

## Двух- и трехмерная культура клеток

А. И. Хоруженко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

a.i.khoruzhenko@imbg.org.ua

---

*Культивирование клеток млекопитающих в трехмерных условиях становится приоритетным в многочисленных биомедицинских приложениях. В области токсикологии и разработки противоопухолевых препаратов это связано со значительной разницей ответа клеток, культивируемых в двух- или трехмерных условиях, на проапоптотические факторы. Кроме того, выявлены существенные отличия в поляризации клеток, структуре цитоскелета, распределении рецепторов к широкому спектру гормонов, ростовых факторов и т. д. в клетках млекопитающих в зависимости от условий культивирования. В конечном итоге, это проявляется в различной реакции культивируемых клеток на внеклеточные стимулы. Наиболее адекватной моделью роста солидных опухолей in vitro сейчас принято считать многоклеточные сфероиды. Культивирование фолликулов щитовидной железы, ацинусов молочной железы и других структурно-функциональных единиц, сохраняющих исходную организацию ткани, позволяет изучать поведение, биохимические особенности и генетический профиль дифференцированных клеток. С другой стороны, трехмерные культуры имеют ряд ограничений по сравнению с широко используемыми монослойными культурами. Недостатки и преимущества каждого типа культур, а также их применение в биологических и медицинских исследованиях являются предметом этого обзора.*

*Ключевые слова: двух- и трехмерное культивирование, резистентность, дифференцировка.*

---

**Краткая история создания метода культуры клеток.** Метод культуры клеток является мощным инструментом в медико-биологических исследованиях. Первые фундаментальные статьи, посвященные разработке этого подхода, появились около 100 лет тому назад. Подбор условий культивирования, являющихся на сегодня стандартными (температура, увлажненная газовая фаза, техника асептики, стандартизированные культуральные питательные среды), потребовал серьезных усилий, что отражено в работах Ламберта, Карреля и др. [1–4]. Сама возможность существования живых клеток вне исходного организма впервые показана Лоебом еще в 1897 году, когда впервые удалось пересадить фрагменты кожи эмбриона морской свинки в агар, на коагулированную сыворотку и в организм взрос-

лой особи [2]. Источником получения культур по времени стала не только эмбриональная ткань, культуры клеток начали выделять также из различных опухолей [3]. Первые культуры получали, помещая фрагмент ткани в плазму, где впоследствии образовывался фибриновый сгусток, либо же в агар. Такое культивирование продолжалось не менее 20 дней [4]. Решающее значение получил тот факт, что оказалось возможным выделять клеточные культуры не только из различных тканей организма, но и из первичных культивируемых клеток за счет их пассирования, как это показано на вторичных и третичных культурах щитовидной железы, селезенки, клеток саркомы [4].

Практически одновременно в нескольких лабораториях выявили, что в условиях культуры клетки способны к пролиферации. Другим интересным фактом явилось наблюдение, что вне организма

клетки нервной системы эмбриона лягушки способны к дифференцировке, а именно – образовывали длинные нервные окончания [4]. Кроме того, в 1912 году установлено, что культивируемые клетки млекопитающих, в частности, клетки лимфатических узлов и костного мозга морской свинки способны продуцировать антитела [5].

Следующим этапом развития метода культуры клеток стала попытка получения чистых культур клеток определенного типа. Так, из стромы сердца эмбриона цыпленка выделены первичные культуры, состоящие либо из амебоидных клеток, либо из круглых [6]. Максимов, сформулировавший унитарную теорию кроветворения и впервые употребивший термин «стволовая клетка», исследовал соединительную ткань человека методом культуры клеток [7].

В дальнейшем использование клеточного материала эмбрионов курицы позволило получать первичные культуры разных типов клеток, а применение культур клеток грызунов – уже установленные клеточные линии [8]. На примере клеток HeLa показана возможность поддержания установленных линий, происходящих из опухолевых клеток человека [9]. Классические исследования Хейфлика выявили временные границы жизни нормальных клеток эмбриона цыпленка в культуре [10]. Последующее бурное развитие метода культуры клеток продемонстрировало его пригодность не только для биомедицины, но и для исследований в области фармакологии, экологии и ветеринарии.

