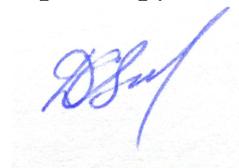


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

На правах рукописи



Зайцева-Зотова Дарья Сергеевна

**МУЛЬТИКЛЕТОЧНЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ СФЕРОИДЫ В
МИКРОКАПСУЛАХ КАК 3D МОДЕЛЬ *IN VITRO* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ЭФФЕКТА ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в лаборатории «Полимеры для биологии» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН

Научный руководитель:

доктор химических наук

Марквичёва Елена Арнольдовна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, проф.

Штильман Михаил Исаакович

доктор биологических наук, проф.

Болтовская Марина Николаевна

Ведущая организация:

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Центр «Биоинженерия»
Российской академии наук

Защита состоится « 28 » марта 2012 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан « » февраля 2012 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В. А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время стремительно развиваются фундаментальные и прикладные исследования, направленные на создание новых противораковых лекарств и систем их доставки, а также совершенствование методов лечения рака, в том числе фотодинамической терапии (ФДТ). Тестирование новых соединений с противораковой активностью проводится на моделях раковых опухолей, таких как спонтанные, перевиваемые и индуцированные опухоли животных, опухоли человека, перевитые животным, различные культуры клеток опухолей человека и животных, а также молекулярно-генетические модели. В связи с расширением спектра исследуемых соединений и ужесточением требований к работе с экспериментальными животными особое значение приобретают модели *in vitro* на основе клеточных культур. Классическими моделями *in vitro* являются суспензионная и монослойная культуры. Однако очевидно, что в таких условиях клетки не могут достаточно полно имитировать опухоли *in vivo*. Например, при росте в монослое (в двумерных условиях) клетки теряют ряд тканеспецифических функций, нарушаются межклеточные контакты и взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом, изменяются профили экспрессии генов, характерные для клеток, растущих в трехмерных (3D) условиях (в тканях, органах, опухолях) [Elliott N., Yuan F. (2011) J. Pharm. Sci. 100(1):59]. На сегодняшнем этапе развития медицинской биотехнологии важной становится разработка более достоверных методов скрининга лекарств. Поэтому на смену двумерным моделям приходят более сложные 3D системы, в частности культуры клеток, выращенные в/на макропористых микроносителях и гидрогелях, микро- и нановолокнах, а также мультиклеточные опухолевые сфероиды (МОС) и др. [Justice B., et al. (2009) Drug Discov. Today. 14(1-2):102].

Впервые МОС в качестве 3D модели малой солидной (от англ. solid, твердый) опухоли были предложены в 1970 году [Sutherland R., et al. (1970) Int. J. Radiat. Biol. 18:491]. С тех пор сфероиды используются при изучении механизмов действия различных противоопухолевых препаратов, а также в фундаментальных исследованиях механизмов пролиферации и дифференцировки клеток, апоптоза, некроза, инвазии, ангиогенеза [Pampaloni F., et al. (2007) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8(10):839]. Сфероиды – 3D агрегаты

клеток – сходны с первичными, лишенными сосудов злокачественными опухолями, с микрометастазами и межкапиллярными областями в опухолях. Кроме того, они имеют подобный опухолям внеклеточный матрикс, сходную 3D структуру и радиальное строение: гетерогенные клеточные популяции располагаются в сфероиде концентрически. Близка к ситуации *in vivo* и экспрессия генов в клетках, входящих в состав сфероида [Hirschhaeuser F., et al. (2010) J. Biotechnol. 148(1):3].

В связи с ростом интереса к исследованиям на сфероидов активно ведется разработка эффективных методов их формирования, которые позволили бы легко и быстро получать сфероиды заданных размеров (от 100 до 1000 мкм) [Lin R. and Chang H. (2008) Biotechnol. J. 3(9-10):1172]. Однако существующие методы не позволяют формировать МОС с узким распределением по размерам в пределах заданного диаметра, получать сфероиды на основе линий клеток, вообще не способных формировать агрегаты при росте в суспензионной культуре, а также осуществлять совместное культивирование раковых клеток с нормальными клетками (фибробластами, макрофагами, моноцитами и др.), которые присутствуют в солидных опухолях *in vivo*. Формирование сфероидов внутри полиэлектролитных микрокапсул как возможное решение этой задачи исследовано в настоящей работе.

Целью настоящей работы была разработка нового метода формирования сфероидов путем культивирования иммобилизованных раковых клеток в биосовместимых полимерных микрокапсулах и демонстрация возможности их использования в качестве 3D модели *in vitro* для изучения эффектов фотодинамического воздействия.

Для достижения цели предстояло решить следующие задачи:

1. Предложить биосовместимые полимеры для формирования полиэлектролитных микрокапсул с заданными свойствами и оптимизировать условия получения этих микрокапсул.
2. Изучить физико–химические свойства полученных микрокапсул (распределение по размерам, толщину полиэлектролитной мембраны, набухаемость и др.).
3. Исследовать кинетику роста различных раковых клеточных линий в микрокапсулах.

4. Изучить возможность формирования сфероидов в микрокапсулах путем длительного культивирования инкапсулированных раковых клеток.
5. Продемонстрировать возможность использования микрокапсулированных мультиклеточных опухолевых сфероидов в качестве 3D модели *in vitro* для исследования эффектов фотодинамического воздействия.

Научная новизна. Впервые для инкапсулирования раковых клеток предложены и использованы новые растворимые в физиологических условиях поликатионы, в частности новые графт-сополимеры хитозана с поливиниловым спиртом (хит-g-ПВС) и декстраны, модифицированные хлораминами (МД). Оптимизирована методика получения полиэлектролитных микрокапсул на основе этих материалов и изучены их физико-химические свойства.

Предлагаемые микрокапсулы впервые использованы для культивирования целого ряда культур животных клеток, в частности 7 различных по происхождению и морфологии линий раковых клеток. Показано, что предлагаемые микрокапсулы обеспечивают рост и пролиферацию клеток и позволяют формировать внутри микрокапсул МОС при длительном культивировании (2-4 недели). Таким образом, в данной работе впервые предложен и оптимизирован метод получения сфероидов в полиэлектролитных микрокапсулах на основе альгината (полианион) и новых поликатионов, позволяющий быстро и эффективно формировать сфероиды, имеющие узкое распределение по размерам в пределах заданного диаметра.

Впервые микрокапсулированные сфероиды предложены для исследования эффектов ФДТ и скрининга новых фотосенсибилизаторов (PS). В частности, с использованием двух PS, а именно Хлорина е6 (Ce6) и Фотосенса® (ФС®), показано, что 3D строение сфероидов обеспечивает повышенную устойчивость раковых клеток к ФДТ по сравнению с клетками, растущими в монослое.

Практическая значимость работы. Разработанная 3D модель *in vitro* на основе МОС может быть предложена для изучения механизмов ФДТ, тестирования различных новых противораковых препаратов, различных форм их доставки непосредственно перед испытаниями на животных, что может

существенно сократить как количество этих экспериментальных животных, так и стоимость самих предклинических испытаний.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены автором в виде устных докладов на конференциях XV International Workshop on Bioencapsulation (Vienna, Austria, 2007), 1st Russian-Hellenic Symposium “Biomaterials and bionanomaterials: Recent Advances and Safety – Toxicology issues” (Heraklion, Crete-Greece, 2010) и XIX International workshop on Bioencapsulation (Amboise, France, 2011). Результаты также были представлены на конференциях XVI International workshop on Bioencapsulation (Dublin, Ireland, 2008.), III International Conference on Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics (Moscow, Russia, 2008), школе-конференции молодых ученых «Методы культивирования клеток» (Санкт-Петербург, Россия, 2008), VIII международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Казань, Россия, 2006), Международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.А.Овчинникова (Москва, Россия, 2009), I Международной научной школе «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах» (п. Зоря, Московская область, Россия, 2009).

Связь работы с научными программами. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №10-04-91056-НЦНИ_a), FEBS (программа “Collaborative Scholarship for Central & Eastern Europe”) и Университета г. Нанси (Франция).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 14 печатных работ, в том числе 3 статьи из списка журналов, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы из 148 наименований. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, содержит 36 рисунков и 15 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выбор полимеров для формирования полиэлектролитных микрокапсул

Главной особенностью иммобилизации клеток в полимерные микрокапсулы является то, что процессы получения микрокапсул и включения в них клеток протекают одновременно. Это обстоятельство обуславливает особые требования как к свойствам полимерных материалов, так и к характеристикам микрокапсул и технологии их получения. Формирование мембраны микрокапсулы обычно осуществляют с использованием противоположно заряженных полиэлектролитов: полианиона и поликатиона. Характеристики образующегося полиэлектролитного комплекса зависят от свойств полиэлектролитов (молекулярной массы, гибкости полимерной цепи, наличия гидрофобных групп, числа, типа и распределения в полиэлектролитах заряженных групп) и условий формирования (концентрации, времени взаимодействия, температуры, рН, ионной силы).

