

3D-МОДЕЛЬ ОПУХОЛЕВОГО СФЕРОИДА ИЗ КРАТКОСРОЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ПАЦИЕНТА И ЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ВРЕМЯРАЗРЕШЕННОГО ИМИДЖИНГА

DOI: 10.17691/stm2023.15.2.03

УДК 616.831–006.484:004.891.3

Поступила 7.02.2023 г.



Д.В. Южакова, к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномики адаптивного противоопухолевого иммунитета НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

М.М. Лукина, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии²; научный сотрудник лаборатории флюоресцентного биоимиджинга¹;

Д.А. Сачкова, студент-магистр кафедры биофизики³; лаборант лаборатории флюоресцентного биоимиджинга НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

Г.М. Юсубалиева, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий⁴; старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов регенерации и старения⁵;

В.П. Баклаушев, д.м.н., зам. генерального директора по научной работе и медицинским технологиям⁴; зав. лабораторией молекулярных механизмов регенерации и старения⁵;

А.М. Можеров, младший научный сотрудник лаборатории оптической спектроскопии и микроскопии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

В.В. Дуденкова, к.ф.-м.н., научный сотрудник лаборатории оптической спектроскопии и микроскопии НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

А.И. Гаврина, младший научный сотрудник лаборатории молекулярных биотехнологий НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹;

К.С. Яшин, к.м.н., врач-онколог, врач-нейрохирург отделения онкологии и нейрохирургии Института травматологии и ортопедии Университетской клиники, ассистент кафедры травматологии и нейрохирургии им. М.В. Колокольцева¹;

М.В. Ширманова, к.б.н., зам. директора по науке НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий¹

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина, 10/1, Н. Новгород, 603005;

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435;

³Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

⁴Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Ореховый бульвар, 28, Москва, 115682;

⁵Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, ул. Вавилова, 32, Москва, 119991

Пациент-специфические *in vitro* модели опухолей являются перспективной платформой для изучения механизмов онкогенеза и персонализированного подбора лекарственных препаратов. В случае глиальных опухолей мозга создание и использование таких моделей особенно актуально, так как эффективность лечения этих опухолей остается крайне неудовлетворительной.

Цель исследования — разработка 3D-модели опухолевого сфероида глиобластомы на основе операционного материала пациента и исследование ее метаболических особенностей методом флуоресцентной времяразрешенной микроскопии метаболических коферментов.

Материалы и методы. В работе использованы образцы опухолей пациентов с диагнозом «глиобластома, Grade IV». Для создания сфероидов из фрагментов опухолевой ткани выделены краткосрочные культуры, охарактеризованы морфологически и иммуноцитохимически и высажены в круглодонные низкоадгезивные планшеты. Количество клеток для посадки выбрано эмпирически. Проведено сравнение особенностей роста клеточных культур и сфероидов из глиобластом пациентов с библиотечной линией глиобластомы человека U373 MG. Визуализацию автофлуоресценции метаболических коферментов никотинамидадениндинуклеотида (фосфата) НАД(Ф)Н и флавинадениндинуклеотида (ФАД) в сфероидах осуществляли с помощью лазерного сканирующего

Для контактов: Южакова Диана Владимировна, e-mail: yuzhakova-diana@mail.ru

микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM-модулем (Becker & GmbH, Германия). Параметры затухания автофлуоресценции исследованы в условиях нормоксии и гипоксии (3,5% O₂).

Результаты. Разработан оригинальный протокол культивирования 3D-сфероидов глиобластомы. Получены и охарактеризованы краткосрочные глиальные культуры из операционного материала пациентов. Выделенные клетки глиобластом имели веретенообразную морфологию с многочисленными отростками и выраженную зернистость цитоплазмы. Все культуры экспрессировали глиальный кислый фибриллярный белок GFAP. Подобрана оптимальная доза посева — 2000 клеток на лунку, приводящая к формированию сфероидов с плотной структурой и стабильным ростом в течение 7 дней. Методом FLIM установлено, что клетки сфероидов из материала пациентов имеют в целом схожий метаболизм со сфероидами из библиотечной линии глиобластомы, однако демонстрируют более выраженную метаболическую гетерогенность. При культивировании сфероидов в условиях гипоксии зарегистрирован более гликолитический тип метаболизма, что выражается в увеличении вклада свободной формы НАД(Ф)Н в затухание флуоресценции.

Заключение. Разработанная модель опухолевых сфероидов из глиобластомы пациентов с использованием краткосрочных культур в комбинации с методом FLIM-имиджинга может служить инструментом для исследования особенностей опухолевого метаболизма и разработки предиктивных тестов для оценки эффективности противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: опухолевые сфероиды; FLIM; времяразрешенный имиджинг; глиобластома; метаболический статус опухолевых клеток; НАД(Ф)Н; ФАД.

Как цитировать: Yuzhakova D.V., Lukina M.M., Sachkova D.A., Yusubaliev G.M., Baklaushev V.P., Mozherov A.M., Dudenkova V.V., Gavrina A.I., Yashin K.S., Shirmanova M.V. Development of a 3D tumor spheroid model from the patient's glioblastoma cells and its study by metabolic fluorescence lifetime imaging. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(2): 28, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.2.03>

English

Development of a 3D Tumor Spheroid Model from the Patient's Glioblastoma Cells and Its Study by Metabolic Fluorescence Lifetime Imaging

D.V. Yuzhakova, PhD, Researcher, Laboratory of Genomics of Adaptive Antitumor Immunity, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

M.M. Lukina, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Oncology²; Researcher, Laboratory of Fluorescent Bioimaging¹;

D.A. Sachkova, Master Student, Department of Biophysics³; Laboratory Assistant, Laboratory of Fluorescent Bioimaging, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

G.M. Yusubaliev, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Cell Technologies⁴; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Regeneration and Aging⁵;

V.P. Baklaushev, MD, DSc, Deputy General Director for Research and Medical Technologies⁴; Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Regeneration and Aging⁵;

A.M. Mozherov, Junior Researcher, Laboratory of Optical Spectroscopy and Microscopy, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

V.V. Dudenkova, PhD, Researcher, Laboratory of Optical Spectroscopy and Microscopy, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

A.I. Gavrina, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnologies, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹;

K.S. Yashin, MD, PhD, Oncologist, Neurosurgeon, Department of Oncology and Neurosurgery, Institute of Traumatology and Orthopedics, University Clinic; Assistant, Department of Traumatology and Neurosurgery named after M.V. Kolokoltsev¹;

M.V. Shirmanova, PhD, Deputy Director for Science, Research Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies¹

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²Federal Research and Clinical Center of Physical and Chemical Medicine, Federal Medical and Biological Agency, 1a Malaya Pirogovskaya St., Moscow, 119435, Russia;

³National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

⁴Federal Research and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency, 28 Orekhovy Blvd., Moscow, 115682, Russia;

⁵Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 32 Vavilova St., Moscow, 119991, Russia

Patient-specific *in vitro* tumor models are a promising platform for studying the mechanisms of oncogenesis and personalized selection of drugs. In case of glial brain tumors, development and use of such models is particularly relevant as the effectiveness of such tumor treatment remains extremely unsatisfactory.

The aim of the study was to develop a model of a 3D tumor glioblastoma spheroid based on a patient's surgical material and to study its metabolic characteristics by means of fluorescence lifetime imaging microscopy of metabolic coenzymes.

Materials and Methods. The study was conducted with tumor samples from patients diagnosed with glioblastoma (Grade IV). To create spheroids, primary cultures were isolated from tumor tissue samples; the said cultures were characterized morphologically and immunocytochemically, and then planted into round-bottom ultra low-adhesion plates. The number of cells for planting was chosen empirically. The characteristics of the growth of cell cultures were compared with spheroids from glioblastomas of patients with U373 MG stable line of human glioblastoma. Visualization of autofluorescence of metabolic coenzymes of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) NAD(P)H and flavin adenine dinucleotide (FAD) in spheroids was performed by means of an LSM 880 laser scanning microscope (Carl Zeiss, Germany) with a FLIM module (Becker & Hickl GmbH, Germany). The autofluorescence decay parameters were studied under normoxic and hypoxic conditions (3.5% O₂).