**Терминология.** Прежде чем приступить к изложению методов культивирования, приведем некоторые наиболее употребляемые термины в соответствии с пособием Фрешни [11]. *Тканевая культура* – общий термин, он включает органную и клеточную культуру. Под *органной культурой* всегда подразумевают трехмерную культуру недезагрегированной ткани, сохраняющую некоторые или все гистологические особенности исходной ткани; под *клеточной* – культуру, инициированную из диспергированных клеток, выделенных из исходной ткани, первичных культур или клеточных линий вследствие энзиматической, химической или механической дезагрегации. Согласно учебному пособию Адамса [12], *первичной* следует считать культуру клеток, полученную непосредственно из организма, последующее ее субкульти-

вирование дает *клеточные линии*, в основном, гетерогенные по своему составу. Клонирование, физическая или какая-либо другая селекция клеток из клеточной линии позволяет получать *клеточные штаммы* со специфическими свойствами [11, 12]. *Гистиотипические культуры* являются результатом дезагрегирования клеточного материала для восстановления трехмерной тканеподобной структуры. *Органотипические культуры* подобны гистиотипическим, но для их получения используют несколько видов клеток (классическим примером является сокультивирование эпидермальных кератиноцитов и дермальных фибробластов) [11].

#### **Источники получения клеточных культур.**

Для исследований в области биомедицины наиболее широко применяют культуры клеток млекопитающих, в том числе человека. Поэтому основное внимание в обзоре будет уделено именно указанным культурам. Их получают как из нормальной ткани, так и из патологически измененных органов и тканей, включая доброкачественные, злокачественные опухоли, ткани в состоянии воспаления, нарушения метаболических процессов и т. д.

Первичные культуры клеток, полученные из ткани организма, имеют ряд преимуществ, в первую очередь, это непосредственное происхождение от клеток исходного организма, а также относительная простота получения двухмерных первичных культур. Культивирование клеток млекопитающих в трехмерных условиях с сохранением исходной тканевой организации максимально приближает условия эксперимента к таковым организма. В медицине первичные культуры используют для определения кариотипа и в некоторых других исследованиях [13]. С другой стороны, существуют и ограничения в их применении, среди которых необходимость в источнике для получения культур, более низкий уровень воспроизводимости результатов, ограниченное количество возможных удвоенных популяций для клеток из нормальной ткани. Указанные проблемы частично можно решить, используя клеточные линии, полученные из нормальных, доброкачественных или малигнизированных опухолевых тканей, для изучения механизмов злокачественной трансформации клеток, испытания лекарственных препаратов, в частности, супрессоров опухолевого роста, выявления отличий в физиологических и биохимических показателях опу-

холевых и нормальных клеток. Клетки линий выращивают как в двухмерных, так и в трехмерных условиях [14]. Установленные линии клеток широко применимы в исследовательской работе, им присущ более высокий уровень воспроизводимости в эксперименте по сравнению с первичными. В свою очередь, применение клеточных линий имеет некоторые ограничения. Фенотип и генотип культивируемых клеток могут существенно отличаться от таковых клеток исходной ткани. В частности, популяции клеток злокачественных опухолей гетерогенны по своему составу, таким образом, в ходе культивирования происходит селекция клеток по их способности к выживанию. Кроме того, при работе с несколькими клеточными линиями существует проблема их кроссконтаминации. Исследования, проведенные рядом авторов, показали, что из 40 наиболее используемых линий клеток щитовидной железы лишь 23 имели уникальный генетический профиль. У части линий оказалось общее происхождение, для других отмечена кроссконтаминация клетками других линий [15]. Клеточные линии неприменимы при определении индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам (в первую очередь химиотерапевтическим).

**Подходы к культивированию клеток человека и млекопитающих, их недостатки и преимущества.** *Органные культуры.* При культивировании небольших кусочков ткани методом органной культуры сохраняется исходная гистологическая структура, что обеспечивает существенную корреляцию с условиями *in vivo*. Однако после нескольких суток культивирования в центральной зоне эксплантата начинается процесс некроза, обусловленный недостаточным доступом кислорода и питательных веществ. Со временем этот процесс распространяется и на периферию. Для преодоления указанной проблемы разрабатывают специальные приспособления, среди которых, например, камера ACUSYST-S [16]. Другой подход предполагает использование миниорганных культур. При помощи точной микроскопической техники размер измельченных фрагментов ткани щитовидной железы уменьшают до 0,5–0,9 мм, кроме того, повышают содержания кислорода до 50 %, что способствует резкому сокращению зоны некроза. Таким образом получены культуры из нормальной ткани и злокачественной опухоли щитовидной железы [17].

*Монослойные культуры и культуры на флолирующих подложках.* Метод монослойного культивирования широко применяют в биомедицинских исследованиях, в частности, для определения митотического потенциала клеток, изменения их функциональной активности под воздействием определенных факторов, при сравнении физиологических и биохимических характеристик клеток, полученных из нормальной и опухолевой ткани. При анализе кариотипа человека для диагностики наряду с суспензионной культурой лимфоцитов используют монослойные культуры дермальных фибробластов. Однако этот подход имеет существенный недостаток. При культивировании в двухмерных условиях исследуемые клетки теряют свою гистологическую организацию, что, в конечном итоге, отражается как на их поведении, так и на биохимических особенностях. Кроме того, нарушается поляризация культивируемых клеток. В первую очередь это касается эпителиальных клеток, у которых *in vivo* четко разграничены функции апикальной и базальной мембран [18].

