

5. Пашкова И.Г., Косоуров А.К. Возрастные изменения шейного отдела позвоночника по данным магнитно-резонансной томографии // Морфология. – 2004. – Т.125, №1. – С. 80-82.
6. Шабалова И.П., Джангирова Т.В., Касоян К.Т. Информационно-экспертные компьютерные системы и морфометрия в цитологической диагностике // Рос. мед. вестн. – 2005. – № 4. – С. 50-55.
7. Naylor B. The century of cytopathology // Acta Cytol. – 2000. – Vol. 44, № 5. – P. 709-725.

### ИНФОРМАЦИОННО-ЭКСПЕРТНЫЕ ПРОГРАММЫ И MORFOMETRIYA OBLASTI POZVO- NOCHNOGO STOLBA V PRENATAL'NOM PERIODE ONTOGENEZA CHELOVEKA

*В.В.Кривецкий*

**Резюме.** При изучении развития области позвоночного столба на 150 гистологических срезах зародышей и предплодов человека применены современные информационно-экспертные программы и предложен новый способ морфометрических исследований.

**Ключевые слова:** позвоночный столб, морфометрия, онтогенез, человек.

### INFORMATION-EXPERT COMPUTER PROGRAMS AND MORPHOMETRY OF A SPINAL COLUMN AREA DURING THE PRENATAL PERIOD OF HUMAN ONTOGENESIS

*V.V.Kryvetskyi*

**Abstract.** Modern information-expert programs were employed and a new measurement technique used in morphometric studies of 150 histologic sections of human embryos and prefetuses was proposed when studying the development of a spinal column area during the prenatal period of human ontogenesis.

**Key words:** vertebral column, morphometry, ontogenesis, human.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Ю.Т.Ахтемійчук

Buk. Med. Herald. – 2007. – Vol.11, №3.- P.125-128

Надійшла до редакції 7.06.2007 року

УДК 616-006.04:618.19:615.373

*О.М.Перепелиціна, Л.В.Гарманчук, М.В.Сидоренко*

### БАГАТОКЛІТИННІ СФЕРОЇДИ КЛІТИН РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛІНІЇ MCF-7: УМОВИ ГЕНЕРАЦІЇ ТА ВПЛИВ СИРОВАТКОВИХ ЧИННИКІВ

Відділення біотехнічних проблем діагностики (зав. – к.мед.н. М.В.Сидоренко)  
Інституту кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України

**Резюме.** Для різних концентрацій ембріональної телячої сироватки (ЕТС) та карбоксиметилцелюлози порівнювали генерацію, ріст та виживання багатоклітинних сфероїдів лінії MCF-7. Виявлено, що оптимальна концентрація ЕТС та карбоксиметилцелюлози становила відповідно 5% та 0,24%. Після 16 год культивування спостерігався найвищий рівень генерації сферо-

їдів з 2% ЕТС, після 48 год цей показник значно знизився. Культивування сфероїдів протягом 48 годин та довше 5% концентрація ЕТС у середовищі інкубації виявлялася оптимальною.

**Ключові слова:** багатоклітинні сфероїди, клітини лінії MCF-7, ембріональна теляча сироватка, карбоксиметилцелюлоза.

**Вступ.** Однією з найбільш адекватних моделей пухлинного росту *in vitro* вважають багатоклітинні мікросфероїди, які поєднують у собі багато властивостей пухлин [1-4] на їх первинній, аваскулярній стадії розвитку, з характерними мікрометастазами та мікрорегіонами. Концентрична структура гетерогенної клітинної популяції в пухлинному сфероїді з проліферувальними клітинами по периферії, середньою зоною зі «сплячими» клітинами та некротичним ядром відповідає моделі солідної пухлини. Подібність сфероїда до справжньої пухлини передбачає ростову кінетику, клітинну гетерогенність, індукцію проліферативних градієнтів, стан спокою, так само як і диференційні характеристики, такі, як розвиток специфічних