Results. An original protocol for 3D glioblastoma spheroids cultivation was developed. Primary glial cultures from surgical material of patients were obtained and characterized. The isolated glioblastoma cells had a spindle-shaped morphology with numerous processes and a pronounced granularity of cytoplasm. All cultures expressed glial fibrillary acidic protein (GFAP). The optimal seeding dose of 2000 cells per well was specified; its application results in formation of spheroids with a dense structure and stable growth during 7 days. The FLIM method helped to establish that spheroid cells from the patient material had a generally similar metabolism to spheroids from the stable line, however, they demonstrated more pronounced metabolic heterogeneity. Cultivation of spheroids under hypoxic conditions revealed a transition to a more glycolytic type of metabolism, which is expressed in an increase in the contribution of the free form of NAD(P)H to fluorescence decay.

Conclusion. The developed model of tumor spheroids from patients' glioblastomas in combination with the FLIM can serve as a tool to study characteristics of tumor metabolism and develop predictive tests to evaluate the effectiveness of antitumor therapy.

Key words: tumor spheroids; FLIM; fluorescence lifetime imaging; glioblastoma; metabolic status of tumor cells; NAD(P)H; FAD.

Введение

Глиобластома составляет 48,3% всех первичных злокачественных образований головного мозга и является наиболее агрессивной опухолью [1]. Несмотря на радикальную тактику лечения, включающую максимально возможное удаление опухоли, лучевую и химиотерапию, медиана выживаемости не превышает двух лет.

Существующие схемы лечения не учитывают индивидуальные особенности опухоли пациента, что является ключевой проблемой в борьбе с глиобластомой. Перспективным решением служит разработка персонализированного подхода к лечению на основе использования опухолевых моделей из клеточного материала от пациента [2–4].

Среди пациент-специфичных моделей глиобластомы выделяют две основные группы: 1) модели *in vitro* — монослойные культуры, культуры и ко-культуры в скаффолдах, 3D-сфероиды и органоиды [5]; 2) модели *in vivo* — опухолевые ксенографты у мышей [6]. Однако единые подходы к получению и охарактеризованию таких моделей не выработаны.

В ряду опухолевых моделей опухолевые сфероиды занимают промежуточное положение между монослойными клеточными культурами и опухолями животных. Опухолевые сфероиды представляют собой трехмерные многоклеточные агрегаты шарообразной формы, имеющие гетерогенную структуру. Морфологическая гетерогенность сфероидов обусловлена в первую очередь наличием градиентов питательных веществ, метаболитов и кислорода.

У крупных сфероидов (диаметром более 500 мкм) можно выделить три основные зоны: некротическое ядро, внутренняя зона покоящихся клеток и внешний активно пролиферирующий слой [7]. Известно, что в сфероиде экспрессируются мембранные рецепторы, регулирующие клеточную адгезию и метаболизм, синтезируется межклеточный матрикс, что важно для межклеточного взаимодействия и взаимодействия с клетками иммунной системы [8]. С одной стороны, опухолевые сфероиды значительно лучше моделируют все виды межклеточных контактов, диффузию питательных веществ и кислорода в опухоли по сравнению с монослойными культурами и ближе по своим свойствам к реальным опухолям. С другой стороны, сфероиды намного более просты и дешевы в обращении по сравнению с опухолями мышей и органоидами, в особенности в случае опухолей головного мозга.

Все большее значение отводится использованию опухолевых сфероидов в доклиническом тестировании новых противоопухолевых агентов и терапевтических воздействий [9, 10]. Системы на основе сфероидов из клеток опухолей пациентов также рассматриваются как перспективная платформа для индивидуального подбора лекарственных препаратов [11, 12].

Помимо сугубо прикладных задач пациент-специфические модели, включая опухолевые сфероиды, играют важную роль в исследовании опухолевого метаболизма [13]. Значительные перестройки во многих метаболических путях — характерная особенность опухолей, которая в последние годы рассматривается

не просто как следствие злокачественной трансформации, а как обязательное условие для опухолевой прогрессии [14]. Наиболее изученными особенностями метаболизма опухолевых клеток являются повышенный гликолиз, как анаэробный, так и аэробный (эффект Варбурга), нарушение митохондриального дыхания, активация пентозофосфатного пути, использование глутамина и жирных кислот в качестве энергетических субстратов [15, 16]. Современные исследования показывают, что метаболические процессы в опухолевых клетках отличаются высокой пластичностью, а сами опухолевые клетки, даже внутри одной опухоли, высокогетерогенны по своему метаболическому профилю, что позволяет им быстро адаптироваться и выживать в неблагоприятных условиях [17, 18]. Эти аспекты опухолевого метаболизма изучены гораздо меньше.

Высокий потенциал в исследованиях опухолевого метаболизма имеет технология метаболического имиджинга на основе двухфотонной флуоресцентной микроскопии с временным разрешением (FLIM, fluorescence lifetime imaging microscopy) [19–21]. Данный метод основан на оценке времени жизни автофлуоресценции метаболических кофакторов, таких как восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (фосфат) (НАД(Ф)Н) и окисленный флавинадениндинуклеотид (ФАД). Эти кофакторы участвуют в качестве переносчиков электронов во многих биохимических реакциях и присутствуют в клетке в восстановленной (НАД(Ф)Н, ФАДН₂) и окисленной (НАД⁺/НАДФ⁺, ФАД) формах. Из них только НАД(Ф)Н и ФАД обладают автофлуоресценцией, при этом, как правило, НАД(Ф)Н демонстрирует более высокую интенсивность флуоресценции внутри опухолевых клеток по сравнению с ФАД.

Нарушения в различных энергетических и анаболических путях могут приводить к изменению параметров затухания автофлуоресценции метаболических коферментов, что можно наблюдать на клеточном уровне с помощью FLIM [22–24]. В типичной ситуации затухание флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД описывается биэкспоненциальной функцией. В случае НАД(Ф)Н короткая компонента времени жизни соответствует свободной форме кофактора, ассоциированной с гликолизом, а длинная компонента — связанной с белками форме НАД(Ф)Н, ассоциированной с митохондриальной дыхательной цепью. В случае ФАД короткая и длинная компоненты обусловлены соответственно закрытой и открытой конформациями кофактора, первая из которых преобладает в структуре белков.

Цель исследования — разработать методику создания пациент-специфической 3D-модели сфероидов глиобластомы и оценить метаболический статус полученных сфероидов с помощью FLIM.

Материалы и методы

Операционный материал. Все исследования на опухолевом материале одобрены локальным этическим

комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета, Н. Новгород (протокол №12 от 5 августа 2022 г.).

Осуществлен набор операционного материала от 5 пациентов с предполагаемым (по данным предоперационного МРТ с контрастным усилением) и подтвержденным гистологически диагнозом «глиобластома, Grade IV». Оперативное вмешательство было выполнено в отделении онкологии и нейрохирургии Университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (2013) и одобрено Этическим комитетом Приволжского исследовательского медицинского университета. От каждого пациента получено информированное согласие.

Размер образцов опухолей составлял порядка 5×5×5 мм. Транспортировку их осуществляли в пробирках с транспортной средой DMEM (dulbecco's modified eagle medium)/F12 («ПанЭко», Россия) с двукратной концентрацией антибиотика-антимикотика (Gibco, США) на льду.

Для получения первичной культуры клеток глиобластомы фрагмент опухолевой ткани механически измельчали в условиях стерильного бокса в чашках Петри стерильными лезвиями и дополнительно ферментативно диссоциировали с применением реактива Liberase TL (Roche, Швейцария), который представляет собой смесь коллагеназ I и II, 5–7 мин в CO₂-инкубаторе (Sheldon Manufacturing Inc., США). Затем проводили очищение суспензии клеток от эритроцитов при помощи лизирующего АСК-буфера (Buffer EL; Qiagen, Германия). После центрифугирования конечной суспензии осадок ресуспендировали в питательной среде и переносили в 25-см² культуральный флакон либо в 6-луночный планшет (Corning, США). Спустя 24–48 ч, когда глиальные клетки адгезировались на пластик, питательную среду с клеточным дебрисом заменяли на свежую полную среду DMEM со стандартной концентрацией антибиотика.

Культивирование клеток и сфероидов. Полученные краткосрочные культуры глиобластом, а также библиотечную линию глиобластомы человека U373 MG культивировали в питательной среде DMEM, содержащей 10% телячьей сыворотки (FCS), 0,06% глутамина, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина сульфата, в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂, температуре 37°C и влажности 85%. Субкультивирование проводили один раз в 2–3 сут по достижении культурой 80% конfluence. Снятие клеток происходило путем добавления 1 мл раствора трипсин–ЭДТА (25%) в течение 5 мин. Подсчет клеток выполняли в камере Горяева.

