

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

А.К. Лапенко*, Л.Н. Комарова

Обнинский институт атомной энергетики — филиал ФГАОУ ВО
«Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»
249039, Российская Федерация, Калужская обл., г.о. Обнинск, тер. Студгородок, 1

Хорошо известно, что для исследования реакции тканей на действие любых факторов лучше использовать трехмерные клеточные модели, т.к. именно они обеспечивают физиологическое состояние клеточных популяций. В данной работе приведены результаты исследования показателей метаболической активности и морфологических свойств трехмерных клеточных моделей (сфероидов), полученных из фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104 и фибробластов человека hTERT. Клеточные сфероиды получали методом низкоадгезивной поверхности. Для получения сфероидов использовали следующие концентрации клеток: 5, 8, 10, 15, 30, 60 тыс. клеток/сфероид. Оценку метаболической активности сфероидов проводили с помощью МТТ-теста. В работе выявлена зависимость исследуемых показателей сфероидов от типа клеточных линий, из которых они получены, а также от начальной концентрации клеток.

Ключевые слова: сфероиды, фибробласты ФЛЭЧ-104, фибробласты hTERT, 3D-культивирование, доклинические модели

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Лапенко А.К., Комарова Л.Н. Исследование метаболической активности и морфологических свойств клеточных сфероидов, полученных из фибробластов человека. *Биомедицина*. 2025;21(4):67–72. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-4-67-72>

Поступила 11.04.2025

Принята после доработки 01.10.2025

Опубликована 10.12.2025

INVESTIGATION OF METABOLIC AND MORPHOMETRIC DYNAMICS OF HUMAN FIBROBLAST SPHEROIDS

Alina K. Lapenko*, Ludmila N. Komarova

Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering — Branch of the National Research Nuclear University
“MEPhI” (Moscow Engineering Physics Institute)
249039, Russian Federation, Kaluga Region, Obninsk, Studgorodok, 1

Three-dimensional cellular models are known to be optimal for studying the response of tissues to external factors due to their ability to accurately replicate the physiological state of cell populations. The present study investigates the metabolic activity and morphological properties of three-dimensional cellular models (spheroids) obtained from human embryo lung fibroblasts FLEH-104 and human fibroblasts hTERT. Cellular spheroids were obtained by means of the low-adhesive surface method using the following cell concentrations: 5, 8, 10, 15, 30, 60 thousand cells/spheroid. The metabolic activity of the as-obtained spheroids was assessed using an MTT-test. The study revealed the dependence of the studied parameters of spheroids on the type of cell lines from which they were obtained, as well as on the initial concentration of cells.

Keywords: spheroids, FLEH-104 fibroblasts, hTERT fibroblasts, 3D cultivation, preclinical models

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Lapenko A.K., Komarova L.N. Investigation of Metabolic and Morphometric Dynamics of Human Fibroblast Spheroids. *Journal Biomed.* 2025;21(4):67–72. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-4-67-72>

Submitted 11.04.2025

Revised 01.10.2025

Published 10.12.2025

Введение

Клеточные сфероиды являются одним из типов трехмерных клеточных моделей, которые частично способны воспроизводить физиологические условия клеточных популяций [3]. Характерными особенностями клеточных сфероидов являются наличие градиента кислорода, питательных веществ, продуктов метаболизма, гетерогенности состава [6]. Клеточные сфероиды из фибробластов — актуальная модель для исследования множества биологических процессов. Так, например, теломеризованные фибробласты могут выступать в качестве объекта исследований патологических гипертрофических рубцов *in vitro* [5]. Клеточные сфероиды, полученные из фибробластов, способны имитировать механизмы, которые лежат в основе развития фиброза [4]. В связи с широким применением клеточных сфероидов из фибробластов изучение закономерностей изменения их метаболических характеристик и размеров от начальной концентрации клеток является особо актуальным.

Цель работы — оценить изменение метаболической активности и размеров сфероидов из различных клеточных линий фибробластов человека от начальной концентрации клеток.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были выбраны фибробласты легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104 (FLEH-104) и телеме-

ризованные фибробласты человека hTERT (fb-hTERT).

Культивирование клеток в монослое проводилось по стандартной методике [2]. В виде монослоя клетки культивировали в пластиковых культуральных флаконах (“Corning”, США) в полной питательной среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Gibco”, США), пенициллин (50000 ед./л) («ПанЭко», Россия), стрептомицин (50 мг/л) («ПанЭко», Россия) и глютамин (292 мг/л) («ПанЭко», Россия). Поддерживали жизнеспособность культур в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C (“CB 53 Binder”, Германия) и при 5% содержании CO₂.