гістологічних структур або експресія поверхневих антигенів [5-7]. Більшість пухлинних клітин характеризуються високим метастатичним та низькими адгезивними властивостями і високою здатністю до інвазії. Долаючи бар'єр ендотеліальних клітин, пухлинні клітини прикріплюються до базальної мембрани, утворюють зону лізису та проникають у нормальні тканини, де утворюють зону росту. Для міграції клітин потрібні стимули, пухлинні клітини здатні до аутокринної стимуляції цього процесу. Поряд із цим, утворення пухлинних мікроагрегатів в аваскулярній фазі їхнього росту проходить за умов дефіциту поживних субстратів, тісного контакту проліферувальних клітин у мікропухлинах [1,7,8].

Багатоклітинні сфероїди клітинної культури використовуються як органотипові моделі нормальних та пухлинних тканин [4]. Серед пухлинних клітин модельну систему мікросфероїдів використовують найбільше для тих форм, що характеризуються інвазивним ростом, і в першу чергу це стосується раку грудної залози. Із постійних клітинних ліній, що здатні формувати сфероїди, використовують клітини MCF-7 (аденокарцинома грудної залози) [8-12]. Розроблено технології інкапсуляції сфероїдів клітин MCF-7 та культивування останніх до 5 діб *in vitro* з дослідженням впливу на них протипухлинних агентів [13]. Зафіксовано, що активно проліферувальні клітини в таких сфероїдах розміщені на периферії, у той час як апоптичні клітини сконцентровані ближче до центру сфероїда. При проведенні порівняльних досліджень з використанням інкапсульованих мікросфероїдів та моношарового росту клітин MCF-7 виявлено більш високу адекватність мікросфероїдів щодо впливу цілої низки хімотерапевтичних препаратів [4]. Так, порівняльним аналізом проліферативної активності та інвазивних властивостей для клітин MCF-7 та їх мультирезистентного варіанта (сформованого під впливом цитостатиків), які росли в моношарі та в сфероїдах, виявлено, що проліферативна активність обох досліджуваних варіантів клітин за сфероїдного росту знижена, однак інвазивний потенціал, досліджений у камерах Бойдена для мультирезистентного варіанта клітин значно вищий, ніж для вихідних клітин [10]. Електронномікроскопічні та імуногістохімічні дослідження виявили, що міжклітинні контакти мультирезистентного варіанта сильніші, ніж для MCF-7 вихідних клітин, а також інвазивність корелює із секрецією серинових протеаз та плазміногенового активатора [10].

Інгібування інвазивних властивостей корелює зі зниженням секреції різних чинників: матриксною металопротеїназою-9, активатором тканинного плазміногена [11]. Виявлено, що модифікатором сфероїдоутворення клітинами MCF-7 може виступати опромінення, дозування якого впливає на ріст сфероїдів та на клоногенність клітин у сфероїдах [14]. Одним із напрямків дослідження *in vitro*, що дають перспективу розуміння механізмів диференціювання клітин у сфероїдах, є культивування останніх, отриманих із MCF-7 з нормальним епітелієм грудної залози. Виявлено, що в змішаній культурі ріст клітин MCF-7 гальмується чинниками, котрі секретуються епітелієм у середовище інкубації сфероїдів [6]. При дослідженні гормонозалежної терапії на моделі сфероїдного росту перевагами останніх є відсутність залежності від адгезивних чинників, характерних при моношаровому рості клітин MCF-7. Виявлено, що залежно від розміру сфероїдів відбуваються процеси естроген-залежної проліферації клітин. Так, сфероїди розміром до 200 мкм мають постійну здатність до експресії естрогенових гормонів, збільшення сфероїдів до 700 мкм призводить до зниження їх експресії [12].

**Мета дослідження.** Встановити особливості генерації сфероїдів *in vitro* з використанням клітин лінії MCF-7 за стандартних умов культивування та в умовах модифікувального впливу безсироваткового середовища інкубації.