Изображения клеток в проходящем свете для оценки их морфологии и жизнеспособности, а также иммунофлуоресцентные изображения получали с использованием флуоресцентного инвертированного микроскопа DM IL LED (Leica, Германия).

Авторами разработан оригинальный протокол создания модели сфероидов из краткосрочных клеточных культуры глиобластомы, который будет подробно описан в разделе «Результаты».

Опухолевые 3D-сфероиды формировали путем культивирования опухолевых клеток в 96-луночных круглодонных планшетах с низкой адгезией (Corning, США). Для получения сфероидов из линейных клеток глиобластомы U373 MG количество высеваемых клеток составляло 2000 клеток на лунку. Оценку роста и морфологии опухолевых сфероидов осуществляли с использованием микроскопа DM IL LED (Leica, Германия). Временные точки были выбраны таким образом, чтобы проследить все стадии формирования опухолевого сфероидов: с начала образования клеточного агрегата до этапа гибели клеток. На каждой временной точке было проанализировано 5–7 сфероидов. Количественный анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США), рассчитывая площадь сфероидов по формуле πr^2 .

Для моделирования гипоксии опухолевые сфероиды с 3-го по 7-й день роста культивировали в инкубаторе (Sanyo, Япония) с содержанием кислорода 3,5%. Пониженное содержание кислорода достигалось путем вытеснения его азотом. FLIM выполняли на 3-й и 7-й дни культивирования.

Для проведения метаболического имиджинга опухолевые сфероиды переносили на специальные чашки со стеклянным дном для конфокальной микроскопии FluoroDish (WPI, Китай) на 2–3 ч для прикрепления. За час до процедуры визуализации стандартную питательную среду заменяли средой FluoroLite™ DMEM без фенолового красного (Gibco, США).

Иммуноцитохимический анализ. Клетки глиобластом за сутки до окрашивания высаживали на плоскодонный адгезивный пластик. Клетки фиксировали раствором 4% параформальдегида в течение 10 мин и обрабатывали раствором 0,1% Triton X-100 в течение 5 мин, инкубировали с первичными антителами к глиальному кисломому фибриллярному белку GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Boster Biological Technology, Ltd., США) в течение ночи при 4°C, затем инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 594 в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра контрастировали флуоресцентным красителем DAPI. Визуализацию осуществляли с использованием фильтра TX2 с возбуждением 560/40 нм и эмиссией 645/75 нм — для Alexa Fluor 594 и фильтра CFP с возбуждением 436/20 нм и эмиссией 480/40 нм — для DAPI.

FLIM-имиджинг. FLIM проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). В качестве источника возбуждения использовали фемтосекундный Ti:Sa-лазер (Spectra Physics, США) с частотой следования импульсов 80 МГц и длительностью 120 фс. Детекцию

времен жизни флуоресценции осуществляли с помощью FLIM-модуля TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия), основанного на время-коррелированном счете единичных фотонов. Изображения получены с использованием масляного иммерсионного объектива 40x/1.3. Возбуждение флуоресценции НАД(Ф)Н осуществляли в двухфотонном режиме на длине волны 750 нм, сигнал принимали в диапазоне 450–490 нм. Флуоресценцию ФАД возбуждали на длине волны 900 нм, регистрацию осуществляли в интервале 500–550 нм. Мощность возбуждающего излучения в обоих случаях — 7 мВт. Время сбора фотонов составляло порядка 60 с. Количество фотонов в пикселе было не менее 5000. Во время эксперимента клетки находились в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

Данные FLIM обрабатывали в программе SPCImage (Becker & Hickl GmbH, Германия). Для получения параметров кривых затухания в каждом пикселе использовали аппроксимацию методом наименьших квадратов. Кривые затухания флуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД были аппроксимированы би-экспоненциальной моделью. Точность аппроксимации оценивали посредством параметра χ^2 . Для всех данных χ^2 лежал в диапазоне от 0,8 до 1,2. Были оценены короткая и длинная компоненты затухания (τ_1 и τ_2 соответственно), относительные амплитуды этих компонент (α_1 и α_2), а также среднее время жизни флуоресценции ($\tau_m = \alpha_1\tau_1 + \alpha_2\tau_2$).

Анализ автофлуоресценции проводили поклеточно в области цитоплазмы клетки. Для каждой группы получены изображения 5–7 сфероидов. В каждом сфероиде проанализировано по 15–20 клеток.

Статистический анализ. Для сравнительного анализа данных и их графического отображения использовали программное обеспечение GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, США). Проверку непрерывных переменных на нормальность распределения проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка (при $p \geq 0,05$ распределение считалось нормальным).

В ходе мониторинга роста сфероидов вычисляли усредненную площадь сфероидов (y всех сфероидов в каждой экспериментальной группе на определенный день, по 5–7 сфероидов в каждой группе). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$).

В экспериментах по FLIM вычисляли среднее значение параметров FLIM по 15–20 клеткам для каждого сфероидов, затем определяли усредненное значение по всем сфероидам в каждой исследуемой группе (по 5–7 сфероидов в каждой группе).

При сравнительном анализе автофлуоресценции НАД(Ф)Н и ФАД между сфероидными библиотечной линии U373 MG и первичной культуры глиобластомы для нахождения статистически значимых отличий между исследуемыми группами применяли параметрический t-критерий Стьюдента (при $p \leq 0,05$ различия считались статистически значимыми).

В эксперименте по гипоксии для сравнения показателей в зависимых группах данных использовали параметрический парный t-критерий Стьюдента (при $p \leq 0,05$ различия считались статистически значимыми). Для нахождения различий между независимыми группами данных также использовали параметрический t-критерий Стьюдента (при $p \leq 0,05$ различия считались статистически значимыми).

Результаты

Характеристика краткосрочных клеточных культур

Выделенные краткосрочные культуры клеток глиобластомы демонстрировали диффузное распределение клеток и умеренный клеточный полиморфизм (рис. 1). Обнаружены многочисленные крупные клетки веретенообразной морфологии (фибробластоподобные клетки). Кроме того, наблюдались клетки тре-

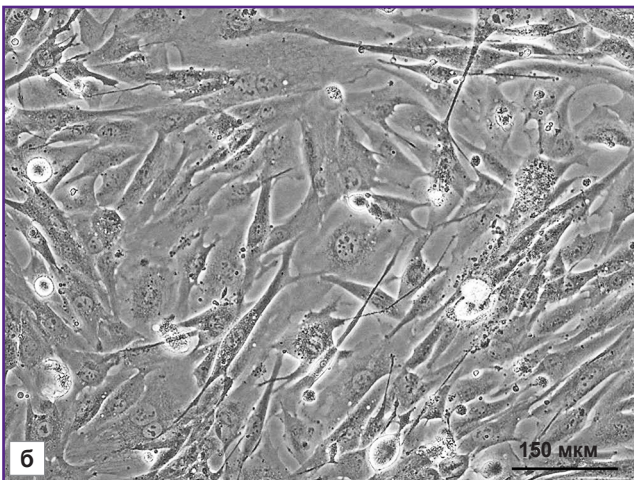
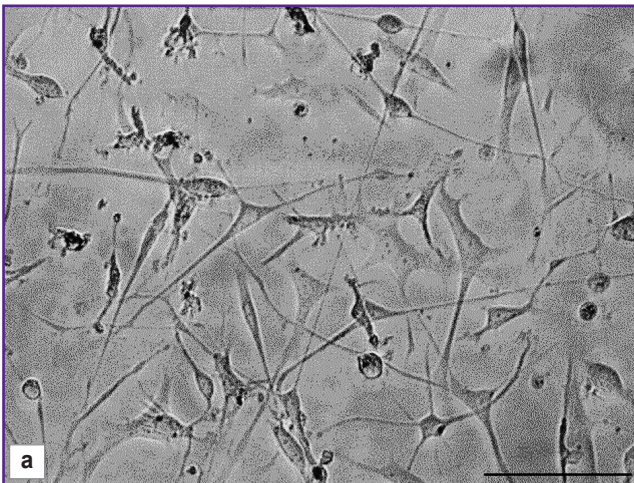


Рис. 1. Фазово-контрастные микроскопические изображения клеток глиобластомы в монослойной культуре. Краткосрочная культура глиобластомы пациента при плотности монослоя 40% (а) и 80% (б)