На примере культуры клеток щитовидной железы некоторыми авторами показано, что утрата фолликулярной организации в условиях монослойной культуры приводит к потере поляризации тиреоцитов, существенному снижению способности захватывать и транспортировать йод, нарушению межклеточных контактов и связи с базальной мембраной [19, 20]. Подобные изменения отмечены для клеток других органов и тканей, включая молочную железу, почки и др. [21, 22]. Для решения возникших вопросов было предложено культивирование в трехмерных условиях.

Промежуточным вариантом можно считать культуры, в которых клетки стимулируют соответствующими факторами к образованию исходных гистоподобных структур [23, 24].

Кроме того, использование коллагеновой или желатиновой подложки для флолирующих монослойных культур позволяет сохранить поляризацию культивируемых эпителиальных клеток [25]. Так, в работе [25] приведены данные об асимметричности локализации рецепторов к тиреотропному гормону. При добавлении последнего к клеткам, культивируемым на коллагеновом геле, прикрепленном к поверхности пластика, эффекта гормона на клетки не наблюдали. В случае открепления геля

с клетками от культуральной поверхности тиреоциты становятся чувствительными к действию тиреотропного гормона.

Дальнейшее развитие этого подхода привело к использованию двухкамерных устройств, разделенных мембраной – трансвеллов. На примере культур клеток, полученных из нормальной и опухолевой тканей различных органов, определено, что при культивировании на трансвеллах клетки сохраняют свою полярность [26, 27].

*Многоклеточные сфероиды.* Для моделирования опухолевого роста, особенно в случае низкодифференцированных опухолей, часто используют многоклеточные сфероиды, которые в дальнейшем анализируют биохимическими, гистологическими и иммуногистохимическими методами [28]. Для получения сфероидов суспензию клеток помещают в условия, предотвращающие адгезию клеток к ростовой поверхности. Чаще всего для этого используют слой агарозы либо силиконизированную поверхность [29]. Ограничением этого метода культивирования, как и в случае органных культур, является недостаточный доступ кислорода и питательных веществ в центральные участки сфероида после достижения им значительных размеров. Сфероидные культуры применяют для анализа внеклеточного матрикса ввиду подобности сфероидных культур и солидных опухолей [30, 31]. Более того, использование сфероидных культур позволило выявить разницу во взаимодействии клеток папиллярных и фолликулярных карцином щитовидной железы с эндотелиальными клетками при моделировании экстравазии опухолевых клеток из кровяного русла [32].

*Культивирование в мягком агаре.* Опухолевый потенциал культивированных клеток часто выявляют по их способности формировать колонии в мягком агаре. Смысл этого теста состоит в определении количества клеток, которые могут самостоятельно дать начало новой колонии, что рассматривается как модель начальных этапов роста метастаза в условиях организма. Затем суспензию исследуемых клеток помещают в мягкий агар (концентрация агарозы составляет около 0,3 %) для обеспечения обособленного роста каждой из клеток. Через определенный срок культивирования вычисляют коэффициент эффективности колониеобразования, для чего отношение количества сформиро-

ванных колоний к числу внесенных клеток выражают в процентах [33]. Несмотря на то, что вопрос происхождения метастазов из одной клетки или из колонии клеток остается дискуссионным, этот тест нашел широкое применение в фармакологических исследованиях опухолевых супрессоров [34]. Многими авторами показано, что чувствительность опухолевых клеток, культивируемых в мягком агаре, к проапоптотическим агентам лучше коррелирует с результатами, полученными *in vivo*, чем реакция клеток, культивируемых в монослое.

