

УДК 576.08

Опыт получения многокомпонентной трёхмерной клеточной модели опухолевого роста для молекулярно-генетических исследований рака молочной железы

Филиппова С. Ю.¹, Ситковская А. О.¹, Тимофеева С. В.¹,
Чембарова Т. В.¹, Межевова И. В.¹, Гненная Н. В.¹, Новикова И. А.¹,
Шульгина О. Г.¹

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии» Ростов-на-Дону, Россия; filsv@yandex.ru

DOI:10.18522/2308-9709-2022-42-9

Аннотация

Рак молочной железы остаётся актуальной проблемой современного здравоохранения во всём мире. Разработка новых эффективных противоопухолевых средств опирается на *in vitro* модели, максимально приближенные к опухоли *in situ* по своим молекулярно-генетическим свойствам. По общему представлению, в перспективной клеточной модели должны воспроизводиться ключевые элементы микроокружения опухоли, а также наблюдаемые в опухоли градиенты газов и питательных веществ. Данным требованиям отвечают многокомпонентные трёхмерные клеточные модели опухолевого роста, получившие широкое распространение в экспериментальной онкологии. Несмотря на значительное количество существующих примеров реализации таких моделей, проблема поиска экономически выгодных технологических решений, способных предоставить материал для как можно более широкого спектра исследований – от молекулярных до гистологических, остаётся актуальной. В данной работе

нами протестирован адаптированный метод висячей капли для получения многокомпонентной трёхмерной модели опухолевого роста рака молочной железы, представляющей собой сфероид из клеток рака молочной железы BT20, заключенный в коллагеновый сгусток с фибробластами. Новизна работы заключается в последовательном введении компонентов модели непосредственно в каплю в отличие от более распространённых подходов, предполагающих перенос клеточных агломератов и их заключение в биогели. Предлагаемое нами техническое решение основывается на применении покрытия из СИЭЛ 159-330, способствующего ускоренному формированию агломератов в висячей капле – свойства, необходимого для облегчения замены среды. Полученные в ходе работы конструкторы обладали гистологическим сходством с опухолью *in situ* однако нам не удалось добиться контактного взаимодействия между клетками опухоли и микроокружением.

Ключевые слова: рак молочной железы; BT20; трёхмерная клеточная культура; метод висячей капли; СИЭЛ 159-330; фибробласты.

Experience in obtaining a multicomponent three-dimensional cellular model of tumor growth for molecular genetic studies of breast cancer

Filippova S.Yu.¹, Timofeeva S.V.¹, Chembarova T.V.¹, Mezhevova I.V.¹, Gnennaya N.V.¹, Novikova I.A.¹, Shulgina O.G.¹

¹ *Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center of Oncology», Rostov-on-Don, Russia; filsv@yandex.ru*

DOI:10.18522/2308-9709-2022-42-9

Annotation

Breast cancer remains an urgent problem of modern healthcare throughout the world. The development of new effective anticancer drugs is based on in vitro models that are as close as possible to in situ tumors in terms of their molecular genetic properties. The general idea is that a promising cellular model should reproduce the key elements of the tumor microenvironment, as well as the gas and nutrient gradients observed in the tumor. These requirements are met by multicomponent three-dimensional cellular models of tumor growth, which are widely used in experimental oncology. Despite a significant number of existing examples of the implementation of such models, the problem of finding cost-effective technological solutions that can provide material for the widest possible range of studies, from molecular to histological, remains relevant. In our work, we tested an adapted hanging drop method to obtain a multicomponent three-dimensional model of breast cancer tumor growth, which is a spheroid of BT20 breast cancer cells enclosed in a collagen clot containing fibroblasts. The novelty of our work lies in the sequential introduction of model components directly into a drop, in contrast to more common approaches that involve the transfer of cell agglomerates and their inclusion in biogels. Our technical solution is based on the

use of SIEL 159-330 coating, which promotes the accelerated formation of agglomerates in a hanging drop, a property necessary to facilitate the medium replacement. The constructs obtained in the course of the work had a histological similarity with the tumor in situ. However, we failed to achieve contact interaction between tumor cells and the microenvironment.

Keywords: breast cancer; BT20; 3D cell culture; hanging drop method; SIEL 159-330; fibroblasts.

Рак молочной железы занимает лидирующее положение среди онкологических заболеваний женского населения во всём мире. Так, в 2020 году в России было зарегистрировано около 65000 случаев этого заболевания, что составило 21,7% от общего количества случаев злокачественных новообразований у женщин, при этом среднегодовой темп прироста заболеваемости составляет 1,96%. Злокачественные новообразования молочной железы также имеют наибольший удельный вес в структуре смертности женщин (15,9%) (Каприн и др., 2021). Основной причиной смертности от данного заболевания является продолженный рост опухоли и распространение опухолевого процесса, связанные с возникновением лекарственной устойчивости к применяемым противоопухолевым препаратам. В связи с этим, разработка и внедрение новых лекарственных средств против рака остаётся актуальной задачей. Доклинические исследования перспективных противоопухолевых препаратов проводятся на монослойных клеточных культурах, однако репрезентативность таких клеточных систем, по общему мнению, является низкой (Галимова, Галагудза, 2018). В первую очередь, это связано с тем, что опухоль является гетерогенным образованием и представляет собой многокомпонентную систему (Кит и др., 2014, 2017). В состав опухоли входят не только злокачественные клетки, гетерогенные по своему генотипу, но и множество компонентов микроокружения, находящихся в сложных взаимодействиях, которые определяют ответ опухоли на лекарственное лечение. Микроокружение опухоли включает клетки иммунной системы, фибробласты, клетки эндотелия сосудов и другие элементы. Известно, что опухоль-ассоциированные фибробласты контролируют процессы ангиогенеза, иммуногенные свойства опухоли и подвижность опухолевых клеток. Кроме того, фибробласты продуцируют коллаген, избыток которого в