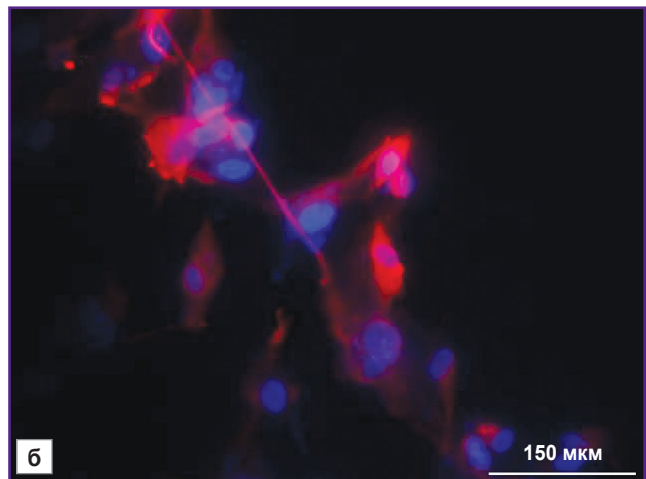
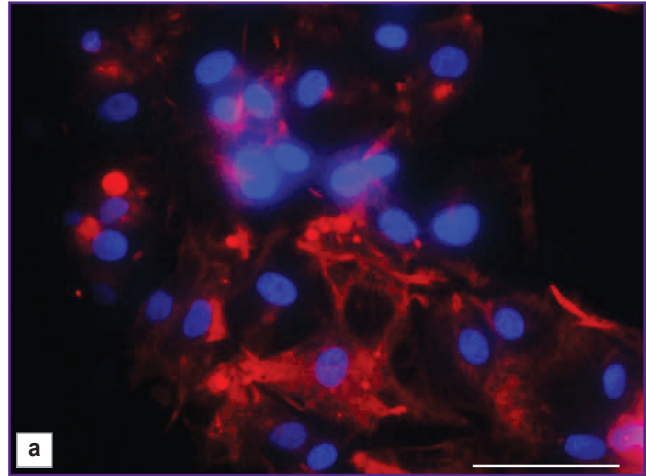


Рис. 2. Иммунофлуоресцентные микроскопические изображения клеток глиобластомы: а — краткосрочная культура глиобластомы пациента; б — библиотечная линия глиобластомы человека U373 MG. Красный канал — белок GFAP в цитоплазме клеток; синий канал — ядра клеток, окрашенные DAPI

угольной, овальной, круглой или неправильной формы. У всех клеток отмечены выраженная зернистость цитоплазмы и многочисленные отростки.

Для подтверждения природы выделенных клеток было проведено иммуноцитохимическое окрашивание на экспрессию основного глиального маркера — белка GFAP. Установлено, что все полученные культуры глиобластом экспрессировали данный белок. В качестве положительного контроля выступала библиотечная линия глиобластомы человека U373 MG, также экспрессирующая GFAP (рис. 2).

Рост и морфология опухолевых 3D-сфероидов из клеток глиобластомы пациентов

На первом этапе работы разработана оригинальная модель сфероида из краткосрочной культуры глиобластомы.

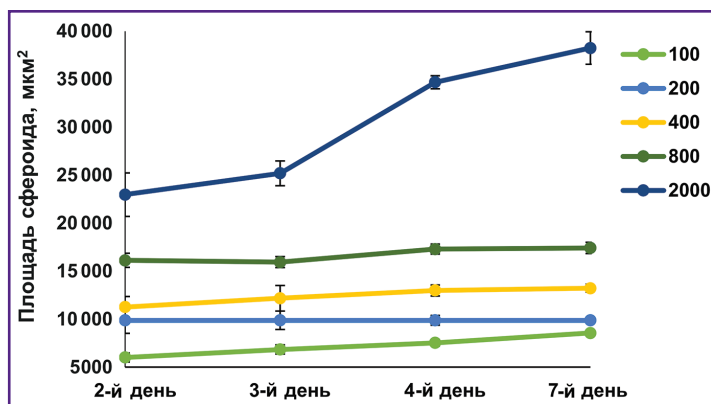


Рис. 3. Динамика роста опухолевых сфероидов, полученных из краткосрочной культуры глиобластомы пациента

Исходная концентрация клеток при посеве 100, 200, 400, 800 и 2000 клеток на лунку. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего

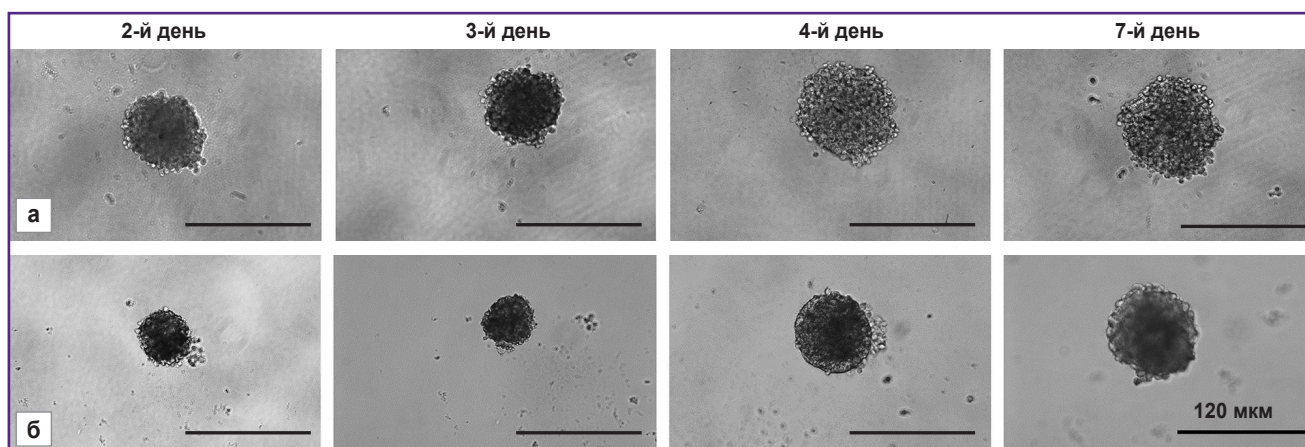


Рис. 4. Просветные микроскопические изображения опухолевых сфероидов из клеток глиобластомы, полученные на 2-, 3-, 4- и 7-й дни роста:

а — библиотечная линия глиобластомы человека U373 MG; б — краткосрочная культура глиобластомы пациента. Исходная концентрация клеток при посеве — 2000 клеток на лунку

С целью получения опухолевых сфероидов из клеток глиобластом пациентов апробированы различные количества клеток для высевания и проведено сравнение динамики их роста и морфологии. Установлено, что при посадке 100 клеток в лунку наблюдается незначительный рост клеточного агломерата в течение 7 дней (рис. 3). Данный агломерат имеет неправильную форму, рыхлую структуру без характерного оптически плотного ядра и светлого наружного слоя, что ставило под сомнение формирование сфероида. При посадке 200, 400 и 800 клеток в лунку на 2-й день культивирования образовывались некомпактные агломераты, размеры которых составляли порядка 40–70 мкм в диаметре и не менялись в течение 7 дней роста. Стоит отметить, что при посадке 800 клеток на лунку агломераты приобретали более правильную сферическую форму. Однако при всех указанных концентрациях сфероиды практически не демонстрировали роста и развития.

При посадке 2000 клеток в лунку сфероиды постепенно увеличивались в размере с 85 до 112 мкм и формировали зональную структуру в процессе развития (рис. 4).

Начиная со 2-го дня культивирования клеточные

агломераты приобретали правильную сферическую форму. К 4-му дню роста сфероиды становились более крупными и плотными и приобретали характерное разделение на слои — имели выраженную наружную оболочку с поверхностным слоем светлых, активно пролиферирующих клеток и плотное темное однородное ядро. На 7-й день роста зрелые сфероиды начинали терять свою плотную структуру, становились более рыхлыми, что впоследствии приводило к их дезагрегации. На основании этих результатов концентрация 2000 клеток на лунку была признана оптимальной для получения опухолевых сфероидов из краткосрочных культур глиобластом.

Библиотечная линия глиобластомы человека U373 MG при посеве 2000 клеток в лунку демонстрировала сходные этапы развития сфероида, появление зональности на 3-й день роста и быстрое увеличение размеров сфероида со 100 до 134 мкм.

Разработанная методика была воспроизведена на образцах глиобластом (Grade IV) 5 пациентов. Во всех случаях наблюдали устойчивое формирование опухолевых сфероидов и их рост со схожей динамикой, как у представленного образца.