*Агрегаты фолликулов, ацинусов и т. п.* Кроме описанных выше, существует еще один подход к культивированию клеток млечопитающих в трехмерных условиях. Он предполагает использование «функциональных единиц» (фолликулов, ацинусов и т. п.) для инициации первичных культур с дальнейшим сохранением исходной гистологической структуры. Для этого фолликулы или ацинусы «вылущивают» из исходной ткани при помощи матрикс-деградирующих ферментов и либо помещают на неадгезивный субстрат, либо погружают в коллагеновый гель (матригель и т. п.). В условиях ротационной культуры можно работать с суспензией фолликулов щитовидной железы [35]. Если же их поместить на слой агарозы или силиконизированный пластик, то можно добиться образования флотирующих агрегатов, во многом сохраняющих исходное гистологическое строение. Такие культуры имеют существенные преимущества с точки зрения как физиологии клеток, так и методических подходов к использованию культур в эксперименте. В большинстве случаев сохранение исходной структуры ткани в условиях культуры связано с поддержанием функциональной активности исследуемых клеток. С другой стороны, такой методический подход позволяет проводить гистологический и иммуногистохимический анализ культур на наличие и локализацию определенных антигенов в самих клетках и во внеклеточном матриксе. Ограничением его является то, что он предполагает получение достаточного количества материала из ткани организма для инициации первичных культур. Как и в случае многоклеточных сфероидов, при достижении значительных размеров замедляется доступ кислорода и питательных веществ в центральные участки агрегата. Для поддержания клеток в дифференцированном состоянии (как и для

других типов культур) необходимы дополнительные ростовые факторы и гормоны в зависимости от происхождения культивируемых клеток. Кроме того, при ферментативной дезагрегации ткани часть структур разрушается и в составе флолирующих агрегатов могут появляться бесструктурные участки. Однако при учете вышеуказанных вопросов этот подход позволяет изучать свойства клеток в условиях, максимально приближенных к условиям *in vivo*. Так, нами показано, что культивирование тиреоцитов человека и крысы в условиях монослойной культуры приводит к существенному снижению содержания в клетках тиреоглобулина, являющегося основным показателем их функциональной активности. Иммунохимический анализ выявил, что через 10 дней культивирования в монослойной культуре только 30 % клеток содержат тиреоглобулин, подобные результаты получены и при исследовании клеток, культивированных в виде многоклеточных сфероидов. В отличие от них все клетки в составе фолликулоподобных структур флолирующих агрегатов фолликулов демонстрируют выраженную положительную иммуногистохимическую реакцию на тиреоглобулин. Более того, клетки из участков, не сохранивших фолликулоподобной организации, не содержали тиреоглобулин. Таким образом, нашими исследованиями установлено, что культивирование тиреоцитов в виде агрегатов фолликулов ближе к условиям живого организма, чем культивирование в виде монослоя или многоклеточных сфероидов [36, 37].

**Применение двух- и трехмерных культур в биомедицинских исследованиях.** Проблема поддержания дифференцировки клеток в монослойной культуре. Гистологическая структура тканей организма тесно связана с выполнением клетками своих специфических функций. Структура кишечника обеспечивает процессы всасывания питательных веществ, альвеол – газообмен, мышечной ткани – сокращения и т. д. Нарушения функции органов очень часто сопровождаются изменениями в тканевой организации. Так, например, замещение мышечной ткани соединительнотканью волокнами затрудняет мышечные сокращения, плоскоклеточная метаплазия тиреоцитов снижает функцию щитовидной железы, возникновение атеросклеротических бляшек нарушает кровообращение и т. п. Поэтому при моделировании различных процессов

в условиях вне организма необходимо учитывать особенности исходной ткани.

Весьма успешным оказалось использование монослойных культур в изучении кератиноцитов кожи человека и млекопитающих. При этом удалось не только получить воспроизводимые культуры клеток, но и, воздействуя определенными факторами (изменение концентрации кальция, культивирование на границе раздела жидкой и газовой фаз и т. д.), достичь уровня стратификации слоев кератиноцитов, соответствующего таковому *in vivo*. Практически, подход к получению искусственных аналогов кожи (включая использование культивируемых кератиноцитов и фибробластов) базируется на сочетании методов двух- и трехмерного культивирования, что с успехом применяют во многих лабораториях [38]. Показано, что в условиях монослойной культуры эндотелиальные клетки содержат фактор Виллебранда, являющийся одним из маркеров их дифференцировки, и могут секретировать внеклеточный матрикс, частично напоминающий их матрикс *in vivo* [39]. С другой стороны, в таких условиях нарушается способность к сокращению гладкомышечных клеток [40]. Как указано выше, в тиреоцитах резко снижается содержание тиреоглобулина. Хотя в некоторых случаях скопления тиреоцитов, сформированные под влиянием тиреотропного гормона в монослойной культуре, считали фолликулоподобными структурами [41].

*Чувствительность клеток к проапоптотическим факторам в условиях двух- и трехмерных культур.* Тенденции последних лет в медико-биологических исследованиях указывают на преимущества культивирования клеток в трехмерных условиях [42]. В 1997 году группой Биссель получен ряд убедительных данных о разнице в поведении клеток карциномы молочной железы человека, выращиваемых в виде двух- и трехмерных культур. При инкубации клеток, росших в трехмерной культуре, с антителами к бета 1-интегрину клетки карциномы молочной железы приобретали немалигнизированный фенотип, теряли атипичную форму, изменяли тип роста. Но этот эффект не воспроизводился в монослойной культуре [43].