Первый этап работы заключался в выборе биосовместимых полимеров для формирования полиэлектролитных микрокапсул в физиологических условиях. В качестве полианиона был выбран альгинат, поскольку он широко используется для иммобилизации бактериальных и животных клеток. В качестве поликатионов чаще всего применяют синтетические полипептиды (поли-L-лизин, поли-L-орнитин), однако они дороги и достаточно токсичны [Prokop A., et al. (1998) Adv. Polym. Sci. 136:1].

Природный полисахарид хитозан, будучи биосовместимым поликатионом, растворяется в кислой среде ($\text{pH} < 3,9$) и, следовательно, на его основе невозможно получать микрокапсулы в физиологических условиях. Однако, растворимость хитозана в физиологическом интервале рН может быть обеспечена снижением его молекулярной массы или его сополимеризацией с другими биосовместимыми материалами. В нашей работе было предложено использовать олигохитозаны ($\text{MM} < 20$ кДа), в частности Хит-3,5 (MM 3,5 кДа, СД 89 %) и Хит-17 (MM 17 кДа, СД 90 %). Первый был получен реакцией радикальной дегградации в присутствии перекиси водорода из коммерческого хитозана с MM 1200 кДа, а второй – деструкцией полимерной цепи хитозана в присутствии соляной кислоты. Кроме того, впервые для микрокапсулирования клеток были использованы новые графт-сополимеры хитозана с ПВС (хит-g-

ПВС), растворимые при значениях pH 6,5-7,0. Графт-сополимеры были синтезированы специально для данной работы в Институте синтетических полимерных материалов РАН (Москва). Сополимеры были получены методом реакционного смешения в твердом агрегатном состоянии хитина краба (ММ 650 кДа, зольность 0,15 %) и поливинилацетата (ММ 60 или 500 кДа) в присутствии щелочи в экструдере ZE 40A×40D UTS Verstorff, Германия [Ozerin A, et al. (2006) Polym. Sci. Ser. A. 48(6):638] при различных мольных соотношениях хитин : поливинилацетат (1:1 или 1:1,4). Для формирования микрокапсул было протестировано 9 фракций хит-г-ПВС, полученных при 20, 50 и 80°C.

Кроме того, впервые в качестве поликатионов для микрокапсулирования клеток был предложен природный полисахарид декстран, который был модифицирован путем введения в боковую цепь полимера различных положительно заряженных групп. Синтезированные образцы МД отличались типом заместителя в боковой цепи, степенью замещения (СЗ) от 4 до 26 мол.% и молекулярной массой (от 35 до 114 кДа). Для работы были выбраны 12 образцов МД (табл. 1). Предполагали, что использование этих поликатионов позволит повысить устойчивость полиэлектролитного комплекса и, как следствие, прочность микрокапсул на их основе.

Таким образом, для получения микрокапсул в работе были использованы альгинат в качестве полианиона и несколько поликатионов: олигохитозаны Хит-3,5 и Хит-17, 9 образцов хит-г-ПВС и 12 образцов МД.

Табл. 1. Характеристики декстранов, модифицированных хлораминами.

Модифицированный декстран	Сокращение	СЗ, мол.%	ММ, кДа
2-(диэтиламино)этил-декстран	МД ₁ -14-86	14	86
	МД ₁ -26-98	26	98
3-аминопропил-декстран	МД ₂ -4-77	4	77
	МД ₂ -7-62	7	62
2-аминоэтил-декстран	МД ₃ -4-35	4	35
	МД ₃ -15-102	15	102
3-(диметиламино)пропил-декстран	МД ₄ -9-48	9	48
	МД ₄ -14-91	14	91
2-(диметиламино)пропил-декстран	МД ₅ -8-93	8	93
	МД ₅ -14-93	14	93
2-(диизопропиламино)этил-декстран	МД ₆ -11-62	11	62
	МД ₆ -21-114	21	114

1.1. Исследование цитотоксичности выбранных полиэлектролитов

При микрокапсулировании животных клеток чрезвычайно важным является отсутствие цитотоксичности материала, используемого для формирования микрокапсул. Известно, что альгинат, олигохитозан, хитозан, ПВС и декстран являются биосовместимыми материалами и уже широко используются в биомедицине [Orive G., et al. (2005) J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. 74(1):429; Noguchi T., et al. (1991) J. Appl. Biomater. 2(2):101; Onuki Y., et al. (2008) J. Diabetes Sci. Technol. 2(6):1003].

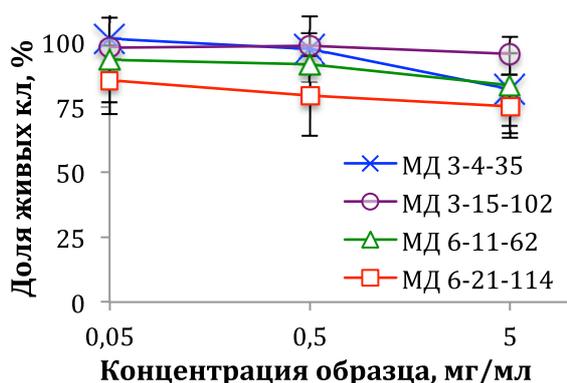


Рис. 1. Жизнеспособность клеток L929 в зависимости от концентрации образца МД в среде культивирования при инкубации в течение 24 часов. Результаты МТТ-теста.

Что касается полученных образцов МД, то их цитотоксичность исследовали на клеточной линии мышинных фибробластов (L929). Клетки вели на питательной среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки в CO₂-инкубаторе (HERAEUS B5060 ЕК/CO₂) в газовой среде, содержащей 5% CO₂, при температуре 37 °С. Жизнеспособность и морфологию клеток L929 изучали после инкубирования с МД (5; 0,5 и 0,05 мг/мл питательной среды) в течение 3, 12 и 24 часов. Цитотоксичность МД оценивали методом восстановления 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ-тест). Было показано, что метаболическая активность клеток зависит от концентрации и времени инкубирования МД с клетками для всех 12 образцов. На рис. 1 приведена зависимость жизнеспособности клеток от концентрации МД (4 образца) через 24 часа инкубирования. Снижение жизнеспособности клеток не превышало 20 % при концентрациях МД меньше 5 мг/мл для всех образцов, за исключением МД₆₋₂₁₋₁₁₄ (рис. 1). При этом, цитотоксичность МД₆₋₂₁₋₁₁₄ при концентрации 0,5 мг/мл (80% живых клеток) была сопоставима с цитотоксичностью широко используемых для микрокапсулирования олигохитозанов (> 70%) и была значительно выше цитотоксичности поли-L-лизина (< 5%). Таким образом, мы пришли к выводу, что использование всех исследуемых образцов МД допустимо при микрокапсулировании животных клеток.

2. Оптимизация метода формирования микрокапсул

Впервые идея включения клеток в полиэлектролитные микрокапсулы была предложена в 1980 году [Lim F., Sun A. (1980) Science. 210:908]. В нашей работе этот метод был модифицирован и состоял из нескольких этапов (рис. 2):

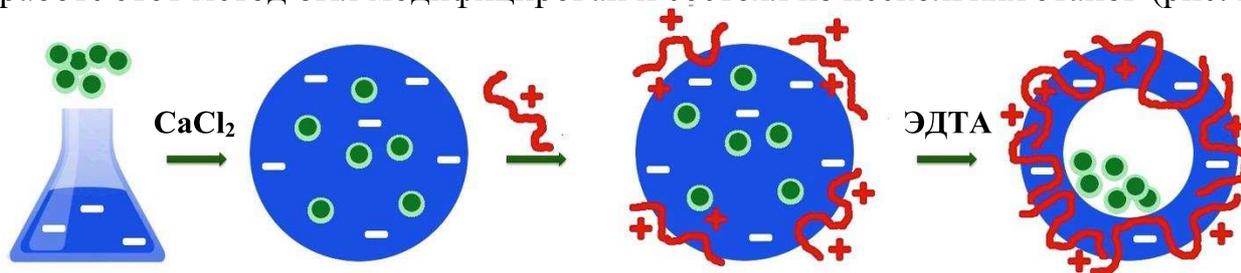


Рис. 2. Схема включения раковых клеток в полиэлектролитные микрокапсулы.

