель отдела регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины РНИМУ. Тел. 8-499-135-40-81; e-mail: vorotelyak@yandex.ru