На следующем этапе работы этой группы было выявлено, что при трехмерном культивировании добавление антител к бета 1-интегрину тормозит передачу внутриклеточного сигнала от рецепторов

эпидермального фактора роста (EGF). С другой стороны, антитела к рецептору EGF подавляют активность бета 1-интегрина. В условиях двухмерной культуры не удалось достичь такого реципрокного эффекта [44]. Рецепторы к ростовым факторам играют ключевую роль в развитии злокачественных опухолей, и это не единственный вывод при исследовании механизмов канцерогенеза, полученный с помощью трехмерных культур. В процессе метастазирования клетки, как правило, продуцируют ферменты, расщепляющие фибриллы внеклеточного матрикса [45]. Ингибиторы этих ферментов иногда используют в клинической практике. Однако на модели трехмерных культур показано, что даже при условии полного ингибирования матриксных металлопротеиназ, сериновых протеаз, катепсина и других протеаз клетки фибросаркомы не перестают мигрировать. Их форма из вытянутой становится более округлой и за счет амебоидного движения клетки продолжают «протискиваться» сквозь волокна матрикса. Таким же образом ведут себя эти клетки после инъекции под кожу мышей [46]. Более того, Маршалл и др. показали, что при блокировании Rho-сигнального пути клетки теряют способность к амебоидному движению, независимо от протеолитических ферментов. Итак, на трехмерной модели культивирования продемонстрирован путь комбинированного угнетения метастазирования опухолевых клеток [47]. На фибробластах выявлено, что в трехмерной культуре в отличие от монослойной эти клетки растут быстрее и становятся асимметричными, как в условиях *in vivo* [48].

Кроме того, показана резистентность клеток мезотелиомы, культивируемых в трехмерных условиях, к TRAIL (TNF – related apoptosis-inducing ligand) в комплексе с гемцитабином, тогда как в монослойной культуре клетки проявляли чувствительность к этим агентам [49, 50]. Подобный эффект наблюдали и при исследовании влияния комплекса бортезомиба и TRAIL как проапоптотических агентов на клетки карциномы легкого A549. При помещении клеток в условия монослойной культуры указанные агенты вызывали апоптоз, тогда как в сфероидных культурах изучаемые клетки оказывались устойчивыми к этим факторам, что коррелирует с результатами, полученными на лабораторных животных [51].

**Заключение.** Подытоживая вышеизложенное, следует отметить, что каждый из подходов к культивированию имеет как свои преимущества, так и недостатки. Однако при выборе условий культивирования первоочередное внимание должно быть обращено на исходную гистологическую организацию исследуемой ткани. Помещение клеток в несвойственные им условия влечет за собой нарушения межклеточных взаимодействий, поляризации, распределения рецепторов ростовых факторов и гормонов и вносит свой собственный вклад в ответ клеток на испытываемые факторы. В последнее время культивирование в трехмерных условиях рассматривают как один из приоритетных путей при исследовании свойств клеток *in vitro* [52–54]. Подобная точка зрения базируется на положении о том, что *in vivo* в организме клетки находятся в составе трехмерных структур, например, фолликулы щитовидной железы. Это обеспечивает выполнение тканями и органами их специфических функций. Однако, как правило, при исследовании таких культур возникает ряд вышеуказанных методических вопросов. С другой стороны, в условиях монослойной культуры клетки сохраняют много фундаментальных свойств, присущих им *in vivo*, включая часть антигенов – маркеров дифференцировки. Поэтому наиболее перспективным представляется использование сочетания этих двух способов культивирования при исследовании адгезии, пролиферации, миграции, инвазии, дифференцировки клеток и многих других процессов, имеющих место в организме в норме или при возникновении патологии [55].

*A. I. Khoruzhenko*

2D- and 3D-cell culture

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine  
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

*The cultivation of mammalian cells in three-dimensional conditions acquires a priority in a variety of biomedical applications. In the areas of toxicology and anticancer drug development it concerns a significant difference of responses to proapoptotic factors of the cells cultured in 2D versus 3D environment. Besides, the clear-cut differences have been found in cell polarity, cytoskeleton structure, distribution of receptors to wide range of hormones, growth factors, etc. in mammalian cells depending on culture conditions. It is resulted in different response of cultured cells to extracellular stimuli. Multicellular spheroids are regarded presently as the most convenient model of solid tumour growth in vitro. The cultivation of*

thyroid follicles, mammary acini and other structure units, maintaining initial tissue organization, allows studying the behavior, biochemical features and gene profile of differentiated cells. On the other hand, 3D cultures have some limitations in comparison with a well established monolayer culture. The advantages and disadvantages of each type of cultures and their application in biological and medical researches will be discussed in this review.