1. *Формирование Ca-альгинатных микрогранул с включенными клетками.* Клетки смешивали с 1,3 – 2,0 % раствором альгината натрия (NaAlg) и диспергировали полученный раствор через иглу (0,3 – 1 мм в диаметре) в 0,5 % раствор CaCl_2 , в котором происходила замена Na^+ на Ca^{2+} с образованием гидрогелевых микрогранул из альгината кальция (CaAlg).

2. *Формирование полиэлектролитной мембраны на поверхности CaAlg микрогранул.* Микрогранулы переносили в раствор поликатиона на 3 – 10 мин, для формирования полиэлектролитного комплекса между альгинатом и поликатионом. При этом, толщина образующейся мембраны зависела от времени инкубирования.

3. *Растворение CaAlg ядра и образование микрокапсул.* Полученные микрочастицы инкубировали 5-10 мин в растворе хелатирующего агента (50 мМ раствор ЭДТА), чтобы растворить CaAlg ядро. После тщательной отмывки получали микрокапсулы с включенными в них клетками, которые затем помещали в среду для культивирования.

Следующим этапом работы была оптимизация метода получения микрокапсул, которая состояла из подбора параметров формирования CaAlg микрогранул (п.2.1.) и подбора условий формирования полиэлектролитной мембраны (п.2.2.). Затем были изучены некоторые физико-химические характеристики полученных микрокапсул (п.2.3.).

2.1. Оптимизация параметров формирования микрогранул

Одной из важных характеристик микрокапсул для культивирования в них

животных клеток является их диаметр. Так, в микрокапсулах диаметром более 300 мкм можно наблюдать ограничение диффузии питательных веществ и кислорода к клеткам, и, как следствие, их гибель. Размер микрокапсул определяется размером CaAlg микрогранул, которые получали двумя методами: с помощью специально разработанного прибора с коаксиальной подачей сжатого воздуха (**метод 1**) и с использованием электростатического генератора микрочастиц (ЭГМ) (**метод 2**).

Метод 1. Диспергирование раствора NaAlg в принимающий раствор CaCl₂ проводили с помощью прибора с коаксиальной подачей сжатого воздуха. Оптимальные условия для получения микрогранул этим методом были подобраны нами ранее [Селина О., и др. (2009) Биоорганическая химия, 35(1):113]: давление воздуха 2,0 – 3,0 бар, скорость подачи 2 % раствора NaAlg 0,19 – 0,2 мл/мин, диаметр иглы 0,4 мм, расстояние до принимающего раствора CaCl₂ 1 см. При этом минимальный размер получаемых микрогранул был 700 – 900 мкм.

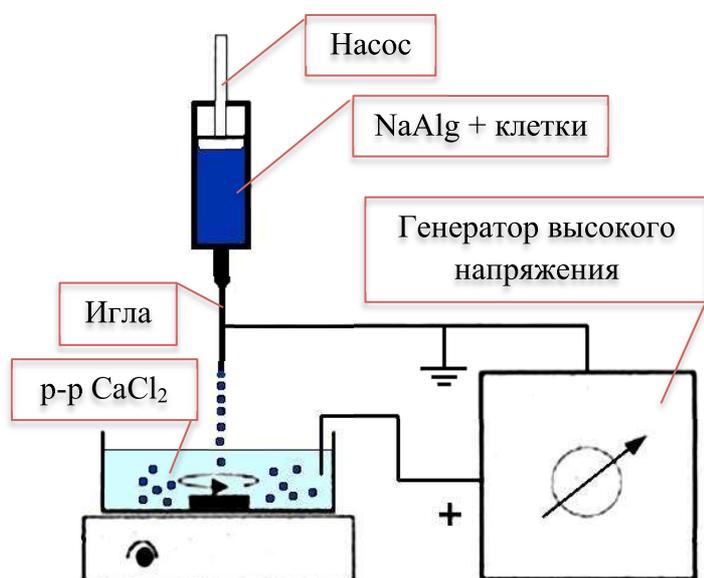
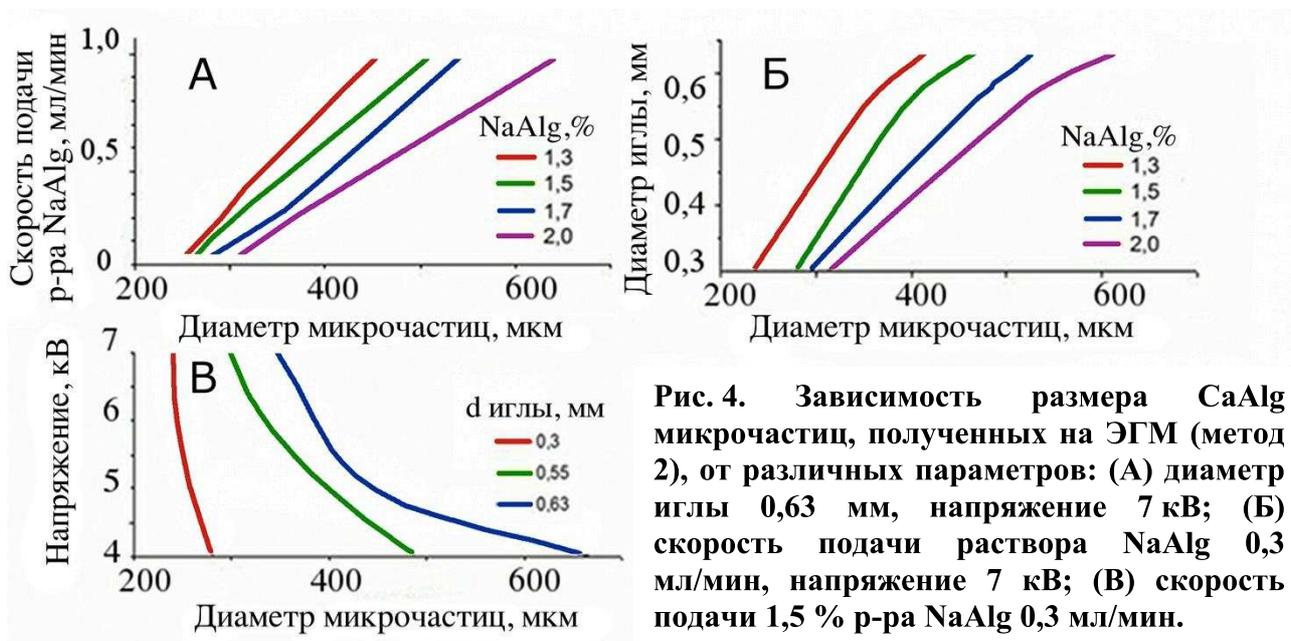


Рис. 3. Схема электростатического генератора микрочастиц (ЭГМ).

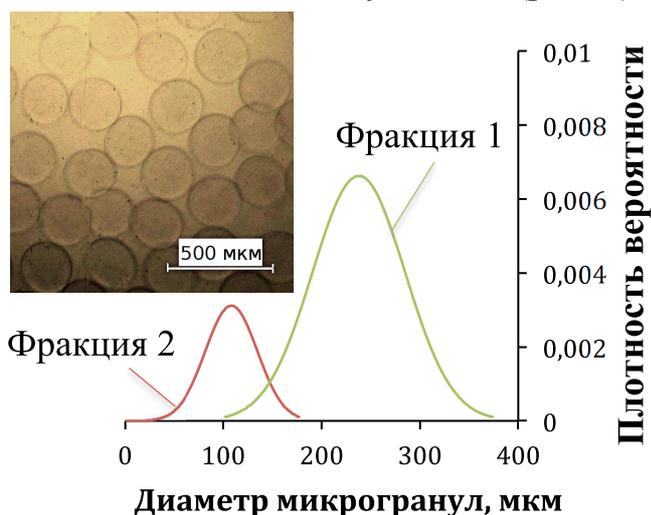
Метод 2. С целью снизить размер микрогранул до 200 – 350 мкм в работе был использован ЭГМ. Схема установки представлена на рис. 3. Диспергирование раствора NaAlg происходило за счет разности потенциалов между иглой и принимающим раствором CaCl₂. Микрогранулы получали на двух ЭГМ, сконструированных по схеме, предложенной Б. Бугарски

[Bugarski B., et al. (1994) AICHE J., 40(6):1026], специально для данной работы в рамках сотрудничества РАН-CNRS. Первый прибор был сделан в Политехническом институте Лотарингии (г. Нанси, Франция), а второй явился результатом усовершенствования первого и был разработан диссертантом в ИБХ РАН. В частности, установка, собранная в ИБХ РАН, включала

специальный автоклавируемый модуль для работы в стерильных условиях. Для каждой установки проводили оптимизацию всех параметров с целью получения унимодальных микрогранул правильной сферической формы со средним диаметром 200 – 350 мкм. Размер микрогранул оценивали на световом микроскопе Reichert Microstar 1820E (Германия) с использованием окуляра с масштабной линейкой.