Клеточные сфероиды получали методом культивирования на низкоадгезивной поверхности [1]. Для достижения условий низкой адгезии лунки 96-луночного планшета покрывали 1,5% р-ром агарозы. Для создания сфероидов использовали следующие концентрации клеток: 5, 8, 10, 15, 30, 60 тыс. клеток/сфероид. Культивирование сфероидов осуществляли в течение 15 дней. Целостность агарозного покрытия и морфометрические свойства сфероидов оценивали с помощью инвертированного микроскопа «Микромед И». Метаболическую активность клеток в составе сфероида оценивали проведением МТТ-теста. Определение диаметра клеточных сфероидов проводили с помощью описанного нами ранее метода, основанного на использовании технологий

компьютерного зрения [7]. Для каждой исследуемой концентрации сфероидов получено 30 сфероидов. Статистическую обработку полученных данных и их визуализацию проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8.

Результаты и их обсуждение

Клеточные сфероиды, полученные из клеточной линии фибробластов человека hTERT, имели ровный округлый край. Сфероиды сохраняли округлую форму до 15 сут культивирования. Сфероиды, полученные из клеточной линии фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104, также имели ровный округлый край. Сфероиды сохраняли округлую форму до 15 сут культивирования.

На рис. 1 показано изменение диаметра сфероидов из клеточных линий ФЛЭЧ-104 (панель А) и hTERT (панель Б) в процессе культивирования. В процессе культивирования у всех групп клеточных сфероидов отмечалось уменьшение диаметра. Это наблюдение соответствует современным представлениям о поведении трехмерных клеточных культур. Примечательно, что степень компактизации клеточных сфероидов пропорциональна первоначальному количеству клеток: чем больше по-

севная концентрация, тем более выражено уменьшение диаметра. Уменьшение диаметра было замечено у сфероидов с максимальной первоначальной концентрацией 60000 кл./сфероид. Это может быть связано с высокой концентрацией клеток, а следовательно, большей их компактизацией. Выявленного уменьшения диаметра сфероидов с остальными исходными концентрациями не наблюдали.

Выявлено, что сфероиды, полученные из теломеризированных фибробластов человека hTERT, имели меньший диаметр, чем сфероиды, полученные из фибробластов легких ФЛЭЧ-104, это может быть обусловлено особенностями пролиферативной активности используемых клеточных линий и требует дополнительных исследований.

На рис. 2 показано изменение метаболической активности сфероидов из клеточных линий фибробластов человека ФЛЭЧ-104 (панель А) и hTERT (панель Б) в процессе культивирования.

Видно, что выраженный рост метаболической активности наблюдался у сфероидов из клеток FLEH-104, образованных при посевой концентрации клеток 5000, 8000, 10000, 15000 кл./сфероид. У сфероидов, образованных из 30000 кл./сфероид, снижения метаболической активности в те-

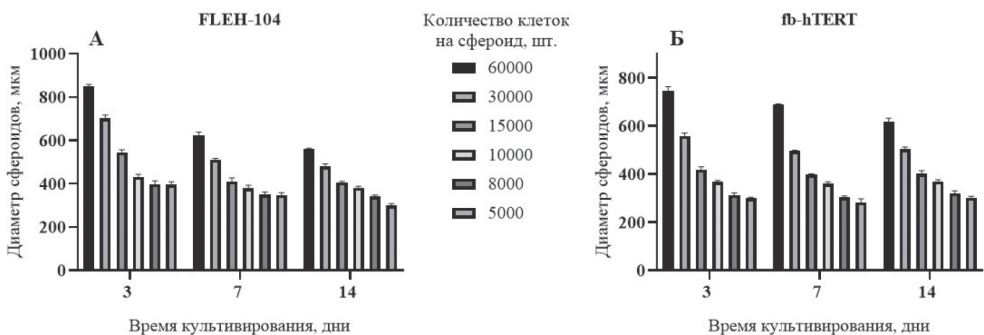


Рис. 1. Изменение диаметра сфероидов из клеточных линий ФЛЭЧ-104 (А) и фибробластов человека hTERT (Б) в процессе культивирования.

Fig. 1. Changes in the diameter of spheroids from cell lines FLECH-104 (A) and human fibroblasts hTERT (B) during cultivation.