**Матеріал і методи.** Як експериментальна модельна система використана адгезивна лінія пухлинних клітин MCF-7, що за своїм походженням належить до аденокарциноми грудної залози [10,11,14]. Клітини культивувалися в повному поживному середовищі DMEM ("Sigma", США), що містило 10% ЕТС (Sigma, США), 2 мМ L-глутаміну (Sigma, США) і 40 мкг/мл гентаміцину сульфату (Біофарма, Україна) за стандартних умов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% вологості, а також за умов дефіциту сироваткових чинників (з додаванням 2-5% ЕТС та за її повної відсутності). Для початкової генерації сфероїдів використовували карбоксиметилцелюлозу (Bio-Rad, США) [4,5]. Концентрований (2%) розчин фільтрували через 0,2 мкм одноразовий фільтр (Sigma, США) та зберігали при температурі +4°C.

Для одержання сфероїдного росту клітини лінії MCF-7 інкубували за стандартних умов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% вологості у повному поживному середовищі у флаконах (25 см<sup>2</sup>, Nunc, Данія). По досягненні клітинами моношарового росту, їх знімали з використанням розчину Версена (0,025 М ЕДТА) та додаванням 0,25% розчину трипсину (Chemapol, Чехія), висаджували на чашки з малоадгезивними властивостями з початковою щільністю 50 000 клітин/мл, додавали карбоксиметилцелюлозу до кінцевої концентрації 0,24% [5]. Чашки з клітинами закріплювали на підставку, на якій при слабкій ротації інкубували за стандартних умов протягом години. Після цього клітини інкубували без перемішування протягом 6 год та візуально підраховували кількість утворених сфероїдів на одиницю площі (чашка має розмічену робочу поверхню).

Отримані клітинні сфероїди переносили в центрифужні пробірки, осаджували при 150 g протягом 3 хв, відбирали надосадкову рідину та розсаджували по 50 мкл в 24-ямкові планшети (Nunc, Данія) в приготоване середовище інкубації з різним вмістом ЕТС (0-10%). Для кожної концентрації сироватки та терміну інкубації, клітинні сфероїди висаджували в триплетах. Підраховували кількість сфероїдів в кожній ямці в 3 полях зору і визначали середню кількість у полі зору. Потім відбирали надосадкову рідину, що містила фракцію сфероїдів, та переносили в окрему ємність. Дезінтегрували клітинні конгломерати з використанням трипсину та підраховували кількість клітин рутинним методом. Клітини, прикріплені до дна планшета, знімали розчином трипсину та підраховували кількість клітин поза суспензією. (Цю процедуру проводили для двох часових інтервалів інкубації клітин – 16 та 48 год). Після цього відбирали рівні аліквоти із прикріплених та клітин суспензії кожної ямки та підраховували загальну кількість клітин для кожної