Диаметр CaAlg микрогранул и их распределение по размерам сильно зависели от заданных условий (рис. 4). Снижение концентрации и скорости



подачи раствора NaAlg, уменьшение диаметра иглы и увеличение напряжения закономерно приводило к уменьшению диаметра микрогранул. Кроме того, во всех образцах наблюдалось наличие двух фракций: фракции 1 (150 – 600 мкм) и фракции 2 (диаметром меньше 150 мкм). Оптимальные условия формирования микрогранул (200 – 350 мкм), при которых количество

фракции 2 было минимальным, были следующие: подаваемое напряжение 7 кВ,

скорость подачи 1,5 % раствора NaAlg перистальтическим насосом 0,15 мл/мин, диаметр иглы 0,55 мм, расстояние между кончиком иглы и поверхностью принимающего раствора CaCl₂ 1 см. Распределение по размерам полученных микрогранул, представлено на рис. 5.

Таким образом, были определены оптимальные условия формирования CaAlg микрогранул размером 700 – 900 мкм (методом 1) и 200 – 350 мкм (методом 2), которые далее были использованы для получения полиэлектролитных микрокапсул.

2.2. Определение оптимальных условий формирования микрокапсул

Толщину полиэлектролитной мембраны микрокапсул можно варьировать в достаточно широких пределах. Однако при иммобилизации клеточных культур важно, чтобы мембрана была проницаемой для газов, питательных веществ и продуктов метаболизма. С другой стороны, мембрана должна быть механически и химически прочной, чтобы сохранять целостность микрокапсулы при длительном культивировании клеток. Ключевыми параметрами на этапе формирования полиэлектролитной мембраны являются концентрация раствора поликатиона и время инкубирования микрогранул в этом растворе, а также pH этого раствора.

Ранее было показано, что оптимальная толщина полиэлектролитной мембраны должна быть 80–100 мкм. Показано, что для формирования такой мембраны необходимо использовать следующие концентрации растворов поликатионов: Хит-3,5 – 0,2 %, Хит-17 – 0,3 %, Хит-g-ПВС (ММ > 25 кДа) – от 0,4 до 2,0 %. Таким образом, с увеличением молекулярной массы поликатиона для формирования стабильной мембраны микрокапсулы требуется увеличивать концентрацию этого поликатиона.

В случае МД способность образовывать стабильный полиэлектролитный комплекс с альгинатом в большей степени определялась природой заместителя. Так, в случае, когда заместитель содержал первичные амины (МД₂ и МД₃), происходило формирование прочного полиэлектролитного комплекса между МД и альгинатом, однако толщина мембраны составляла всего 30–60 мкм, что может быть связано с относительно высокой молекулярной массой образцов. Кроме того, с увеличением степени замещения снижалась концентрация МД,

необходимая для формирования стабильного полиэлектролитного комплекса. Так, в случае МД₃ при увеличении степени замещения с 4 % до 15 % минимальная концентрация, необходимая для формирования мембраны снижалась с 8,0 до 0,2 %, соответственно. В том случае, когда молекула МД содержала третичные амины и степень замещения была ниже 20%, стабильный полиэлектролитный комплекс с альгинатом не формировался. При степени замещения больше 20 % образование полиэлектролитного комплекса МД-альгинат происходило только при высоких концентрациях МД. В частности, для образца МД₁-26-98 минимальная концентрация, необходимая для формирования мембраны, была 10,0 %. Как следует из данных по цитотоксичности (п.1.1.), использование МД в концентрациях более 5 мг/мл (0,5 %) приводило к снижению жизнеспособности инкапсулируемых клеток. Из всех 12 образцов МД, для микрокапсулирования клеток подходит только МД₃-15-102.

Таким образом, для 11 образцов поликатионов (Хит-3,5 и Хит-17, сополимеров хит-g-ПВС и МД₃-15-102) были найдены оптимальные условия, позволяющие формировать полиэлектролитные микрокапсулы.

2.3. Характеристика полученных полиэлектролитных микрокапсул

На следующем этапе работы мы исследовали некоторые физико-химические свойства полученных микрокапсул: относительную механическую прочность, распределение по размерам, набухаемость в различных средах.

Табл. 2. Средний диаметр микрокапсул в физ. р-ре в зависимости от образца поликатиона. Исходный размер микрогранул – 720 мкм.

Образец поликатиона	Средний размер микрокапсул, мкм
Хит-3,5	900 ± 30
Хит-17	720 ± 24
Хит-g-ПВС ₂₀	780 ± 27
Хит-g-ПВС ₆₅₋₉₀	(1150-1450)
МД 1, МД 2 и МД 3	720

Относительную механическую прочность микрокапсул оценивали центрифугированием (5–10 минут, 9000g). Было показано, что микрокапсулы на основе всех 11 выбранных образцов полиэлектролитов не разрушались после центрифугирования, а следовательно, обладали достаточной механической прочностью.

Кроме того, была исследована зависимость толщины мембраны микрокапсулы, диаметр микрокапсул и их распределение по размерам от типа используемого поликатиона и ионной силы

среды, в которой инкубировали микрокапсулы. В табл. 2 приведены размеры микрокапсул в физ. р-ре, сформированных на основе различных поликатионов. В случае МД и олигохитозана размер микрокапсул был сопоставим с размером микрогранул, использованных для их получения. В то же время, для образцов графт-сополимеров наблюдали увеличение размера микрокапсул за счет их набухания, причем степень набухания возрастала с увеличением количества ПВС в сополимере. Так, минимальный размер имели микрокапсулы на основе графт-сополимера Хит-g-ПВС₂₀, содержащего 80 % хитозана и 20 % ПВС. В то время как увеличение содержания ПВС с 65 до 90 % приводило к значительному увеличению размеров микрокапсул, полученных на основе образцов сополимеров Хит-g-ПВС₆₅₋₉₀.

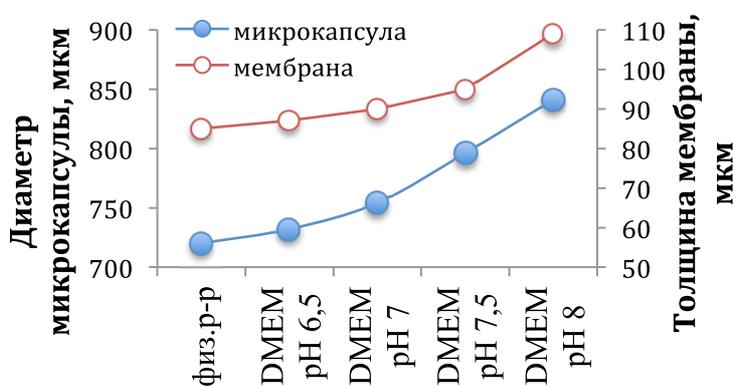


Рис. 6. Диаметр альгинат–Хит-g-ПВС₂₀ микрокапсул и толщина мембраны микрокапсулы в физ. р-ре и среде DMEM при различных pH.

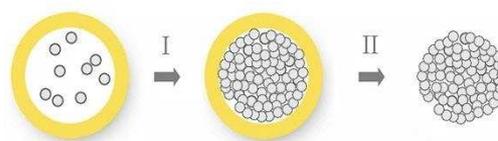


Рис. 7. Схема разрушения мембраны микрокапсул для высвобождения МОС:
I – длительное культивирование клеток в микрокапсулах,
II – разрушение мембраны микрокапсул при увеличении значения pH с 6,5 до 8,2.

Так как среда для культивирования представляет собой сложную многокомпонентную систему, необходимо было изучить стабильность микрокапсул в этой среде. Для этого полученные микрокапсулы из физ. раствора перемещали в культуральные среды (DMEM и RPMI-1640) и инкубировали при различных pH. При этом наблюдалось быстрое увеличение диаметра микрокапсул и толщины мембраны, иногда с последующим их разрушением. На рис. 6 показана зависимость размера микрокапсул от pH окружающей среды для микрокапсул на основе Хит-g-ПВС₂₀. Следует отметить, что при резкой смене pH с 6,5 до 8,0-8,2 происходило набухание и растворение микрокапсул на основе Хит-g-ПВС. Этот эффект было предложено

использовать для разрушения микрокапсул, например, с целью высвобождения из них МОС (рис. 7).