*Key words:* 2D and 3D cultivation, resistance, differentiation.

A. I. Хоруженко

Дво- і тривимірна культура клітин

Резюме

Культивування клітин ссавців за тривимірних умов стає пріоритетним у численних біомедичних застосуваннях. В галузі токсикології і розробки протипухлинних препаратів це пов'язано з значною різницею у відповіді клітин, культивованих за дво- або тривимірних умов, на проапоптотичні чинники. Крім того, виявлено істотні відмінності в поляризації клітин, структурі цитоскелета, розподілі рецепторів до широкого спектра гормонів, ростових чинників і т. д. у клітинах ссавців залежно від умов культивування. Зрештою, це проявляється в різній реакції культивованих клітин на позаклітинні стимули. Найадекватнішою моделлю росту солідних пухлин *in vitro* наразі вважають багатоклітинні сфероїди. Культивування фолікулів щитоподібної залози, ацинусів молочної залози та інших структурно-функціональних одиниць, що зберігають початкову організацію тканини, дозволяє вивчати поведінку, біохімічні особливості і генетичний профіль диференційованих клітин. З іншого боку, тривимірні культури мають низку обмежень порівняно з широко використовуваними моношаровими культурами. Недоліки й переваги кожного типу культури, а також їхнє застосування в біологічних і медичних дослідженнях становлять предмет цього огляду.

*Ключові слова:* дво- та тривимірне культивування, резистентність, диференціювання.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lambert R. A. The effect of dilution of plasma medium on the growth and fat accumulation of cells in tissue cultures // J. Exp. Med.—1914.—**19**, N 4.—P. 398–405.
- Loeb L. On the growth of epithelium in agar and blood-serum in the living body // J. Med. Res.—1902.—**8**, N 1.—P. 109–115.
- Carrel A., Burrows M. T. Cultivation *in vitro* of malignant tumors // J. Exp. Med.—1911.—**13**, N 5.—P. 571–575.
- Carrel A., Burrows M. T. Cultivation of tissues *in vitro* and its technique // J. Exp. Med.—1911.—**13**, N 3.—P. 387–396.
- Carrel A., Ingebrigtsen R. The production of antibodies by tissues living outside of the organism // J. Exp. Med.—1912.—**15**, N 3.—P. 287–291.
- Carrel A. Pure cultures of cells // J. Exp. Med.—1912.—**16**, N 2.—P. 165–168.
- Danilov R. K., Gololobov V. G., Deev R. V. Aleksandr Aleksandrovich Maksimov – vydayushchiysya otechestvennyy gistolog (stranitsy zhizni i nauchnoe nasledie) // Vestnik Rossiyskoy Voenno-Meditsinskoy Akademii.—2003.—**2**, N 6.—P. 54–60.
- Earle W. R., Schilling E. L., Stark T. H., Straus N. P., Brown M. F., Shelton E. Production of malignancy *in vitro*. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells // J. Natl Cancer Inst.—1943.—**4**.—P. 165–212.
- Gey G. O., Coffman W. D., Kubicek M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium // Cancer Res.—1952.—**12**.—P. 264–265.
- Hayflick K. L., Moorhead P. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp. Cell Res.—1961.—**25**.—P. 585–589.
- Freshney R. I. Culture of animal cells. A manual of basic technique / 4<sup>th</sup> edition.—New York: Wiley-Liss, 2000.—600 p.
- Adams R. L. P. Cell culture for biochemists.—Moskwa: Mir, 1983.—263 p.
- Park I. H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M. W., Cowan C., Hochedlinger K., Daley G. Q. Disease-specific induced pluripotent stem cells // Cell.—2008.—**134**, N 5.—P. 877–886.
- Grimm D., Kossmehl P., Shakibaei M., Schulze-Tanzil G., Pickenhahn H., Bauer J., Paul M., Cogoli A. Effects of simulated microgravity on thyroid carcinoma cells // J. Gravit. Physiol.—2002.—**9**, N 1.—P. 253–256.
- Schwepe R. E., Klopfer J. P., Korch C., Pugazhenthil U., Benzebra M., Knauf J. A., Fagin J. A., Marlow L. A., Copland J. A., Smallridge R. C., Haugen B. R. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification // J. Clin. Endocrinol. Metab.—2008.—**93**, N 11.—P. 4331–4341.
- Velicky J., Sterzl L., Mandys V., Bednar J., Titlbach M., Niahodil V. Morphological changes in the human thyroid gland cultivated in continual flow system // Zhur. Mikrosk. Anat. Forsch.—1990.—**104**, N 5.—P. 788–796.
- Bauer M. F., Herzog V. Mini organ culture of thyroid tissue: a new technique for maintaining the structural and functional integrity of thyroid tissue *in vitro* // Lab. Invest.—1988.—**59**, N 2.—P. 281–291.
- Massart C., Gibassier J., Genetet N., Raoul M. L., Baron M., Le Gall F., Lucas C. Effect of lymphocytes on hormonal secretion by autologous thyrocytes cultured in monolayers // J. Mol. Endocrinol.—1996.—**17**, N 3.—P. 185–195.
- Westermarck B., Heldin N. E., Westermarck K. Structural and functional properties of thyroid follicle cells in culture // Acta. Physiol. Scand. Suppl.—1990.—**592**.—P. 15–24.
- Gartner R. Thyroid growth *in vitro* // Exp. Clin. Endocrinol.—1992.—**100**, N 1–2.—P. 32–35.
- Kozlowski M., Gajewska M., Majewska A., Jank M., Motyl T. Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures // J. Physiol. Pharmacol.—2009.—**60**, Suppl 1.—P. 5–14.
- Rosines E., Schmidt H. J., Nigam S. K. The effect of hyaluronic acid size and concentration on branching morphogenesis and tubule differentiation in developing kidney culture systems: potential applications to engineering of renal tissues // Biomaterials.—2007.—**28**, N 32.—P. 4806–4817.
- Mauchamp J., Mirrione A., Alquier C., Andre F. Follicle-like structure and polarized monolayer: role of the extracellular matrix on thyroid cell organization in primary culture // Biol. Cell.—1998.—**90**, N 5.—P. 369–380.
- Pellerin S., Croizet K., Rabilloud R., Feige J. J., Rousset B. Regulation of the three-dimensional organization of thyroid epithelial cells into follicle structures by the matricellular protein, thrombospondin-1 // Endocrinology.—1999.—**140**, N 3.—P. 1094–1103.
- Chambard M., Verrier B., Gabrion J., Mauchamp J. Polarization of thyroid cells in culture: evidence for the basolateral localization of the iodide «pump» and of the thyroid-stimula-

