

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 сфераиды являются одним из типов трехмерных клеточных моделей, которые частично способны воспроизводить физиологические условия клеточных популяций [3]. Характерными особенностями клеточных сфераидов являются наличие градиента кислорода, питательных веществ, продуктов метаболизма, гетерогенности состава [6]. Клеточные сфераиды из фибробластов — актуальная модель для исследования множества биологических процессов. Так, например, теломеризованные фибробlastы могут выступать в качестве объекта исследований патологических гипертрофических рубцов *in vitro* [5]. Клеточные сфераиды, полученные из фибробластов, способны имитировать механизмы, которые лежат в основе развития фиброза [4]. В связи с широким применением клеточных сфераидов 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 сфераидов 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 теломе-

ризованные фибробlastы человека hTERT (fb-hTERT).

Культивирование клеток в монослое проводилось по стандартной методике [2]. В виде монослоя клетки культивировали в пластиковых культуральных фляконах (“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 сфераиды получали методом культивирования на низкоадгезивной поверхности [1]. Для достижения условий низкой адгезии лунки 96-луночного планшета покрывали 1,5% р-ром агарозы. Для создания сфераидов использовали следующие концентрации клеток: 5, 8, 10, 15, 30, 60 тыс. клеток/сфераид. Культивирование сфераидов осуществляли в течение 15 дней. Целостность агарозного покрытия и морфометрические свойства сфераидов оценивали с помощью инвертированного микроскопа «Микромед И». Метаболическую активность клеток в составе сфераида оценивали проведением МТТ-теста. Определение диаметра клеточных сфераидов проводили с помощью описанного нами ранее метода, основанного на использовании технологий

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

Результаты и их обсуждение

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

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

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

Выявлено, что сфериоиды, полученные из теломеризированных фибробластов человека hTERT, имели меньший диаметр, чем сфериоиды, 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 сфериоидов 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 посевной концентрации клеток 5000, 8000, 10000, 15000 кл./сфериод. У сфероидов, образованных из 30000 кл./сфериод, снижения метаболической активности в т-

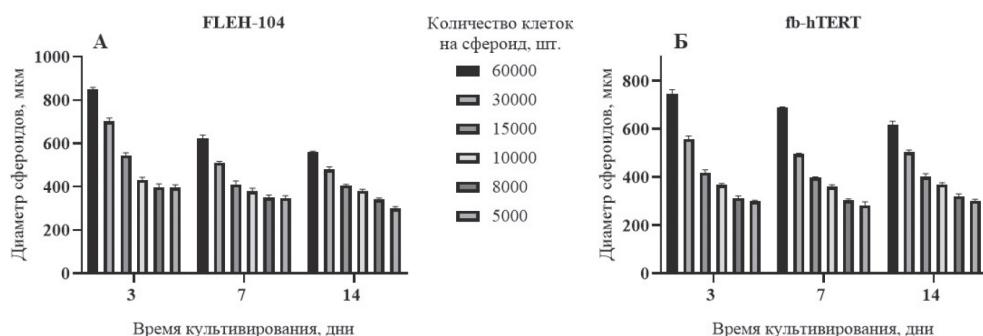


Рис. 1. Изменение диаметра сфероидов из клеточных линий ФЛЭЧ-104 (А) и фибробластов человека hTERT (Б) в процессе культивирования.

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

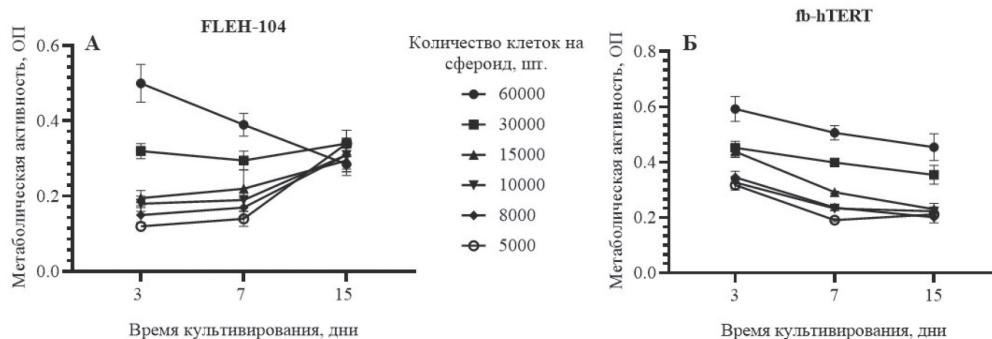


Рис. 2. Изменение метаболической активности сфериодов из клеточных линий ФЛЭЧ-104 (А) и фибробластов человека hTERT (Б) в процессе культивирования.