Таким образом, были изучены некоторые физико-химические свойства микрокапсул, полученных на основе 11 поликатионов. Показано, что микрокапсулы на основе альгината и биосовместимых полимеров (Хит-3,5 и Хит-17, Хит-g-ПВС₂₀ с содержанием хитозана 80% и МД₃-15-102) стабильны в средах для культивирования клеток и, следовательно, могут быть использованы для микрокапсулирования раковых клеток. Продемонстрировано преимущество новых сополимеров Хит-g-ПВС перед олигохитозанами: их более высокая рН чувствительность позволяет разрушать мембрану микрокапсулы и высвободить сфероиды в мягких условиях при повышении рН с 6,5 до 8,2.

3. Получение микрокапсулированных раковых сфероидов

Классические методы формирования сфероидов заключаются в том, что поверхностно-зависимые клетки культивируются в суспензии, где они вынужденно растут в агрегатах, образуя сфероиды с широким распределением по размерам. Метод микрокапсулирования позволяет генерировать сфероиды не только из монослойных, но и из суспензионных культур. Чтобы продемонстрировать возможность формирования МОС в микрокапсулах, были выбраны клеточные культуры, отличающиеся происхождением, морфологией и характером роста (монослойные и суспензионные), в частности, суспензионные культуры (миелома мыши Sp2/0, Т-лимфобластная лейкемия периферической крови человека CCRF-CEM и дочерняя линия CEM/cl, лимфоидная неоплазма мыши P388), а также монослойные культуры (аденокарцинома молочной железы человека MCF-7, аденокарцинома шейки матки человека HeLa, меланома мыши М3). Культивирование клеток проводили в средах DMEM или RPMI-1640 с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки.

Клетки микрокапсулировали по методу 1 и методу 2 и культивировали в микрокапсулах в течение 14 – 28 дней. При этом исходная концентрация клеток в растворе NaAlg, который диспергировали в раствор CaCl₂, составляла $(1,0 – 6,0) \times 10^6$ кл/мл. Подсчет клеток в микрокапсулах проводили в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. Кинетика роста четырех клеточных линий в микрокапсулах приведена на рис. 8. Показано, что характер

роста клеток в микрокапсулах (в объеме или в виде агрегатов на внутренней поверхности мембраны) и время, необходимое для формирования мультиклеточных сфероидов (14-28 дней), зависели от свойств выбранной культуры, но существенно не зависели от типа выбранного поликатиона. В отличие от классических методов формирования сфероидов, которые предусматривают обязательное фракционирование по размерам полученных МОС, имеющих большой разброс по размерам, все полученные нами сфероиды характеризовались заранее заданным размером и узким распределением по размерам (рис. 9). Следует особо подчеркнуть, что нам удалось сформировать МОС из суспензионных культур, например, из клеток CEM/cl (рис. 8), что невозможно сделать с использованием классических методов.

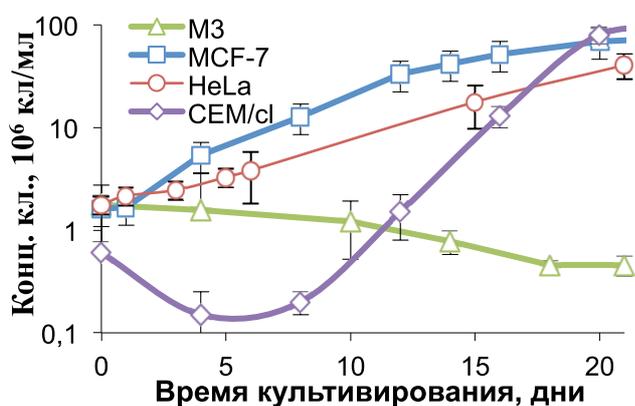


Рис. 8. Кинетика роста различных клеточных линий в микрокапсулах. Приведены результаты двух независимых экспериментов.

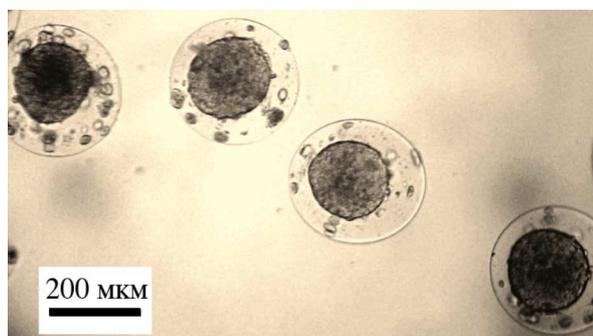


Рис. 9. Изображение микрокапсулированных МОС на основе клеточной линии MCF-7 на 14 день после инкапсулирования.

Таким образом, при длительном культивировании шести раковых клеточных линий в микрокапсулах были получены унимодальные сфероиды. Однако нам не удалось добиться образования сфероидов из клеток M3 в микрокапсулах. Как видно из рис. 8, количество жизнеспособных клеток M3 постепенно снижалось, начиная с 1-го дня культивирования вплоть до последнего 25 дня. Клетки оседали на внутреннюю поверхность мембраны микрокапсулы, при этом, в отличие от остальных исследованных нами раковых линий, не формировали сфероиды. Поэтому была предпринята попытка включить в микрокапсулы не отдельные клетки, а заранее сформированные агрегаты, по аналогии с микрокапсулированием островков Лангерганса поджелудочной железы, имеющих размер 45 – 200 мкм.

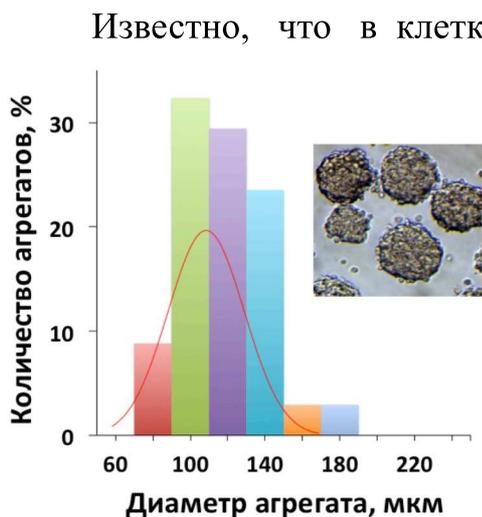


Рис. 10. Распределение по размерам агрегатов клеток М3, полученных при культивировании с 50 мкМ раствором cyclo-RGDfK в течение 72 часов.

Известно, что в клетках меланомы, в частности в клетках М3, имеет место гипрессия интегринов – гетеродимерных белков, которые обеспечивают адгезию клеток к компонентам внеклеточного матрикса и иногда к другим клеткам. Ранее было описано, что активация интегринов пептидами, содержащими последовательность RGD, может приводить к агрегации клеток [Salmenperä P., et al. (2008) Exp. Cell Res., 314(19):3444]. По этой причине, в нашей работе для формирования агрегатов клеток М3 было предложено использовать циклический пептид cyclo-RGDfK.