- ting hormone receptor-adenyl cyclase complex // *J. Cell Biol.*—1983.—**96**, N 4.—P. 1172–1177.
26. Grande M., Franzen A., Karlsson J. O., Ericson L. E., Heldin N. E., Nilsson M. Transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes // *J. Cell Sci.*—2002.—**115**, pt 22.—P. 4227–4236.
  27. Nilsson M., Husmark J., Nilsson B., Tisell L. E., Ericson L. E. Primary culture of human thyrocytes in Transwell bicameral chamber: thyrotropin promotes polarization and epithelial barrier function // *Eur. J. Endocrinol.*—1996.—**135**, N 4.—P. 469–480.
  28. Chomyak O. G., Sidorenko M. V. Multicellular spheroids model in oncology // *Exp. Oncol.*—2001.—**23**, N 4.—P. 236–241.
  29. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*—1987.—**113**, N 2.—P. 101–122.
  30. Nederman T., Norling B., Glimelius B., Carlsson J., Brunk U. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids // *Cancer Res.*—1984.—**44**, N 7.—P. 3090–3097.
  31. Infanger M., Kossmehl P., Shakibaei M., Bauer J., Kossmehl-Zorn S., Cogoli A., Curcio F., Oksche A., Wehland M., Kreuz R., Paul M., Grimm D. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells // *Cell Tissue Res.*—2006.—**324**, N 2.—P. 267–277.
  32. Grimm D., Bauer J., Kromer E., Steinbach P., Riegger G., Hofstadter F. Human follicular and papillary thyroid carcinoma cells interact differently with human venous endothelial cells // *Thyroid.*—1995.—**5**, N 3.—P. 155–164.
  33. Vuillermoz B., Khoruzhenko A., D'Onofrio M. F., Ramont L., Veneteo L., Perreau C., Antonicelli F., Maquart F. X., Wegrowski Y. The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression // *Exp. Cell Res.*—2004.—**296**, N 2.—P. 294–306.
  34. Breus O. S., Nemazany I. O., Gout I. T., Filonenko V. V., Panasyuk G. G. CoA Synthase influences adherence-independent growth and survival of mammalian cells *in vitro* // *Biopolym. Cell.*—2009.—**25**, N 5.—P. 384–389.
  35. Westermark K., Nilsson M., Karlsson F. A. Effects of interleukin 1 alpha on porcine thyroid follicles in suspension culture // *Acta Endocrinol. (Copenh.)*—1990.—**122**, N 4.—P. 505–512.
  36. Khoruzhenko A. I., Cherednyk O. V., Filonenko V. V. Subcellular localization of S6K1 and S6K2 forms of ribosomal protein S6 kinase in primary monolayer culture of rat thyrocytes // *Biopolym. Cell.*—2008.—**24**, N 1.—P. 35–40.
  37. Khoruzhenko A. I., Cherednyk O. V., Filonenko V. V. Immunohistochemical analysis of subcellular localization of S6K1 and S6K2 forms of ribosomal protein S6 kinase in rat thyrocytes under conditions of two- and three-dimensional culture // *Biopolym. Cell.*—2008.—**24**, N 6.—P. 470–475.
  38. Pomahac B., Svensjo T., Yao F., Brown H., Eriksson E. Tissue engineering of skin // *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*—1998.—**9**, N 3.—P. 333–344.
  39. Nizheradze K. Concanavalin A, but not glycated albumin, increases subendothelial deposition of von Willebrand factor *in vitro* // *Endothelium.*—2006.—**13**, N 4.—P. 245–248.
  40. Ayala P., Lopez J. I., Desai T. A. Microtopographical cues in 3D attenuate fibrotic phenotype and extracellular matrix deposition: implications for tissue regeneration // *Tissue Eng. Part A.*—2010.—**16**, N 8.—P. 2519–2527.