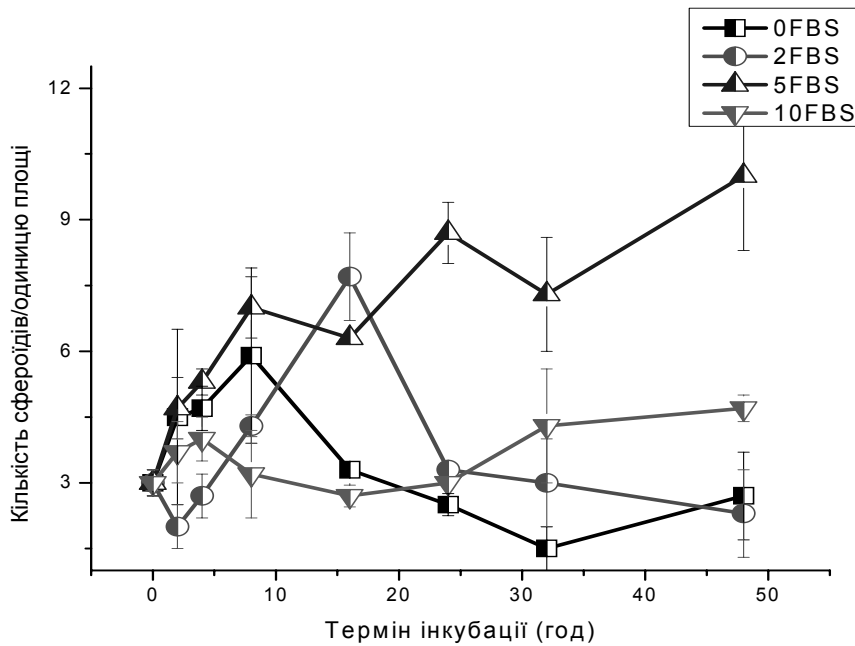


Рис.1. Кількість сфероїдів у полі зору при інкубації клітин різного терміну (0-48 год) та з різним вмістом ЕТС (0-10%) у середовищі інкубації

ямки, а також відсоток мертвих. Для всіх інших часових інтервалів підрахунок живих та мертвих клітин проводили в об'єднаній фракції клітин, що містили як адгезивні, так і клітини із сфероїдів з використанням камери Горяєва та вітального барвника трипанового синього.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за параметричним (t-критерій Стьюдента) та непараметричним (Вілкоксона) критеріями. У роботі використовували пакети прикладних комп'ютерних програм Origin 7,5.

#### Результати дослідження та їх обговорення.

У результаті проведеного дослідження виявлено, що кількість сфероїдів залежить як від терміну інкубації, так і відсотка сироватки в середовищі інкубації. Отримані дані свідчать, що оптимальна концентрація сироватки для генерації сфероїдів становить 5% (рис. 1).

Слід відмітити, що при висаджуванні сфероїдів на 24-ямові планшети після адгезивних чашок, кількість сфероїдів у полі зору становила в середньому  $3 \pm 0,5$  тис. клітин. Водночас були присутні клітини поза сфероїдами, а в окремих випадках розпластані на поверхні планшета. Через годину перемішування при слабкій ротації майже ніяких змін у кількості сфероїдів не спостерігалось, однак через дві години, при концентрації сироватки 5% кількість сфероїдів у полі зору дорівнювала  $4 \pm 0,7$  тис., у той же час у середовищі з 2% сироватки кількість сфероїдів зменшувалась до  $2 \pm 0,3$  тис. Натомість, за відсутності в середовищі сироватки відмічено збільшення кількості сфероїдів у полі зору в часовому інтервалі до 8 год. Після цього терміну кількість сфероїдів у середовищі інкубації без сироватки вірогідно знижується ( $p < 0,01$ ) порівняно з таким при інкубації сфероїдів у середовищі, що містило 5% сироватки впродовж до останньої точки спостереження – 48 годин (рис.1).

Зафіксовано зменшення кількості сфероїдів через 2 години інкубації з 2% сироватки, у той час, як через 16 годин за цих умов спостерігалася максимальна кількість генерованих сфероїдів (майже трикратне збільшення ( $p < 0,05$ )). Після цього, з 2% ЕТС у середовищі інкубації спостерігалось різке зниження кількості сфероїдів у полі зору впродовж 48 годин інкубації (рис.1). Слід відмітити, що сфероїди за розмірами при різних концентраціях ЕТС та за її відсутності були різними: найбільші конгломерати клітин відмічено в середовищі інкубації з 10% сироватки, найменші з 2% сироватки (візуальні спостереження). За формою сфероїди теж відрізнялись: правильна кулькоподібна форма в середовищі з 10% ЕТС, еліпсоїдна - за відсутності сироватки. Також помічено, що деякі сфероїди за відсутності ЕТС у середовищі інкубації начебто "прикріплені" до поверхні планшета, особливо це помітно при інкубації клітин терміном до 48 год. Окрім визначення кількості сфероїдів у полі зору, підраховували відсоток мертвих клітин у кожній ямці для кожного часового терміну та умов інкубації. Для двох часових термінів інкубації клітин, а саме для 16 та 48 год проводили підрахунок у суспензії генерованих сфероїдів. Потім дезінтегрували розпластані клітини з використанням трипсину та проводили підрахунок клітин, прикріплених до планшета. У результаті цього експерименту виявлено, що загальна кількість клітин та відсоток мертвих суттєво залежали від відсотка ЕТС у середовищі інкубації та терміну інкубації клітин (табл.1).