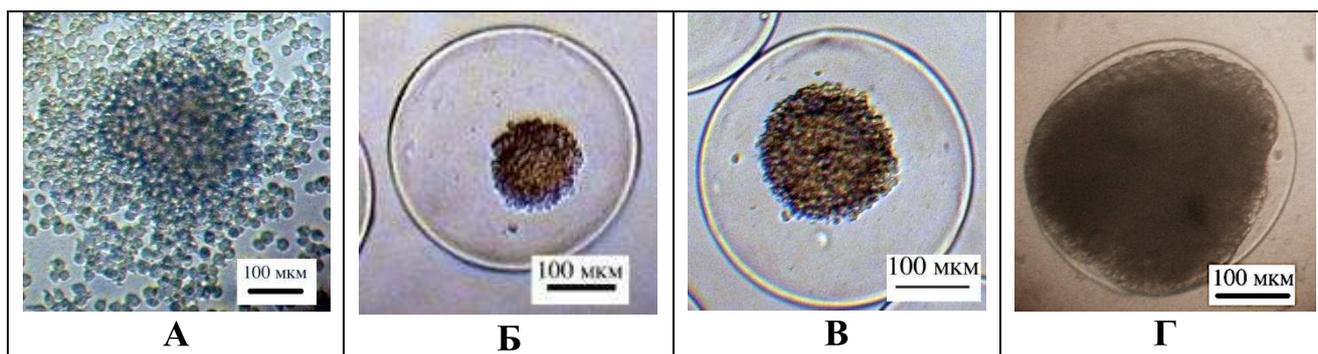


Рис. 11. Рост агрегатов клеток М3 на агаре: на 2 день (А) и в микрокапсулах на 0 день (Б), 4 день (В) и 14 день (Г) после процедуры инкапсулирования. Микрокапсулы получены с помощью ЭГМ (метод 2)

Агрегацию вызывали, инкубируя клетки (5×10^4 кл/см²) с cyclo-RGDfK (50 мкМ) в питательной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, в течение 72 часов. При этом формировались плотные агрегаты правильной сферической формы (вставка на рис. 10), имеющие узкое распределение по размерам и средний диаметр 110 мкм (рис. 10). Затем полученные агрегаты включали в микрокапсулы, как описано ранее. В то время как перенос агрегатов на плоскую поверхность культурального флакона приводил к их распаду на отдельные клетки (рис. 11А), микрокапсулирование позволило сохранить их целостность и обеспечило дальнейший рост клеток с увеличением размера агрегата в объеме микрокапсулы (рис. 11Б-Г). Таким

образом, микрокапсулирование агрегатов, предварительно сформированных путем обработки клеток пептидом, позволило получить микрокапсулированные сфероиды на основе клеток меланомы М3. Такой подход может быть предложен и для формирования сфероидов из других клеточных линий, в которых имеет место гиперэкспрессия интегринов.

Показано, что в отличие от классических методов, микрокапсулирование является универсальным подходом, который позволяет формировать унимодальные сфероиды на основе различных линий раковых клеток, отличающихся характером роста, происхождением и морфологией.

4. Исследование фотодинамического воздействия фотосенсибилизаторов Себ и ФС® на микрокапсулированные сфероиды

Для исследования возможности использования микрокапсулированных МОС в качестве трехмерной *in vitro* модели для тестирования эффектов ФДТ были выбраны сфероиды на основе клеточных линий MCF-7 и М3. ФДТ – неинвазивный двухкомпонентный метод лечения опухолей, сочетающий низкоэнергетическое лазерное облучение и использование фотосенсибилизаторов (PS).

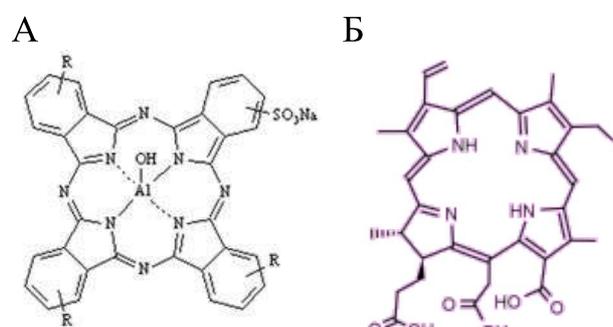


Рис. 12. Структурные формулы используемых в работе фотосенсибилизаторов: А – ФС®; Б – Себ (R= H или R= SO₃Na).

Механизм действия ФДТ основан на том, что в результате облучения PS светом определенной длины волны образуются активные формы кислорода, которые вызывают структурные повреждения клеток и их гибель [Castano A., et al. (2004) Photodiagn. Photodyn. Ther. 1(4):279;

Donnelly R., et al. (2009) Recent Pat. Drug Deliv. Formul. 3(1):1]. Преимущество ФДТ перед другими методами лечения рака заключается в том, что сохранение интактности нормальных тканей, окружающих опухоль, обеспечивается не только за счет повышенного накопления PS в опухолевых клетках по сравнению с нормальными, но и путем использования узко сфокусированного лазерного излучения, направленного только на опухоль.

В работе использовали два PS второго поколения: ФС® (фталоцианиновый ряд) и Себ (хлориновый ряд) (рис. 12). Фотодинамическое воздействие Себ исследовали на микрокапсулированных сфероидах, полученных из клеток MCF-7, а ФС® – из клеток MCF-7 и M3.

Для изучения проницаемости микрокапсул для PS сравнивали накопление Себ (или ФС®) в клетках, растущих в монослое и в микрокапсулах. Для этого инкапсулированные клетки MCF-7 культивировали в среде с добавлением Себ (17 мкМ) или ФС® (10 мкг/мл) в течение 24 часов. Затем микрокапсулы разрушали пипетированием, клетки ($0,5 \times 10^6$ кл) лизировали добавлением к осадку 0,1 М NaOH (500 мкл), а полученные лизаты анализировали на спектрофотометре BECKMAN DU-70 (Beckman Instruments, США) при длинах волн 667 нм для Себ и 402 нм для ФС®. Клетки, растущие в монослое, ($0,5 \times 10^6$ кл) были выбраны в качестве контроля. Было показано, что клетки в монослое и в микрокапсулах накапливали одинаковое количество ФС®. В случае Себ его накопление микрокапсулированными клетками составило $94 \pm 6 \%$ относительно контроля, что можно объяснить незначительной неспецифической сорбцией Себ в объеме микрокапсулы и диффузионными ограничениями, возникающими из-за агрегации молекул Себ. Таким образом, было показано, что микрокапсулы проницаемы для Себ (17 мкМ) и ФС® (10 мкг/мл), и PS в этих концентрациях могут быть использованы для исследований эффектов ФДТ на МОС, включенных в микрокапсулы.

4.1. Темновая цитотоксичность фотосенсибилизаторов Себ и ФС®

Темновую цитотоксичность PS определяли на клетках, растущих в монослое и МОС, при инкубировании в присутствии PS в течение 24 часов в темноте. Через 24 часа долю выживших клеток определяли методом МТТ. Из рис. 13 видно, что увеличение концентрации Себ приводило к снижению доли живых клеток MCF-7 как в монослое, так и в МОС. Однако клетки в МОС были значительно более устойчивы к Себ по сравнению с монослоем. Так, концентрация Себ, при которой жизнеспособность клеток была более 80 %, составила только 1,7 мкМ для клеточного монослоя, в то время как для МОС – 8,4 мкМ. Наблюдаемый эффект повышенной устойчивости клеток в сфероидах

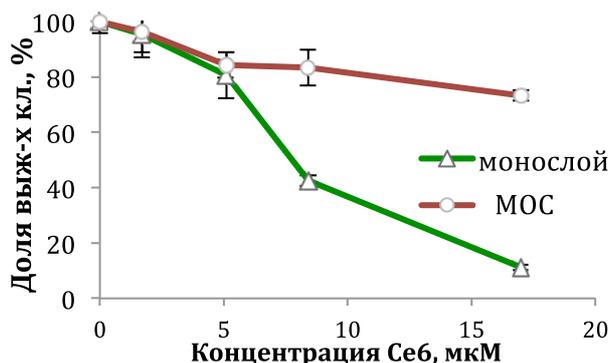


Рис. 13. Жизнеспособность клеток МСF-7 в зависимости от концентрации Себ при инкубировании в течение 24 часов. Результаты МТТ-теста.

по сравнению с монослоем, можно объяснить прежде всего диффузионными ограничениями, возникающими за счет трехмерной структуры сфероида. Именно эти концентрации были выбраны для дальнейшего изучения фотоцитотоксичности Себ. В случае ФС® нетоксичная для клеток М3 и МСF-7 концентрация была 10 мкг/мл.

4.2. Фотоцитотоксичность фотосенсибилизаторов Себ и ФС®

Для исследования фотоцитотоксичности клетки, растущие в монослое, и микрокапсулированные МОС инкубировали 24 часа в присутствии PS и затем облучали с помощью светодиодных лазеров: для Себ $\lambda = 650$ нм (Coherent, Франция), в случае ФС® $\lambda = 675$ нм (лазер Azor-PDT 675). Через 24 часа долю выживших клеток определяли методом МТТ.