Исследование метаболического статуса опухолевых 3D-сфероидов методом FLIM

Сравнение сфероидов из клеток пациента и библиотечной линии. На втором этапе работы было проведено исследование метаболического статуса опухолевых сфероидов, полученных из глиобластомы пациента и библиотечной культуры. В экспериментах по метаболическому имиджингу были использованы сфероиды на 4-й день культивирования, демонстрирующие плотную структуру с характерным разделением на зоны.

Методом FLIM получены изображения автофлуоресценции коферментов НАД(Ф)Н и ФАД в клетках сфероидов и проанализированы параметры времени жизни. В случае НАД(Ф)Н время жизни свободной (τ_1) и связанной с белком форм (τ_2) варьировало в диапазоне от 0,33 до 0,41 нс и от 2,46 до 2,63 нс соответственно и значимо не различалось между культурами опухолевых клеток. Однако для ФАД времена жизни закрытой (τ_1) и открытой (τ_2) конформаций отличались в зависимости от культуры клеток и были статистически значимо длиннее в сфероидах, сформированных из клеток пациента, по сравнению с библиотечной линией (см. таблицу). Между тем

абсолютные значения времен жизни флуоресценции коферментов НАД(Ф)Н и ФАД, зарегистрированные во всех глиальных клетках, соответствовали типичным значениям, указанным в литературе [19, 23].

Отношение вкладов свободного НАД(Ф)Н к связанному с белком (α_1/α_2) в сфероидах, полученных из первичной культуры глиобластомы (~4,6), и библиотечной линии U373 MG (~4,8) было схожим (рис. 5). Отношения вкладов ФАД в открытой и закрытой конформации (α_2/α_1) также статистически значимо не

Параметры времени жизни флуоресценции коферментов НАД(Ф)Н и ФАД в клетках опухолевых сфероидов ($M \pm SEM$)

Коферменты	Время жизни, нс	Клетки линии U373 MG	Краткосрочная культура глиобластомы (Grade IV)
НАД(Ф)Н	τ_m	0,79 \pm 0,36	0,77 \pm 0,41
	τ_1	0,36 \pm 0,14	0,37 \pm 0,40
	τ_2	2,60 \pm 0,51	2,55 \pm 0,80
ФАД	τ_m	0,77 \pm 0,22	0,94 \pm 0,72*
	τ_1	0,38 \pm 0,19	0,46 \pm 0,37*
	τ_2	2,63 \pm 1,04	3,05 \pm 1,81*

* статистически значимые различия со сфероидами из клеток линии U373 MG, $p < 0,001$.

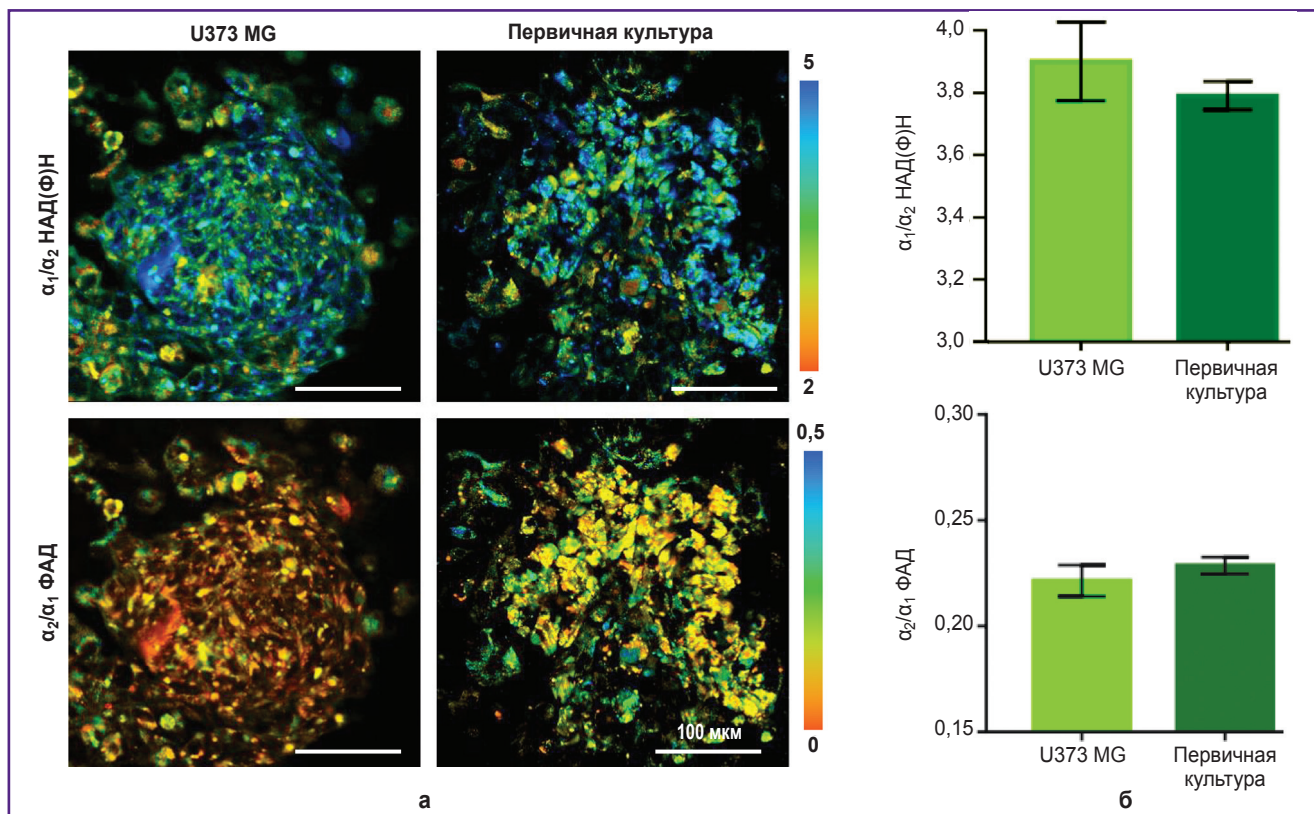


Рис. 5. Исследование метаболического статуса клеток глиомы в модели опухолевого 3D-сфероида:
 а — микроскопические FLIM-изображения отношения вкладов α_1/α_2 НАД(Ф)Н и α_2/α_1 ФАД в клетках сфероидов; изображения получены с глубины 20–30 мкм; б — количественная оценка α_1/α_2 НАД(Ф)Н и α_2/α_1 ФАД в клетках сфероидов. Столбчатые диаграммы отражают среднее значение \pm стандартную ошибку среднего

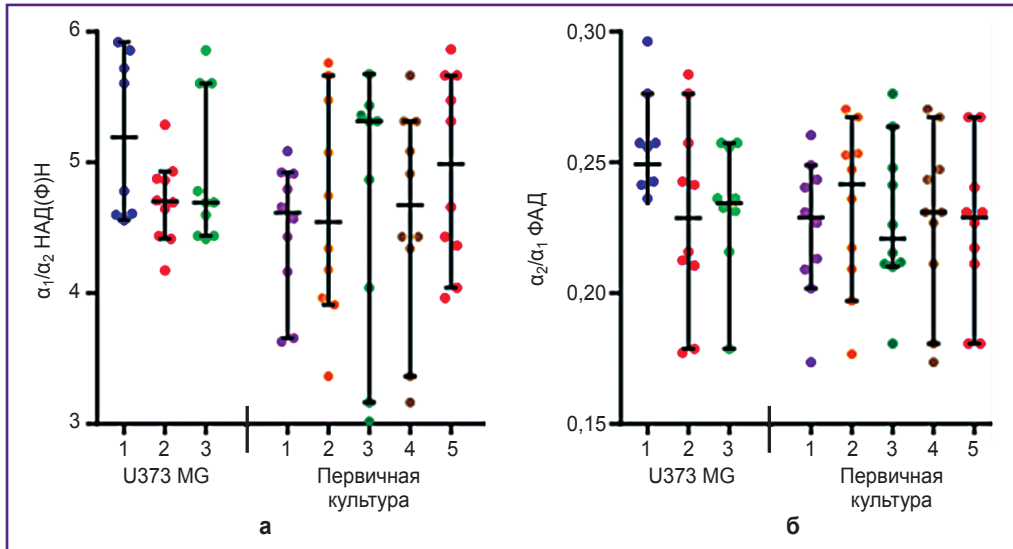


Рис. 6. Метаболическая гетерогенность опухолевых сфероидов на клеточном уровне:
 а — количественная оценка отношения вкладов свободного к связанному с белком НАД(Ф)Н по FLIM-изображениям, α_1/α_2 ; б — количественная оценка отношения вкладов открытой и закрытой конформаций ФАД по FLIM-изображениям, α_2/α_1 . Точечные диаграммы отражают измерения по отдельным клеткам внутри сфероидов, а горизонтальные и вертикальные линии — также среднее \pm стандартное отклонение. Нумерация внутри групп соответствует отдельным сфероидам, полученным из одной и той же клеточной культуры

различались в сфероидах из глиобластомы пациента ($\sim 0,22$) и линейной культуры U373 MG ($\sim 0,22$).