Як видно з наведених даних, найменша кількість клітин була в середовищі, в якому відсутня сироватка. Також виявлено, що відсоток мертвих клітин за відсутності ЕТС максимальний (табл. 1). Натомість, відсоток мертвих клітин за

Таблиця 1

**Загальна кількість клітин лінії MCF-7 та відсоток мертвих за умов різного вмісту ЕТС в середовищі інкубації**

Час інкубації (год)	Умови інкубації							
	Без сироватки		2% сироватки		5% сироватки		10% сироватки	
	Кількість клітин (тис.)	% мертвих	Кількість клітин (тис.)	% мертвих	Кількість клітин (тис.)	% мертвих	Кількість клітин (тис.)	% мертвих
4	28±3,1	7±3,2	31±4,9	3±0,2	26±3,9	7±3,2	32±3,1	4±2,2
8	29±4,3	11±4	32±7,0	12±4,9	32±8,3	3±0,4	29±4,9	8±4,1
16	27,5±1,4	9±0,3	37±3,3	10±0,3	37±4,3	5,2±3	34±0,7	7±4,9
24	30,5±2,7	15±7	41±0,7	9±4,7	34±4,3	13±4,3	48±11,7	9,3±0,3
32	26,5±5	19±3,0	43±4,3	14±0,7	45±4,3	7±4,9	52±7,3	8,4±2,5
48	31,0±1	27±8*	45±7,0	18±2,2	49±4,3	14±0,9	54,9±9,1*	7,8±3,1

Таблиця 2

**Кількість клітин у суспензії (фракція сфероїдів; N сфер) та розпластуваних на поверхні планшета (N адг) при інкубації клітин 16 та 48 годин з різним вмістом ЕТС**

Час інкубації (год)	Умови інкубації*							
	Без сироватки		2% сироватки		5% сироватки		10% сироватки	
	N сфер** (тис.)	N адг. (тис.)	N сфер (тис.)	N адг (тис.)	N сфер (тис.)	N адг (тис.)	N сфер (тис.)	N адг (тис.)
16	8,0±4,0	20,1±1,7	31±3,3 <sup>1</sup>	5±1,3	28,2±2,3#	9,2±0,9	21,7±1,7	15±3,9
48	9,4±2,3	22,8±0,8	15,2±7,4	32,5±4,2	43±0,9	5±2,9	34,7±3,5	24,5±5

Примітка. \* – в усіх випадках у середовищі інкубації наявна карбоксиметилцелюлоза (0,24%); \*\* – мова йде про загальну кількість клітин у фракції сфероїдів; # – загальна кількість клітин у сфероїдах вірогідно збільшується в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup> – загальна кількість клітин у сфероїдах перевищувала таку у фракції адгезивних клітин у 6 разів ( $p < 0,05$ )

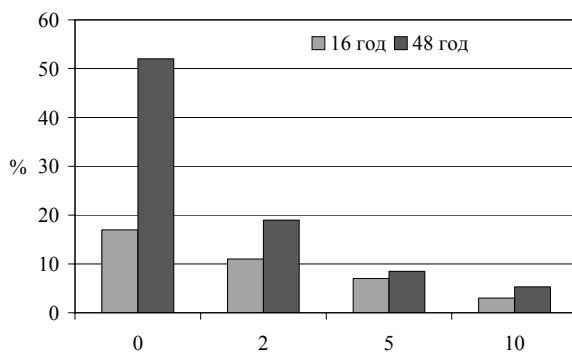


Рис.2. Відсоток мертвих клітин MCF-7 у фракції сфероїдів при інкубації клітин за умов з різним вмістом ЕТС (0-10%) через 16 (темні стовпчики) та 48 год інкубації (світлі стовпчики) відповідно

умов інкубації з 10% ЕТС не перевищував 10-12%. Крім того, при 10% концентрації ЕТС у середовищі інкубації виявлено найвищу проліферативну активність клітин. У термін інкубації 48 год виявлено майже двократне ( $p < 0,05$ ) збільшення загальної кількості клітин порівняно з початковою точкою.