На рис. 14 представлены результаты фотодинамического воздействия (для Себ) на МОС, полученных на основе клеток МСF-7. Видно, что

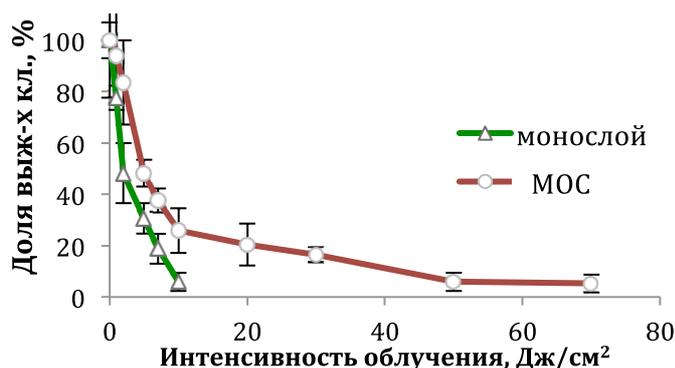


Рис. 14. Жизнеспособность клеток МСF-7 через 24 часа после облучения ($\lambda = 650$ нм, плотность потока облучения 30 мВт/см^2). Концентрации Себ 8,4 и 1,7 мкМ, для МОС и монослоя, соответственно. Результаты МТТ-теста.

увеличение дозы облучения с 1 до 100 Дж/см^2 приводило к снижению количества жизнеспособных клеток как в монослое, так и МОС. При дозе облучения 10 Дж/см^2 жизнеспособность клеток составляла 5,8% и 25,8% для монослоя МСF-7 и МОС, соответственно. При этом МОС были более устойчивы к ФДТ

по сравнению с монослоем, даже несмотря на то, что исходная концентрация Себ в случае МОС в 5 раз превышала таковую в случае монослоя.

Результаты ФДТ (с ФС®) представлены на рис. 15. Увеличение дозы лазерного облучения приводило к снижению жизнеспособности клеток MCF-7 и M3, растущих и в монослое, и в МОС. Однако, эффект ФДТ в случае монослоя был значительно сильнее. Так, при дозе облучения 10 Дж/см² жизнеспособность клеток MCF-7 составляла всего 15,7%, в то время как в МОС она сохранялась на уровне 71,8%. Такую же тенденцию наблюдали в случае клеток M3: 33,9% и 65,1% для монослоя и МОС, соответственно.

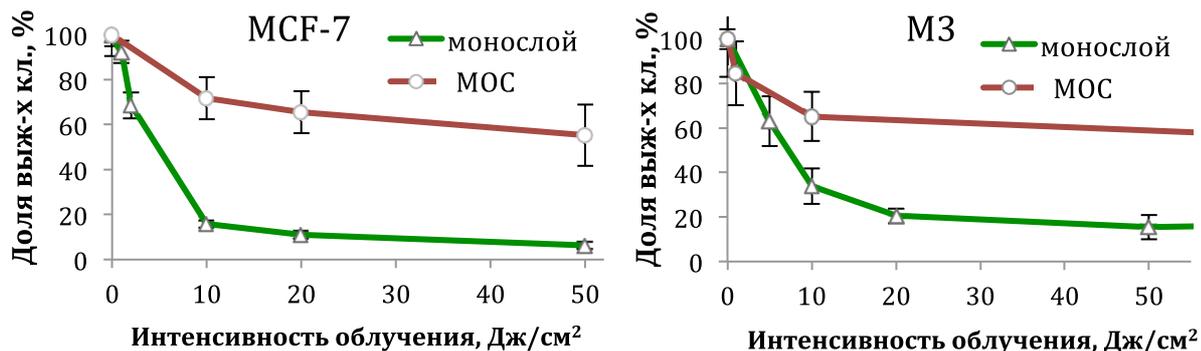


Рис. 15. Жизнеспособность клеток MCF-7 (слева) и M3 (справа) через 24 часа после облучения ($\lambda = 675$ нм, плотность потока облучения 1 Вт/см²). Концентрации ФС® 10 мкг/мл. Результаты МТТ-теста.

Таким образом, было показано, что эффект ФДТ менее выражен для сфероидов, чем для монослоя, что можно объяснить прежде всего 3D строением сфероидов – клетки, расположенные в центральных областях сфероида, значительно лучше защищены от фотодинамического воздействия, чем клетки на периферии вследствие ограниченной диффузии PS внутри компактного клеточного агрегата. Полученные результаты хорошо согласуются с результатами работ проведенных на сфероидах, сформированных классическими методами [Marchal S., et al. (2005) *Biochem. Pharmacol.* 69(8):1167]. Это позволяет предположить, что микрокапсулированные сфероиды являются более адекватной моделью раковой опухоли *in vivo*, в сравнении с двумерными моделями (монослоем).

4.3. Гистологическое исследование образцов сфероидов после ФДТ

Для получения дополнительной информации о состоянии клеток после ФДТ, был проведен анализ гистологических срезов образцов микрокапсулированных сфероидов. На рис. 16 приведены гистологические срезы образцов МОС, на основе клеток MCF-7, после ФДТ (Се6). В

контрольном образце (рис. 16А) большая часть клеток имела типичную морфологию (гомогенную цитоплазму и удлиненное или округлое светлое ядро) и можно было наблюдать митотические клетки. После фотодинамического воздействия при дозе 5 Дж/см² (рис. 16Б) часть клеток теряла свой эпителиоидный фенотип, цитоплазма становилась неоднородной с

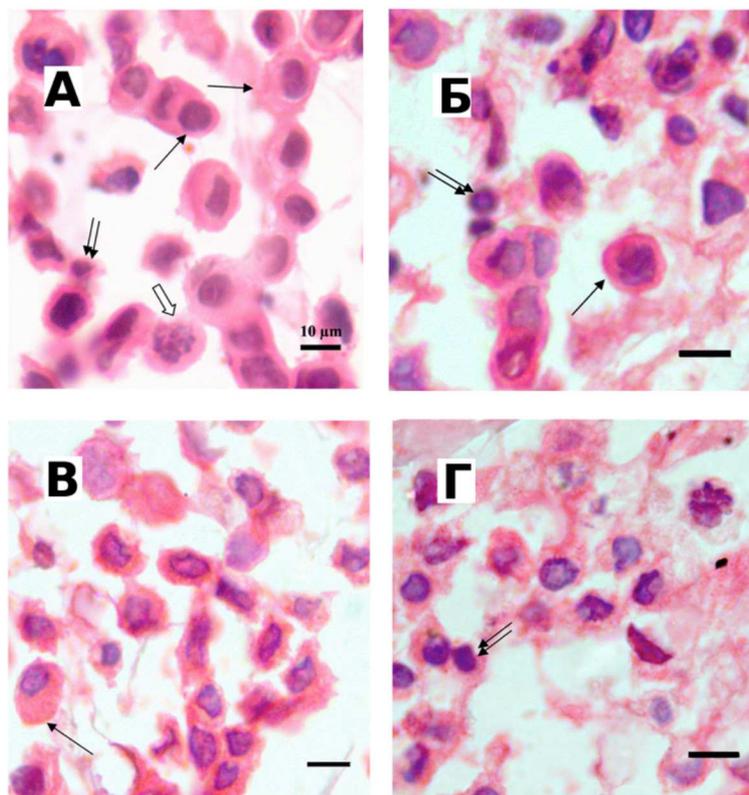


Рис. 16. Изображения срезов МОС на основе клеточной линии MCF-7 на 20 день после микрокапсулирования: контрольный образец, не подвергавшийся ФДТ (А), образцы после ФДТ при интенсивностях облучения 5 Дж см⁻² (Б), 30 Дж см⁻² (В), 70 Дж см⁻² (Г). Шкала 10 мкм. Типичные эпителиоподобные клетки отмечены черными стрелками, митотические – белыми стрелками, а мелкие клетки с конденсированным ядром – двойными стрелками. Окраска гематоксилином-эозином.

повышенной кислотностью, о чем свидетельствовала более интенсивная розовая окраска эозином. При этом возрастало количество клеток небольшого размера с уплотненным ядром, редко встречающихся в контроле, клеточные ядра увеличивались в размерах и можно было наблюдать конденсацию хроматина. При дозе в 30 Дж/см² только часть клеток MCF-7 сохраняла исходный вид (рис. 16В), а при увеличении дозы до 70 Дж/см² (рис. 16Г) были наглядно видны характерные признаки апоптоза, такие как вакуолизация цитоплазмы и дефрагментация хроматина. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными

данными, в частности в том, что апоптоз является основной формой гибели клеток при ФДТ [Agostinis P., et al. (2004) Photochem. Photobiol. Sci. 3(8):721].

Таким образом, очевидно, что МОС, имеющие трехмерную структуру, представляют собой более адекватную модель *in vitro*, чем 2D модели на основе монослойных культур. Разработанная нами модель на основе микрокапсулированных МОС может быть предложена как перспективная тест-

система *in vitro* для исследования эффектов ФДТ непосредственно перед тестированием на животных, что может существенно сократить как количество экспериментальных животных, так и стоимость самих предклинических испытаний.