По данным FLIM-имиджинга, НАД(Ф)Н и ФАД более детально была проанализирована межклеточная гетерогенность метаболизма внутри каждого сфероида. Сравнение оптических метаболических показателей для периферической и центральной зон сфероидов не выявило метаболической зональности. Средние значения отношения α_1/α_2 НАД(Ф)Н и α_2/α_1 ФАД в сфероидах из одной культуры отличались незначительно. В то же время межклеточная гетерогенность метаболизма в каждом отдельно взятом сфероиде была выше в случае сфероидов, полученных из первичных культур глиобластомы, по сравнению со сфероидами из линейной культуры U373 MG, что выражалось в большом разбросе значений α_1/α_2 НАД(Ф)Н и α_2/α_1 ФАД (рис. 6).

Изменение метаболизма в условиях гипоксии.

Кислородный статус злокачественных новообразований рассматривается в настоящее время как один из ключевых факторов, определяющих прогноз заболевания и эффективность лечебных воздействий [3]. Для того, чтобы установить, чувствительны ли параметры автофлуоресценции сфероидов к метаболическим перестройкам, индуцированным гипоксией, нами с помощью метода FLIM проведено исследование опухолевых сфероидов, сформированных из краткосрочных культур глиобластом, в условиях нормоксии (21% O_2) и гипоксии (3,5% O_2).

Установлено, что начиная с 3-го дня культивирования сфероидов в условиях гипоксии наблюдается

тенденция к снижению среднего времени жизни τ_m НАД(Ф)Н ($0,71 \pm 0,02$ до $0,68 \pm 0,02$ нс) за счет снижения вклада связанной компоненты α_2 ($23,11 \pm 0,30$ до $22,62 \pm 0,20\%$) в отличие от нормоксии (рис. 7, б). На 7-й день культивирования данная тенденция становится более выраженной. Снижение τ_m и α_2 становится статистически значимым: $0,62 \pm 0,01$ нс и $20,60 \pm 0,10\%$ в условиях гипоксии против $0,65 \pm 0,01$ нс и $22,50 \pm 0,40\%$ в условиях нормоксии ($p=0,018$ и $p=0,001$ соответственно). Наблюдаемые изменения ожидаемы и связаны с переходом клеток на более гликолитический метаболизм в условиях пониженного содержания кислорода.

Обращает на себя внимание, что в более зрелых сфероидах (7-й день роста) значения τ_m и α_2 НАД(Ф)Н были ниже, чем у более «молодых» (3-й день), как при нормоксии, так и при гипоксии, что может свидетельствовать о сдвиге метаболизма в сторону гликолиза. Усиление гликолиза со временем при естественном росте сфероида может быть обусловлено ограниченной диффузией кислорода в сфероидах с плотной структурой.

Таким образом, проведенное с помощью метода FLIM исследование показало, что опухолевые сферoids из первичной культуры глиобластомы, полученные по нашему протоколу, схожи по своим метаболическим особенностям со сфероидами из стандартной клеточной линии, адекватно отвечают на изменения в содержании кислорода в микроокружении и демонстрируют более высокую степень межклеточной метаболической гетерогенности.

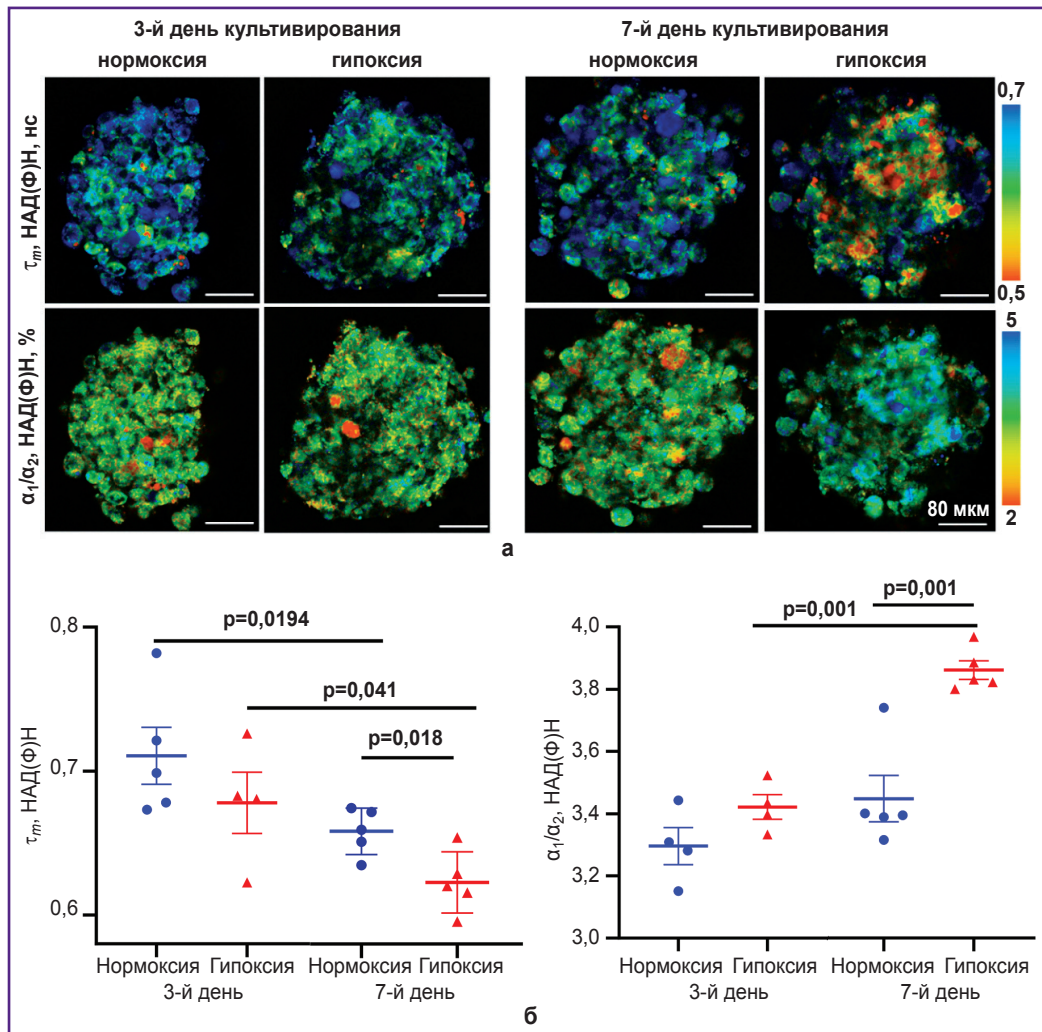


Рис. 7. FLIM 3D-сфероидов из глиобластомы пациента:

а — репрезентативные FLIM-изображения сфероидов в канале НАД(Ф)Н; **б** — количественный анализ среднего времени жизни τ_m и отношения вкладов свободного к связанному с белком НАД(Ф)Н α_1/α_2 . Точечные диаграммы отображают измерения для отдельных сфероидов, а горизонтальные линии — также среднее значение \pm стандартную ошибку среднего

Обсуждение

Глиобластомы известны своим уникальным опухолевым микроокружением, гипоксией, высокой гетерогенностью внутри опухоли и существенными различиями между опухолями разных пациентов. Именно поэтому при их исследовании важен переход от применения «устоявшихся» трансформированных глиомных линий и монослойных культур к использованию пациент-специфических моделей, приближенных по структуре к солидной опухоли [25, 26].

Краткосрочные клеточные культуры, полученные из операционного материала пациента, сохраняют молекулярный профиль и клеточную гетерогенность исходной опухоли, тем самым гораздо лучше отражая биологические свойства опухолей, чем коммерческие клеточные линии [27].