Генерацію сфероїдів досліджували опосередковано, через підрахунок клітин у суспензії. У результаті підрахунку виявлено, що кількість клітин у суспензії (фракція сфероїдів) через 16 годин інкубації найбільша при 2% ЕТС, а через 48 годин - при 5% ЕТС (табл. 2).

Визначення відсотка мертвих клітин у фракції сфероїдів свідчить за найбільший цей показ-

ник у середовищі інкубації за відсутності ЕТС (рис. 2).

Як видно з наведених даних, цей показник досягав 52% у середовищі з дефіцитом сироваткових чинників. Однак кількість мертвих клітин, певно, залежала від умов інкубації і не обов'язково належала клітинам, які були у сфероїдів.

Співвідношення у відсотках наступне: найбільший відсоток клітин, що знаходились у суспензії, був через 48 год інкубації клітин з 5% сироватки (рис. 3).

Як продемонстровано у наведених даних, відсоток клітин у суспензії також високий при інкубації клітин 16 годин у середовищі з 2% ЕТС.

Запропонована модель продемонструвала, що сироватка та карбоксиметилцелюлоза є необхідними чинниками генерації сфероїдів клітинами MCF-7 за стандартних умов культивування в чашках Петрі та планшетах. Нестача сироватки призводить до гальмування росту клітин, а недостатня концентрація карбоксиметилцелюлози – до підвищення адгезивних характеристик клітин та зменшення ефективності формування сфероїдів. Цілком можливо, що різні концентрації карбоксиметилцелюлози можна використовувати для генерації сфероїдів з переважною, заздалегідь визначеною, кількістю клітин в одному агрегаті.

Підсумовуючи отримані результати, слід зазначити, що найбільше сфероїдів клітинами MCF-7 формується в середовищі з 5% ЕТС та 0,24% карбоксиметилцелюлози. У той же час, за умов відсутності сироватки протягом 48 годин інкубації різко зростає кількість мертвих клітин у

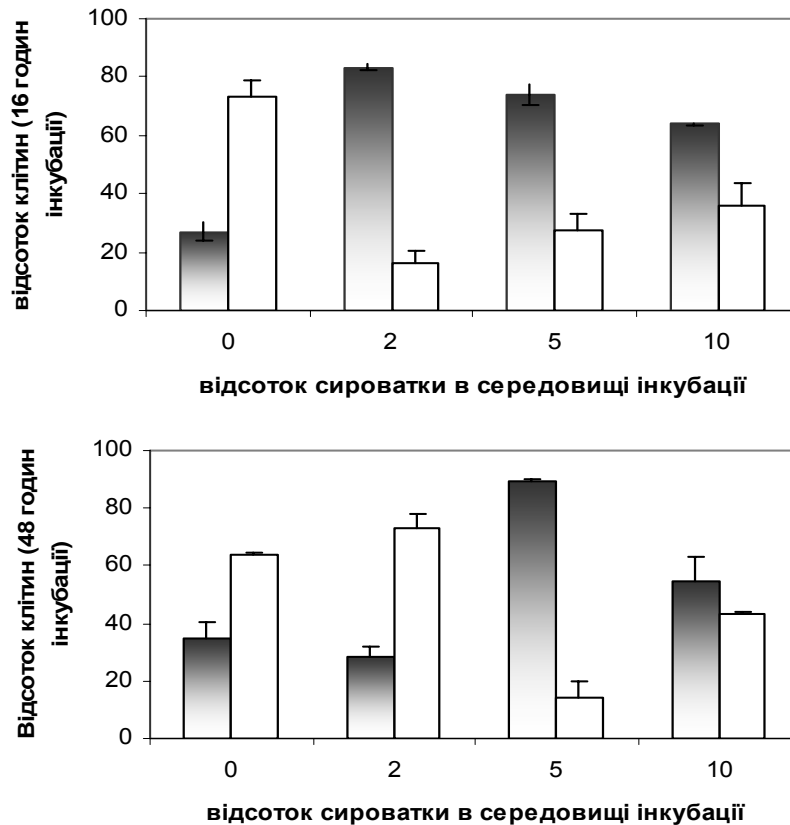


Рис.3. Відсоток клітин MCF-7, які знаходились у надосаді (фракція сфероїдів; темні стовпчики) та були прикріплені (світлі стовпчики) через 16 годин інкубації (а) та 48 годин (б) у середовищі з різним вмістом сироватки та за її відсутності