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

чение 15 сут не наблюдалось. Выраженное снижение метаболической активности было замечено на сфериодах, образованных из 60000 кл./сфериод. В процессе культивирования клеточных сфериодов из клеток фибробластов человека hTERT метаболическая активность клеточных сфериодов снижается независимо от исходной концентрации клеток. Закономерное уменьшение количества метаболически активных клеток может быть обусловлено формированием в составе сфериода 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 сфериодов 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 компактации клеточных сфериодов. Установленные принципы изменения диаметра сфериодов в зависимости от начальной клеточной концентрации важны для стандартизации методов получения трехмерных клеточных культур, поскольку начальная концентрация клеток является способом регулирования размера клеточных сфериодов. Полученные результаты могут быть применены для создания клеточных сфериодов, которые будут использоваться в области регенеративной медицины, в частности в 3D-биопринтинге, т.к. для этого необходимы клеточные сфериоды определенных размеров. Диаметр клеточных сфериодов является одним из ключевых параметров, анализируемых в исследованиях для оценки эффектов действия терапевтических агентов. Представленные результаты позволяют 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 сфериодов из указанных клеточных линий фибробластов

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

изменения метаболической активности клеток в составе сфериоида является критически важным параметром для применения в фармацевтических исследованиях, регенеративной медицине и моделировании биологических процессов. Показанные различия в изменении метаболической активности клеточных сфериоидов 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

- Грядунова А.А., Буланова Е.А., Кудан Е.В., Переира Ф.Д.А.С., Хесуани Ю.Д., Миронов В.А. Масштабируемая биофабрикация и морфологическая оценка тканевых сфериоидов. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2019;8(2):12–20. [Gryadunova A.A., Bulanova E.A., Kudan E.V., Pereira F.D.A.S., Hesuani Yu.D., Mironov V.A. Masshtabriuemaya 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)].
- Работа с культурами клеток. Уч.-метод. пособ. 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)].
- Согомонян А.С. и др. Метод получения трехмерных клеточных сфериоидов: 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 poluchenija trekhmernykh kletochnykh sferoidov: universalnyi instrument dlya izuchenija tsitotoksicheskikh svoistv protivoopukholevyykh 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)].
- Толстолужинская А.Е., Басалова Н.А., Карагяур М.Н., Еремичев Р.Ю. Создание 3D молели, имитирующей структуру фибротического фокуса. *Mat-ly XXVIII Vseross. konf. 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., Karagyaur M.N., Eremichev R.Yu. Sozdanie 3D modeli, imitiruyushchey strukturu fibroticheskogo fokusa. *Mat-ly XXVIII Vseross. konf. molodyykh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiem «Aktualnye problemy biomeditsiny»* [Creation of a 3D model simulating the structure of a fibrotic focus. *Proceedings of the XXVIII All-Russian Conference of Young Scientists with International Participation “Actual Problems of Biomedicine”*]. St. Petersburg: Pervyi Sankt-Peterburgskii gosudarstvennyi meditsinskii universitet im. akademika I.P. Pavlova Publ., 2022:353–354. (In Russian)].
- 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 Российской государственного медицинского университета*. 2020;5:82–90. [Shadrin V.S., Kozhin P.M., Shoshina O.O., Luzgina N.G., Rusanov A.L. Telomerizovannyye fibroblasty kak potentsialnyi obekt dlya 3D-modelirovaniya patologicheskikh gipertroficheskikh rubtsov *in vitro*. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* [Bulletin of the Russian State Medical University]. 2020;5:82–90. (In Russian)].

6. Bialkowska K., Komorowski P., Bryszewska M., Milowska 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

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

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

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