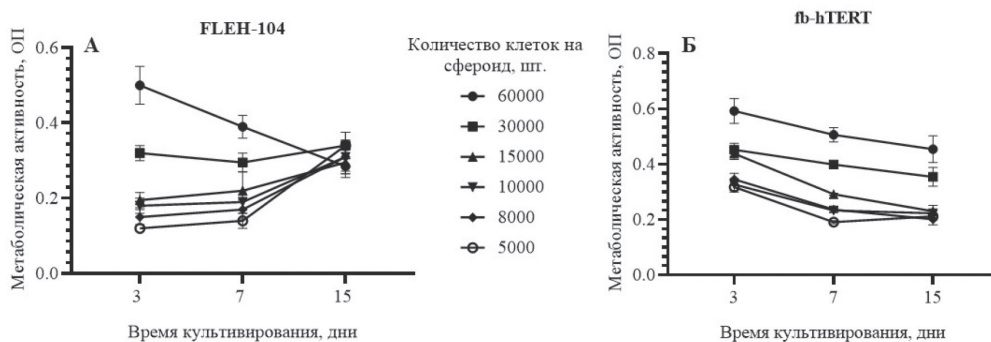


Рис. 2. Изменение метаболической активности сфероидов из клеточных линий ФЛЭЧ-104 (А) и фибробластов человека hTERT (Б) в процессе культивирования.

Fig. 2. Changes in the metabolic activity of spheroids from FLECH-104 (A) cell lines and hTERT (Б) human fibroblasts during cultivation.

чение 15 сут не наблюдалось. Выраженное снижение метаболической активности было замечено на сфероиде, образованном из 60000 кл./сфероид. В процессе культивирования клеточных сфероидов из клеток фибробластов человека hTERT метаболическая активность клеточных сфероидов снижается независимо от исходной концентрации клеток. Закономерное уменьшение количества метаболически активных клеток может быть обусловлено формированием в составе сфероида фракции погибших клеточных популяций.

Выводы

В ходе проведенного исследования были получены трехмерные клеточные модели из фибробластов человека hTERT и фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104 при различных посевных концентрациях: 5000, 8000, 10000, 15000, 30000 и 60000 клеток на сфероид. Основной целью работы было изучение влияния начальной клеточной концентрации на метаболическую активность и диаметр сфероидов из клеточных линий фибробластов, что имеет важное значение для дальнейших исследований с использованием этих клеточных культур.

Было установлено, что чем выше начальная клеточная концентрация, тем выше степень компактизации клеточных сфероидов. Установленные принципы изменения диаметра сфероидов в зависимости от начальной клеточной концентрации важны для стандартизации методов получения трехмерных клеточных культур, поскольку начальная концентрация клеток является способом регулирования размера клеточных сфероидов. Полученные результаты могут быть применены для создания клеточных сфероидов, которые будут использоваться в области регенеративной медицины, в частности в 3D-биопринтинге, т.к. для этого необходимы клеточные сфероиды определенных размеров. Диаметр клеточных сфероидов является одним из ключевых параметров, анализируемых в исследованиях для оценки эффектов действия терапевтических агентов. Представленные результаты позволят избежать ложных выводов в анализе эффектов изучаемых факторов, что является важным аспектом для дальнейших исследований в области клеточной биологии и разработке новых терапевтических подходов.

Результаты показали, что метаболическая активность клеточных сфероидов из указанных клеточных линий фибробластов

человека зависит от начальной концентрации клеток. Метаболическая активность сфероидов из фибробластов hTERT снижается в исследуемом диапазоне от 5000 до 60000 кл./сфероид. Напротив, метаболическая активность клеточных сфероидов из фибробластов легкого эмбриона человека ФЛЭЧ-104 в начальных клеточных концентрациях 5000, 8000, 10000, 15000 кл./сфероид повышается, при концентрации 30000 кл./сфероид — не изменяется. Для клеточных сфероидов из фибробластов легкого эмбриона человека 60000 кл./сфероид характерно снижение метаболической активности в процессе культивирования. Выявленные закономерности имеют существенное значение, поскольку характер

изменения метаболической активности клеток в составе сфероида является критически важным параметром для применения в фармацевтических исследованиях, регенеративной медицине и моделировании биологических процессов. Показанные различия в изменении метаболической активности клеточных сфероидов из фибробластов различного происхождения могут быть использованы при выборе объектов в соответствии с задачами исследований.