  41. Kotlarz G., Wegrowski Y., Martiny L., Declerck P. J., Bellon G. Enhanced expression of plasminogen activator inhibitor-1 by dedifferentiated thyrocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—2002.—**295**, N 3.—P. 737–743.
  42. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension // *Nature.*—2003.—**424**, N 6951.—P. 870–872.
  43. Weaver V. M., Petersen O. W., Wang F., Larabell C. A., Briand P., Damsky C., Bissell M. J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies // *J. Cell Biol.*—1997.—**137**, N 1.—P. 231–245.
  44. Wang F., Weaver V. M., Petersen O. W., Larabell C. A., Dedhar S., Briand P., Lupu R., Bissell M. J. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—1998.—**95**, N 25.—P. 14821–14826.
  45. Overall C. M., Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era // *Nat. Rev. Cancer.*—2002.—**2**, N 9.—P. 657–672.
  46. Wolf K., Mazo I., Leung H., Engelke K., von Andrian U. H., Deryugina E. I., Strongin A. Y., Brocker E. B., Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis // *J. Cell Biol.*—2003.—**160**, N 2.—P. 267–277.
  47. Sahai E., Marshall C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis // *Nat. Cell Biol.*—2003.—**5**, N 8.—P. 711–719.
  48. Cukierman E., Pankov R., Stevens D. R., Yamada K. M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension // *Science.*—2001.—**294**, N 5547.—P. 1708–1712.
  49. Kim K. U., Wilson S. M., Abayasinghwardana K. S., Collins R., Fjellbirkeland L., Xu Z., Jablons D. M., Nishimura S. L., Broaddus V. C. A novel *in vitro* model of human mesothelioma for studying tumor biology and apoptotic resistance // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*—2005.—**33**, N 6.—P. 541–548.
  50. Wilson S. M., Barbone D., Yang T. M., Jablons D. M., Bueno R., Sugarbaker D. J., Nishimura S. L., Gordon G. J., Broaddus V. C. mTOR mediates survival signals in malignant mesothelioma grown as tumor fragment spheroids // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*—2008.—**39**, N 5.—P. 576–583.
  51. Yang T. M., Barbone D., Fennell D. A., Broaddus V. C. Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*—2009.—**41**, N 1.—P. 14–23.
  52. Tomei A. A., Boschetti F., Gervaso F., Swartz M. A. 3D collagen cultures under well-defined dynamic strain: a novel strain device with a porous elastomeric support // *Biotechnol. Bioeng.*—2009.—**103**, N 1.—P. 217–225.
  53. Fischbach C., Kong H. J., Hsiang S. X., Evangelista M. B., Yuen W., Mooney D. J. Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*—2009.—**106**, N 2.—P. 399–404.
  55. Hadjipanayi E., Mudera V., Brown R. A. Guiding cell migration in 3D: a collagen matrix with graded directional stiffness // *Cell Motil. Cytoskeleton.*—2009.—**66**, N 3.—P. 121–128.
  55. Roig A. I., Hight S. K., Shay J. W. Two- and three-dimensional models for risk assessment of radiation-enhanced colorectal tumorigenesis // *Radiat. Res.*—2009.—**171**, N 1.—P. 33–40.

UDC 577.25 + 576  
Received 05.10.10