фракції сфероїдів. Саме ця концентрація ЕТС у середовищі інкубації клітин дозволить найбільш оптимізувати та стандартизувати умови для генерації сфероїдів з метою подальшого дослідження впливу різних агентів на процес сфероїдоутворення. Строк культивування сфероїдів у запропонованих умовах обмежений, навіть при регулярній заміні середовища та відборі надлишку клітин. Збільшення кількості клітин в одному агрегаті перешкоджає проникненню поживних речовин до внутрішніх шарів сфероїда, гальмує його ріст та сприяє некрозу.

#### Висновки

1. З використанням лінії пухлинних клітин MCF-7 та протиадгезивного агента карбоксиметилцелюлози створено умови для генерації сфероїдів за стандартних умов культивування, оптимальна концентрація останньої в середовищі для генерації сфероїдів становила 0,24%.

2. Визначено, що оптимальна концентрація сироватки в середовищі інкубації клітин для генерації сфероїдів, дорівнює 5%.

3. Показано, що за умов модифікації культурального середовища відсутністю ЕТС, кількість сфероїдів у середовищі інкубації збільшується через 16 годин інкубації та досягає початкового рівня через 48 годин інкубації клітин.

4. Кількість мертвих клітин у фракції сфероїдів за відсутності ЕТС досягає  $52 \pm 7,1\%$ , проти  $8,5 \pm 4,1\%$  при 5% сироватки та  $5,3 \pm 1,7\%$  при 10% сироватки в середовищі інкубації клітин MCF-7.

5. Невеликі за розміром сфероїди перших годин культивування мають майже експоненціальну криву росту, у той час, коли зі збільшенням розмірів агрегатів, зростає втрата клітин через нестачу поживних речовин.

**Перспектива подальших досліджень.** Постійна ротація (перемішування) сфероїдів у культуральному середовищі може дозволити подовжити строк культивування до кількох місяців. У подальшому це й буде одним із предметів нашої уваги, оскільки модель сфероїдного росту пухлинних клітин в останній час широко входить в онкологічну практику. Цей методичний підхід дозволяє не тільки в максимально наближених умовах *in vitro* досліджувати молекулярно-біологічні та біохімічні механізми, що характеризують мікропухлину, але й проектувати отримані результати на процеси, що відбуваються *in vivo*, і в особливості за умов цілеспрямованого впливу протипухлинних препаратів.

#### Література

1. Muller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical application // *Am.J.Physiol.* – 1997. – Vol.273. – P.1109-1123.
2. Sutherland R.M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model // *Science.* - 1998. – Vol.240. – P.177-184.
3. Nicholson K.M., Bibby M.C., Phillips R.M. Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids // *Eur. J. Cancer.* - 1997. – Vol.33(8). – P.1291-1298.