Таким образом, результаты нашего исследования не только подтверждают существующие представления о поведении трехмерных клеточных культур, но и открывают новые горизонты для их применения в биомедицинских исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Грядунова А.А., Буланова Е.А., Кудан Е.В., Перейра Ф.Д.А.С., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А. Масштабируемая биофабрикация и морфологическая оценка тканевых сфероидов. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019;8(2):12–20. [Gryadunova A.A., Bulanova E.A., Kudan E.V., Pereira F.D.A.S., Hesuan Yu.D., Mironov V.A. Masshtabiruemaya biofabrikatsiya i morfologicheskaya otsenka tkanevykh sferoidov [Scalable biofabrication and morphological evaluation of tissue spheroids]. *Clinical and experimental morphology*. 2019;8(2):12–20. (In Russian)].
2. Работа с культурами клеток. Уч.-метод. пособие. Под ред. Черкасовой Е.И., Брилкиной А.А. Н. Новгород: Изд-во Нижегородского университета, 2015:57. [*Rabota s kulturami kletok. Uch.-metod. posob.* [Working with cell cultures. Teaching aid]. Ed. by Cherkasova E.I., Brilkina A.A. N. Novgorod: Izd-vo Nizhegorodskogo universiteta, 2015:57. (In Russian)].
3. Согомонян А.С. и др. Метод получения трехмерных клеточных сфероидов: универсальный инструмент для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соединений *in vitro*. *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2022;14.(1):92–100. [Sogomonian A.S., et al. Metod polucheniya trekhmernykh kletochnykh sferoidov: universalnyi instrument dlya izucheniya tsitotoksicheskikh svoystv protivopukholevykh soedinenii *in vitro* [Method for obtaining three-dimensional cellular spheroids: a universal tool for studying the cytotoxic properties of antitumor compounds *in vitro*]. *Acta Naturae (Russian version)*. 2022;14.(1):92–100. (In Russian)].
4. Толстолужинская А.Е., Басалова Н.А., Карагаур М.Н., Еремичев П.Ю. Создание 3D модели, имитирующей структуру фибротического фокуса. *Мат-лы XXVIII Всеросс. конф. молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины»*. СПб.: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова. 2022:353–354. [Tolstoluzhinskaya A.E., Basalova N.A., Karagaur M.N., Eremichev R.Yu. Sozдание 3D modeli, imitiruyushchei strukturu fibroticheskogo fokusa. *Mat-ly XXVIII Vseross. konf. molodykh uchennykh s mezhdunarodnym uchastiem «Aktualnye problemy biomeditsiny»*. СПб.: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова. 2022:353–354. (In Russian)].
5. Шадрин В.С., Кожин П.М., Шошина О.О., Лузгина Н.Г., Русанов А.Л. Теломеризованные фибробласты как потенциальный объект для 3D-моделирования патологических гипертрофических рубцов *in vitro*. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2020;5:82–90. [Shadrin V.S., Kozhin P.M., Shoshina O.O., Luzgina N.G., Rusanov A.L. Telomerizovannye fibroblasty kak potentsialnyi obekt dlya 3D-modelirovaniya patologicheskikh gipertroficheskikh rubtsov *in vitro* [Telomerized fibroblasts as a potential object for 3D modeling of pathological hypertrophic scars *in vitro*]. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of the Russian State Medical University]. 2020;5:82–90. (In Russian)].

6. Białkowska K., Komorowski P., Bryszewska M., Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(17):6225. DOI: 10.3390/ijms21176225.
7. Lapenko A.K., Olkhovaya Y.R., Kuptsova P.S., Chudnovets T.A., Lyapunova Y.R., Komarova L.N. Size analysis of three-dimensional cellular models with computer vision technology. *J. of Bioinformatics and Genomics.* 2024;4(26). DOI: 10.60797/jbg.2024.26.1.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Лапенко Алина Константиновна*, Обнинский институт атомной энергетики — филиал ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»;
e-mail: lapenkoak23@oiate.ru

Alina K. Lapenko*, Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering — Branch of the National Research Nuclear University “MEPhI” (Moscow Engineering Physics Institute);
e-mail: lapenkoak23@oiate.ru

Комарова Людмила Николаевна, д.б.н., проф., Обнинский институт атомной энергетики — филиал ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»;
e-mail: komarova_l411@mail.ru

Ludmila N. Komarova, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering — Branch of the National Research Nuclear University “MEPhI” (Moscow Engineering Physics Institute);
e-mail: komarova_l411@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author