ВЫВОДЫ

1. Для формирования полиэлектролитных микрокапсул с заданными свойствами предложено несколько новых биосовместимых поликатионов (графт-сополимеры хитозана с поливиниловым спиртом Хит-g-ПВС и модифицированные хлораминами декстраны МД) и изучена их цитотоксичность.
2. Оптимизирован процесс получения микрокапсул на основе альгината и различных поликатионов (олигохитозанов Хит-3,5 и Хит-17, сополимеров Хит-g-ПВС и МД) с использованием электростатического генератора микрочастиц. Получены унимодальные микрокапсулы заданного размера (200-350 мкм).
3. Изучены физико-химические свойства микрокапсул (распределение по размерам, толщина мембраны, относительная механическая стабильность, набухаемость в различных средах, проницаемость для фотосенсибилизаторов). Показано, что микрокапсулы устойчивы в культуральной среде и могут быть использованы для длительного культивирования клеток. Микрокапсулы на основе сополимеров Хит-g-ПВС легко разрушаются при повышении pH среды с 6,5 до 8,2, позволяя высвободить сфероиды в мягких условиях.
4. Показана возможность культивирования в микрокапсулах на основе альгината и различных поликатионов раковых клеточных линий, различающихся по происхождению, морфологии и характеру роста. Изучена кинетика роста 7 линий и показано, что характер роста клеток зависел от свойств культуры, но практически не зависел от типа поликатиона.
5. В результате длительного культивирования раковых клеток (от 14 до 28 дней) получены мультиклеточные сфероиды в микрокапсулах. Для клеток, не формирующих сфероидов в микрокапсулах, предложено использовать предварительную обработку RGD-пептидом, с последующим микрокапсулированием полученных агрегатов (на примере меланомы М3).
6. Показана возможность использования микрокапсулированных МОС в качестве новой 3D модели *in vitro* для исследования эффектов ФДТ. Клетки

МСF-7 и МЗ в сфероидах значительно более устойчивы к ФДТ, чем в монослое. На основании изучения гистологических образцов сфероидов до и после ФДТ сделано заключение о том, что гибель клеток в сфероидах происходит по механизму апоптоза.

Автор выражает благодарность к.х.н. Т. А. Акоповой (Институт синтетических и полимерных материалов РАН, Москва) за предоставленные образцы новых графт-сополимеров хитозана с ПВС, проф. А. Бартковиаку (Западнопомеранский университет, г. Щецин, Польша) за образцы олигохитозанов и МД, а также проф. Л. Н. Бездетной (Центр Алексиса Вонтрана, г. Нанси, Франция) и проф. Ж.-Л. Горжену (Политехнический ун-т Лотарингии, г. Нанси, Франция) за возможность выполнения части экспериментов в их лабораториях, а также к.б.н. Е. Р. Андреевой (Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия) за сотрудничество и помощь в проведении экспериментов по ФДТ. Кроме того, автор благодарна д.х.н. С. В. Бурову (Институт высокомолекулярных соединений, Санкт-Петербург) за синтез образцов циклических пептидов, а также к.х.н. О. Е. Селиной и асп. М. Г. Дроздовой (ИБХ РАН, Москва).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Zaytseva-Zotova D.**, Balysheva V., Tsoy A., Drozdova M., Akopova T., Vladimirov L., Chevalot I., Marc A., Goergen J.-L., Markvicheva E. Biocompatible Smart Microcapsules Based on Chitosan-Poly(Vinyl Alcohol) Copolymers for Cultivation of Animal Cells. // *Advanced engineering materials*, 2011, 13 (12), P. B493–B503.
2. **Zaytseva-Zotova D.**, Udartseva O., Andreeva E., Bartkowiak A., Bezdetnaya L., Guillemin F., Goergen J.-L., Markvicheva E. Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool to study the effects of photodynamic therapy. // *Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials*, 2011, 97B (2), P. 255–262.
3. Цой А., **Зайцева-Зотова Д.**, Эдельвейс Э., Бартковиак А., Горжен Ж., Водовозова Е., Марквичева Е. Микрокапсулированные мультиклеточные опухолевые сфероиды: получение и использование в качестве модели *in vitro* для тестирования лекарств. // *Биомедицинская химия*, 2010, 56 (6), С. 674-685.

Тезисы докладов:

4. **Zaytseva-Zotova D.**, Drozdova M., Yablokova T., Andreeva E., Akopova T., Chevalot I., Marc A., Burov S., Markvicheva E. Microencapsulation of tumor cells as a useful tool for anticancer drug screening. // XIX International workshop on Bioencapsulation, Amboise, France, October 5 – 8, 2011. O9-3.
5. Дроздова М.Г., **Зайцева-Зотова Д.С.**, Марквичева Е.А. (2011) Формирование микрокапсул на основе альгината и производных декстрана для культивирования клеток животных. // XXII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 7 – 10 февраля, 2011. С.139.
6. **Zaytseva-Zotova D.**, Jablokova N., Tsoy A., Drozdova M., Goergen J., Markvicheva E. Polyelectrolyte microcapsules with multicellular tumor spheroids as a novel *in vitro* model in tumor

biology. // 1st Russian-Hellenic Symposium “Biomaterials and bionanomaterials: recent advances and safety – toxicology issues”, Heraklion, Greece, May 3 – 9, 2010. P. 38.

7. **Зайцева-Зотова Д.С.**, Цой А.М., Горжен Ж-Л., Марквичева Е.А. Инкапсулированные мультিকлеточные опухолевые сфероиды для исследования механизмов фотодинамической терапии. // 1-ая Международная научная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах», п. Зоря, Московская область, 29 июня - 4 июля, 2009. С. 228.

8. **Зайцева-Зотова Д.С.**, Селина О.Е., Бовин Н.В., Марквичева Е.А. Полиэлектролитные микрокапсулы для включения в них биоактивных макромолекул и животных клеток: оптимизация методов получения. // Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Ю.А.Овчинникова. Москва, 28 сентября -2 октября, 2009. С. 212.

9. **Zaytseva-Zotova D.**, Udartseva O., Andreeva E., Bolotine L., Goergen J.L., Markvicheva E. Photodynamic effects of chlorine e6 on bioencapsulated tumour spheroids. // XVI International workshop on Bioencapsulation, Dublin, Ireland, September 4 – 6, 2008. P49, P. 1-4.

10. **Зайцева-Зотова Д.**, Цой А., Марквичева Е. Применение мультিকлеточных опухолевых сфероидов для изучения фотодинамического воздействия хлорина e6. // Школа-конференция молодых ученых «Методы культивирования клеток», журнал «Цитология», 2008, 50 (9), С. 806.

11. **Zaytseva-Zotova D.**, Akopova T., Vodovozova E., Markvicheva E. Bioencapsulated multicellular tumor spheroids can mimic small size solid tumors. // III International Conference on Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics, Moscow, Russia, June 24 – 28, 2008. EP38.

12. **Zaytseva-Zotova D.**, Vodovozova E., Chernyshenko A., Akopova T., Zelinetskii A., Markvicheva E. Multicellular tumor spheroids generated into microcapsules for drug screening. // XV International workshop on Bioencapsulation, Vienna, Austria, September 6 – 8, 2007. S7-3.

13. Markvicheva E., **Zaytseva-Zotova D.**, Erokhina T., Akopova T., Zelenetskii A. Bioencapsulation of tumor cells in alginate-(chitosan-PVA) microcapsules. // XIV International workshop on Bioencapsulation, Lausanne, Switzerland, October 5 – 7, 2006. P. 263-266.

14. **Зайцева-Зотова Д.С.**, Хмелев Г.В., Чернышенко А.О., Вихорева Г.А., Аكوпова Т.А., Зеленецкий А.Н., Ерохина Т.Н., Марквичева Е.А. Микрокапсулы на основе хитозана и его производных для получения мультিকлеточных опухолевых сфероидов. // VIII международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» РосХит 2006, Казань, Россия, Июнь 13 – 17, 2006. С. 200-204.

Список используемых сокращений:

МОС – мультিকлеточные опухолевые сфероиды

3D – трехмерный

Хит-g-ПВС – графт-сополимер хитозана с поливиниловым спиртом

МД – модифицированный декстран

NaAlg – альгинат натрия

CaAlg – альгинат кальция

ЭГМ – электростатический генератор микрочастиц

ФДТ – фотодинамическая терапия

PS – фотосенсибилизатор

Се6 – Хлорин e6

ФС® – Фотосенс®