4. Kelm J.M., Timmins N.E., Brown C.J., Fussenegger M., Nielsen L.K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types // *Biotechnol. Bioeng.* - 2003. - Vol.83(2). - P.173-180.
5. Korff T., Augustin H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevent apoptosis and induced differentiation // *J. Cell Biology.* - 1998. - Vol.143. - P.1341-1352.
6. Quarrie L.H., Pitts J.D., Finbow M.E. Interactions between normal mammary epithelial cells and mammary tumour cells in a model system // *Cell. Prolif.* - 1999. - Vol.32(6). - P.351-361.
7. Borgstrom P., Gold D.P., Hillan K.J., Ferrara N. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin // *Anticancer Res.* - 1999. - Vol.19 (5B). - P.4203-4214.
8. dit Faute M.A., Laurent L., Ploton D., Poupon M.F., Jardillier J.C., Bobichon H. Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance and cell-cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human breast cancer cell line, and its multidrug resistant variant // *Clin. Exp. Metastasis.* - 2002. - Vol.19(2). - P.161-168.
9. Affoue M., Akeli M.G., Gueddari N., Jardillier J.C., Madoulet C. Effects of all-trans-retinoic acid incorporated into low-density lipoprotein on invasive properties of multidrug-resistant MCF-7 spheroids // *Invasion Metastasis.* - 1998-1999. - Vol.18 (5-6). - P.229-239.
10. Jardillier J.C., Affoue M., Bobichon H., Delvincourt C., Madoulet C. Detection of metastatic activity of the MCF-7 multidrug resistant cell line cultured in spheroids // *Bull. Acad. Natl. Med.* - 1998. - Vol.182(3). - P.651-661.
11. Kearney T., Hughes A., Hanson R.N., DeSombre E.R. Radiotoxicity of Auger electron-emitting estrogens in MCF-7 spheroids: a potential treatment for estrogen receptor-positive tumors // *Radiat. Res.* - 1999. - Vol.151(5). - P.570-579.
12. Zhang X., Wang W., Yu W., Xie Y., Zhang X., Zhang Y., Ma X. Development of an in vitro multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing // *Biotechnol. Prog.* - 2005. - Vol.21(4). - P.1289-1296.
13. Guirado D., Aranda M., Vilches M., Villalobos M., Lallena A.M. Dose dependence of the growth rate of multicellular tumour spheroids after irradiation // *Br. J. Radiobiol.* - 2003. - Vol.76(902). - P.109-116.
14. Olea N., Villalobos M., Ruiz de Almodovar J.M., Pedraza V. MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 beta-estradiol // *Int. J. Cancer.* - 1992. - Vol.50(1). - P.112-117.

#### МНОГОКЛЕТОЧНЫЕ СФЕРОИДЫ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ MCF-7: УСЛОВИЯ ГЕНЕРАЦИИ И ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТОЧНЫХ ФАКТОРОВ

*О.М.Перепельцина, Л.В.Гарманчук, М.В.Сидоренко*

**Резюме.** Для разных концентраций эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и карбоксиметилцеллюлозы сравнивали генерацию, рост и выживание многоклеточных сфероидов линии MCF-7. Выявлено, что оптимальная концентрация ЭТС и карбоксиметилцеллюлозы составляла соответственно 5% и 0,24%. После 16 часов культивирования наблюдался наивысший уровень генерации сфероидов с 2% ЭТС, после 48 часов этот показатель значительно снизился. Культивирование сфероидов на протяжении 48 часов и более 5% концентрация ЭТС в среде инкубации выявилась оптимальной.

**Ключевые слова:** многоклеточные сфериды, клеточная линия MCF-7, эмбриональная телячья сыворотка, карбоксиметилцеллюлоза

#### MULTICELLULAR SPHEROIDS OF MCF-7 BREAST CANCER CELL LINE: GENERATION CONDITIONS AND THE EFFECT OF SERUM FACTORS

*O.M.Perepelytsina, L.V.Harmanchuk, M.V.Sydorenko*

**Abstract.** The authors compared the generation, growth and survival of MCF-7-line multicellular spheroids for different concentrations of embryonal bovine serum (EBS). It was revealed that the optimal concentration of EBS and carboxymethylcellulose constituted respectively 5% and 0.24%. Upon 16 h of culturing the highest level of generating spheroids with 2% EBS was observed, after 48 h this index considerably decreased. Spheroid culturing during 48 h and longer with the help of 5% EBS in the incubation medium turned out to be optimal.

**Key words:** multicellular spheroids, MCF-7 line cells, embryonal bovine serum, carboxymethylcellulose.

Institute of Cryobiology and Cryomedicine (Kyiv)

Рецензент – проф. І.С.Давиденко

Buk. Med. Herald. – 2007. – Vol.11, №3. - P.128-133

Надійшла до редакції 27.03.2007 року