Получение культуры опухолевых клеток из опухоли пациента представляет собой сложную задачу из-за частой контаминации первичного материала и быстрого роста стромальных клеток. В литературе описано несколько методик получения временных опухолевых культур, основными среди которых являются прямое раскультирование тканей опухоли (кусочками или клеточными взвесями) и использование ксенографтов, где в качестве первичного реципиента опухолевых клеток выступает организм животного [28, 29]. Значительным недостатком последнего метода является нежелательная селекция опухолевых клеток в организме животного. В связи с этим методика прямого раскультирования опухолевых клеток признается более релевантной. Ткань для культивирования должна быть лишена некротических участков, по возможности стерильна и достаточно богата теми клетками, которые

предполагается выращивать. В отличие от многих других типов опухолей глиомы характеризуются хорошим выходом жизнеспособных опухолевых клеток. Так что в случае глиальных опухолей, особенно глиобластом, вероятность получения первичных культур наиболее высока по сравнению с другими локализациями.

В результате исследования нами была разработана 3D-модель опухолевого сфероидов на основе краткосрочной культуры, полученной из операционного материала от пациента, и проведено сравнение ее свойств со свойствами сфероидов из линейной культуры клеток глиобластомы. В литературных источниках для получения сфероидов из операционных образцов опухоли пациента в основном используют специально обработанные фрагменты опухоли диаметром 200–400 мкм, которые помещают в агар с питательной средой [30], либо сразу после ферментации образца клеточную суспензию помещают на пластик с низкоадгезивным дном, где сфероиды образуются спонтанно [31]. Для стандартизации ростовых свойств сфероидов в нашей работе была использована методика их выращивания на круглодонных низкоадгезивных планшетах из первичной клеточной культуры с фиксированным количеством клеток (2000 клеток в 200 мкл среды на лунку) для посадки, что позволило получить плотные многоклеточные структуры с воспроизводимым ростом на протяжении 7 дней.

При использовании линейных опухолевых культур количество клеток, помещенных в лунку для получения сфероидов, составляет обычно от 100 до 5000 клеток в зависимости от скорости их пролиферации [32–34].

В ходе исследования нами был выполнен анализ метаболических параметров в опухолевых сфероидов с помощью метода FLIM эндогенных коферментов НАД(Ф)Н и ФАД. Ввиду своей неинвазивности и отсутствия необходимости введения в клетку или ткань экзогенных красителей данный метод представляет собой мощный инструмент оценки метаболического статуса на клеточном уровне и уже зарекомендовал себя в исследованиях опухолевого метаболизма *in vitro* и *in vivo* [20–24]. Однако работы с применением метода FLIM на опухолевых сфероидов или подобных им структурах немногочисленны. Ранее [33] методом FLIM мы провели исследование метаболического статуса клеток опухолевых сфероидов, полученных из библиотечной линии рака шейки матки человека HeLa, и впервые продемонстрировали неоднородность клеточного метаболизма, обусловленную различной пролиферативной активностью клеток на периферии и в центре сфероида. Выявлено, что клетки периферии (зона активной пролиферации) сфероида имеют более гликолитический тип метаболизма, чем клетки центральной части (зона покоя). В настоящем исследовании метаболическая зональность в опухолевых сфероидов из клеток глиом отсутствовала, что может объясняться иными закономерностями их роста, например более

умеренной скоростью роста или диффузным распределением пролиферирующих клеток.

В ряде работ метод FLIM применялся для оценки метаболических параметров опухолевых органов — многоклеточных 3D-структур из материала опухоли пациентов, содержащих различные типы клеток [13, 35, 36]. В недавнем исследовании M. Morelli с соавт. [13] модель органоидов из глиобластом пациентов в сочетании с FLIM была предложена для предсказания ответа на терапию темозоломидом. Стоит отметить, что в отличие от сфероидов органоиды имеют неконтролируемые размеры и состав, что требует набора большего количества данных и затрудняет интерпретацию результатов. По нашим сведениям, работ по изучению метаболического статуса глиальных сфероидов на основе первичного материала с помощью метода FLIM не проводилось, что обуславливает актуальность и новизну поставленной в исследовании задачи.

Выполненное исследование показало, что опухолевые сфероиды из глиобластом пациентов практически не отличаются по оптическим метаболическим параметрам от сфероидов из библиотечной линии глиобластомы и адекватно реагируют на гипоксию изменением метаболического профиля на более гликолитический. В условиях гипоксии в сфероидов наблюдалось снижение относительного вклада связанной формы НАД(Ф)Н, ассоциированной с окислительным фосфорилированием. Состояние хронической гипоксии является характерной физиологической особенностью многих солидных опухолей, включая глиобластомы [37]. Гипоксия опосредованно воздействует на пути сигнальной трансдукции и регуляцию транскрипции ряда генов и белков, являясь таким образом независимым фактором опухолевой прогрессии [38]. В глиобластомах гипоксия коррелирует с устойчивостью к лучевой и химиотерапии. Наблюдение метаболических перестроек в условиях гипоксии при естественном росте и терапевтических воздействиях на клетки глиобластом в *in vitro* модели важно для понимания механизмов адаптации и развития резистентности опухолей.

FLIM-имиджинг метаболических кофакторов является высокочувствительным инструментом для оценки раннего ответа опухолевых клеток на химиотерапию. Нами и другими авторами это было продемонстрировано на различных опухолевых моделях *in vitro* и *in vivo* [20, 23, 24, 33, 39]. Перспективным применением метода FLIM считается прогнозирование эффективности лекарственной терапии для пациентов путем оценки метаболических параметров выделенных из опухоли клеток после лекарственного воздействия на них в условиях *in vitro*. Созданная в нашем исследовании опухолевая модель на основе клеток глиобластом пациентов и методика метаболического имиджинга FLIM могут стать методологической основой для развития персонализированных подходов в терапии глиом.

Заключение

Созданная *in vitro* 3D-модель опухолевых сфероидов из клеток, выделенных из операционного материала глиобластом пациентов, позволила получить плотные сфероиды с устойчивым ростом, демонстрирующие высокую степень клеточной метаболической гетерогенности и адекватный ответ на гипоксию. Разработанная модель опухолевых сфероидов из глиобластомы пациентов в комбинации с методом FLIM может служить инструментом для исследования особенностей опухолевого метаболизма, прогнозирования эффективности противоопухолевой терапии для пациентов и доклинического тестирования новых лекарственных препаратов.

Финансирование исследования. Работа проведена при поддержке грантов Российского научного фонда №21-75-00098 (получение и охарактеризование первичных клеточных культур) и №22-64-00057 (FLIM-исследование сфероидов).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

- Oronsky B., Reid T.R., Oronsky A., Sandhu N., Knox S.J. A review of newly diagnosed glioblastoma. *Front Oncol* 2020; 10: 574012, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.574012>.
- Zhang C., Jin M., Zhao J., Chen J., Jin W. Organoid models of glioblastoma: advances, applications and challenges. *Am J Cancer Res* 2020; 10(8): 2242–2257.
- da Hora C.C., Schweiger M.W., Wurdinger T., Tannous B.A. Patient-derived glioma models: from patients to dish to animals. *Cells* 2019; 8(10): 1177, <https://doi.org/10.3390/cells8101177>.
- Rybin M.J., Ivan M.E., Ayad N.G., Zeier Z. Organoid models of glioblastoma and their role in drug discovery. *Front Cell Neurosci* 2021; 15: 605255, <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.605255>.
- Paolillo M., Comincini S., Schinelli S. In vitro glioblastoma models: a journey into the third dimension. *Cancers (Basel)* 2021; 13(10): 2449, <https://doi.org/10.3390/cancers13102449>.
- Haddad A.F., Young J.S., Amara D., Berger M.S., Raleigh D.R., Aghi M.K., Butowski N.A. Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. *Neurooncol Adv* 2021; 3(1): vdab100, <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdab100>.
- Browning A.P., Sharp J.A., Murphy R.J., Gunasingh G., Lawson B., Burrage K., Haass N.K., Simpson M. Quantitative analysis of tumour spheroid structure. *Elife* 2021; 10: e73020, <https://doi.org/10.7554/elife.73020>.
- Han S.J., Kwon S., Kim K.S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell Int* 2021; 21(1): 152, <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01853-8>.
- Yuzhakova D.V., Shirmanova M.V., Klimenko V.V., Lukina M.M., Gavrina A.I., Komarova A.D., Gorbachev D.A., Sapogova N.V., Lukyanov K.A., Kamensky V.A. PDT with genetically encoded photosensitizer miniSOG on a tumor spheroid model: a comparative study of continuous-wave and pulsed irradiation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2021; 1865(12): 129978, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129978>.
- Perche F., Torchilin V.P. Cancer cell spheroids as a model to evaluate chemotherapy protocols. *Cancer Biol Ther* 2012; 13(12): 1205–1213, <https://doi.org/10.4161/cbt.21353>.
- Zhu Y., Kang E., Wilson M., Basso T., Chen E., Yu Y., Li Y.R. 3D tumor spheroid and organoid to model tumor microenvironment for cancer immunotherapy. *Organoids* 2022; 1(2): 149–167, <https://doi.org/10.3390/organoids1020012>.
- Hofmann S., Cohen-Harazi R., Maizels Y., Koman I. Patient-derived tumor spheroid cultures as a promising tool to assist personalized therapeutic decisions in breast cancer. *Transl Cancer Res* 2022; 11(1): 134–147, <https://doi.org/10.21037/tcr-21-1577>.
- Morelli M., Lessi F., Barachini S., Liotti R., Montemurro N., Perrini P., Santonocito O.S., Gambacciani C., Snuderl M., Pieri F., Aquila F., Farnesi A., Naccarato A.G., Viacava P., Cardarelli F., Ferri G., Mulholland P., Ottaviani D., Paiar F., Liberti G., Pasqualetti F., Menicagli M., Aretini P., Signore G., Franceschi S., Mazzanti C.M. Metabolic-imaging of human glioblastoma live tumors: a new precision-medicine approach to predict tumor treatment response early. *Front Oncol* 2022; 12: 969812, <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.969812>.
- Martínez-Reyes I., Chandel N.S. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer* 2021; 21(10): 669–680, <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00378-6>.
- Läsche M., Emons G., Gründker C. Shedding new light on cancer metabolism: a metabolic tightrope between life and death. *Front Oncol* 2020; 10: 409, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00409>.
- Chae H.S., Hong S.T. Overview of cancer metabolism and signaling transduction. *Int J Mol Sci* 2022; 24(1): 12, <https://doi.org/10.3390/ijms24010012>.
- Tong Y., Gao W.Q., Liu Y. Metabolic heterogeneity in cancer: an overview and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2020; 1874(2): 188421, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188421>.
- Kim J., DeBerardinis R.J. Mechanisms and implications of metabolic heterogeneity in cancer. *Cell Metab* 2019; 30(3): 434–446, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.013>.
- Kolenc O.I., Quinn K.P. Evaluating cell metabolism through autofluorescence imaging of NAD(P)H and FAD. *Antioxid Redox Signal* 2019; 30(6): 875–889, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7451>.
- Shirshin E.A., Shirmanova M.V., Gayer A.V., Lukina M.M., Nikonova E.E., Yakimov B.P., Budylin G.S., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Komarov D.V., Yakovlev V.V., Becker W., Zagaynova E.V., Shcheslavskiy V.I., Scully M.O. Label-free sensing of cells with fluorescence lifetime imaging: the quest for metabolic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022; 119(9): e2118241119, <https://doi.org/10.1073/pnas.2118241119>.
- Ouyang Y., Liu Y., Wang Z.M., Liu Z., Wu M. FLIM as a promising tool for cancer diagnosis and treatment monitoring. *Nanomicro Lett* 2021; 13(1): 133, <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00653-z>.
- Blacker T.S., Mann Z.F., Gale J.E., Ziegler M., Bain A.J., Szabadkai G., Duchon M.R. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nat Commun* 2014; 5: 3936, <https://doi.org/10.1038/ncomms4936>.

23. Skala M.C., Ricking K.M., Bird D.K., Gendron-Fitzpatrick A., Eickhoff J., Eliceiri K.W., Keely P.J., Ramanujam N. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *J Biomed Opt* 2007; 12(2): 024014, <https://doi.org/10.1117/1.2717503>.
24. Alam S.R., Wallrabe H., Svindrych Z., Chaudhary A.K., Christopher K.G., Chandra D., Periasamy A. Investigation of mitochondrial metabolic response to doxorubicin in prostate cancer cells: an NADH, FAD and tryptophan FLIM assay. *Sci Rep* 2017; 7(1): 10451, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10856-3>.
25. Boucherit N., Gorvel L., Olive D. 3D tumor models and their use for the testing of immunotherapies. *Front Immunol* 2020; 11: 603640, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603640>.
26. Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C., West J., Mueller-Klieser W., Kunz-Schughart L.A. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol* 2010; 148(1): 3–15, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>.
27. Abdolahi S., Ghazvinian Z., Muhammadnejad S., Saleh M., Asadzadeh Aghdai H., Baghaei K. Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *J Transl Med* 2022; 20(1): 206, <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03405-8>.
28. Yoshida G.J. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol* 2020; 13(1): 4, <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0829-z>.
29. Chen C., Lin W., Huang Y., Chen X., Wang H., Teng L. The essential factors of establishing patient-derived tumor model. *J Cancer* 2021; 12(1): 28–37, <https://doi.org/10.7150/jca.51749>.
30. Aaberg-Jessen C., Nørregaard A., Christensen K., Pedersen C.B., Andersen C., Kristensen B.W. Invasion of primary glioma- and cell line-derived spheroids implanted into corticostriatal slice cultures. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(4): 546–560.
31. Witusik-Perkowska M., Rieszke P., Hula-Bigoszewska K., Zakrzewska M., Stawski R., Kulczycka-Wojdala D., Bierkowski M., Stoczyńska-Fidelus E., Grešner S.M., Piaskowski S., Jaskólski D.J., Papier W., Zakrzewski K., Kolasa M., Ironside J.W., Liberski P.P. Glioblastoma-derived spheroid cultures as an experimental model for analysis of EGFR anomalies. *J Neurooncol* 2011; 102(3): 395–407, <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0352-0>.
32. Stadler M., Scherzer M., Walter S., Holzner S., Pudielko K., Riedl A., Unger C., Kramer N., Weil B., Neesen J., Hengstschläger M., Dolznig H. Exclusion from spheroid formation identifies loss of essential cell-cell adhesion molecules in colon cancer cells. *Sci Rep* 2018; 8(1): 1151, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19384-0>.
33. Lukina M.M., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Druzhkova I.N., Shimolina L.E., Zagaynova E.V., Shirmanova M.V. Metabolic cofactors NAD(P)H and FAD as potential indicators of cancer cell response to chemotherapy with paclitaxel. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2018; 1862(8): 1693–1700, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.021>.
34. Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Matlashov M.E., Belousov V.V., Snopova L.B., Prodanetz N.N., Dudenkova V.V., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V. Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new genetically encoded sensor SypHer2. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850(9): 1905–1911, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.05.001>.
35. Pasch C.A., Favreau P.F., Yueh A.E., Babiarz C.P., Gillette A.A., Sharick J.T., Karim M.R., Nickel K.P., DeZeeuw A.K., Sprackling C.M., Emmerich P.B., DeStefanis R.A., Pitera R.T., Payne S.N., Korkos D.P., Clipson L., Walsh C.M., Miller D., Carchman E.H., Burkard M.E., Lemmon K.K., Matkowskyj K.A., Newton M.A., Ong I.M., Bassetti M.F., Kimple R.J., Skala M.C., Deming D.A. Patient-derived cancer organoid cultures to predict sensitivity to chemotherapy and radiation. *Clin Cancer Res* 2019; 25(17): 5376–5387, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-3590>.
36. Sharick J.T., Walsh C.M., Sprackling C.M., Pasch C.A., Pham D.L., Esbona K., Choudhary A., Garcia-Valera R., Burkard M.E., McGregor S.M., Matkowskyj K.A., Parikh A.A., Meszoely I.M., Kelley M.C., Tsai S., Deming D.A., Skala M.C. Metabolic heterogeneity in patient tumor-derived organoids by primary site and drug treatment. *Front Oncol* 2020; 10: 553, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00553>.
37. Park J.H., Lee H.K. Current understanding of hypoxia in glioblastoma multiforme and its response to immunotherapy. *Cancers Basel* 2022; 14(5): 1176, <https://doi.org/10.3390/cancers14051176>.
38. Sebestyén A., Kopper L., Dankó T., Tímár J. Hypoxia signaling in cancer: from basics to clinical practice. *Pathol Oncol Res* 2021; 27: 1609802, <https://doi.org/10.3389/pore.2021.1609802>.
39. Shirmanova M.V., Druzhkova I.N., Lukina M.M., Dudenkova V.V., Ignatova N.I., Snopova L.B., Shcheslavskiy V.I., Belousov V.V., Zagaynova E.V. Chemotherapy with cisplatin: insights into intracellular pH and metabolic landscape of cancer cells in vitro and in vivo. *Sci Rep* 2017; 7(1): 8911, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09426-4>.