строме опухоли повышает жесткость опухолевой ткани, что влияет на передачу внутриклеточных сигналов пролиферации и дифференцировки в клетках опухоли (Ермаков и др., 2022). Помимо градиента жёсткости, формирующегося в солидных опухолях в результате активности клеток стромы, большое значение для успеха противоопухолевой терапии имеют градиенты питательных веществ и кислорода. Так, недостаток кислорода (гипоксия), характерный для быстрорастущих участков опухолей, в которых не успевают формироваться микрокапилляры, приводит к повышенной экспрессии транскрипционного фактора HIF, который управляет процессами метаболического перепрограммирования, опухолевого ангиогенеза, пролиферации и метастазирования опухолевых клеток, а также отвечает за нестабильность генов при гипоксии (Cheng et al., 2022).

В простых монослойных клеточных культурах не воспроизводится система сигнальных взаимодействий между злокачественными клетками и компонентами микроокружения. Поэтому для создания адекватных моделей злокачественного роста, используемых, в том числе, при тестировании новых препаратов, требуется воспроизведение *in vitro* ключевых элементов данной системы, таких как состав и структура внеклеточного матрикса, клеточный состав микроокружения, градиенты газов, ионов водорода, питательных и сигнальных веществ и другие (Тимофеева и др., 2021).

Существует целый ряд подходов для создания *in vitro* моделей, имитирующих опухоль *in situ*. Все эти подходы в той или иной мере опираются на создание трёхмерных культур опухолевых клеток с использованием клеточных агрегатов (сфероиды, органоиды или тумороиды) или заключения клеток опухоли в трёхмерные конструкторы из биогеля, в том числе с применением технологии 3д биопечати (Тимофеева и др., 2021). В

первом случае точнее удаётся воспроизвести естественные градиенты опухоли, а во втором – воссоздать компоненты микроокружения (внеклеточный матрикс и клетки). В данной работе мы решили совместить преимущества этих подходов и создать многокомпонентную модель на основе клеточного сфероиды из опухолевых клеток с помещением его во внеклеточный матрикс и добавлением клеток микроокружения. Этот подход достаточно часто применяется для создания трёхмерных клеточных моделей злокачественного роста. Как правило, сфероиды заключают в биогель в процессе экструзионной биопечати (Butelmann et al., 2022), загрузки в специализированные микрофлюидные чипы (Kim et al., 2018; Teh et al., 2021), или путём погружения во внеклеточный матрикс в лунках многолуночных планшетов (Jeong et al., 2022). При этом сфероиды получают путём культивирования клеток на низко адгезионном пластике (Teh et al., 2021; Butelmann et al., 2022) или в методе висячей капли (Kim et al., 2018; Jeong et al., 2022). Предложенная нами методика основывается на методе висячей капли, однако, в отличие от приведённых работ, коллаген с элементами клеточного микроокружения опухоли вводится в саму каплю. Получаемые конструкции потенциально совместимы со всеми технологиями молекулярно-генетических исследований, в том числе, высокопроизводительных. Кроме того, предлагаемый подход позволяет не только измерять ключевые параметры клеточной культуры *in vitro* в ходе эксперимента, но и производить морфологические исследования на микро- и ультраструктурном уровнях, так как получаемые конструкции могут быть легко собраны и зафиксированы в отличие от сфероидов, заключённых в лунки планшета или других конструкций. Выбор метода определялся его доступностью, а также возможностью стандартизации характеристик и масштабированием получаемых моделей. Данные характеристики делают метод висячей капли

экономически обоснованным для создания *in vitro* тест-систем, пригодных для применения в скрининговых исследованиях и индивидуализированном определении лекарственной чувствительности опухоли. Ранее применение силиконового покрытия позволило нам существенно сократить сроки формирования сфероидов в висячей капле, уменьшить вариативность его размеров и формы, а также сделать агрегацию молекул внеклеточного матрикса более равномерной (Филиппова и др., 2022). Полученные преимущества позволили нам перейти к тестированию возможности создания многокомпонентных моделей опухолевого роста с пространственным разделением компонентов путём последовательного введения в висячую каплю различных элементов.

Цель. Создать модель опухолевого роста рака молочной железы, имитирующую естественные градиенты внеклеточных факторов и взаимодействие клеток опухоли с фибробластами и коллагеном внеклеточного матрикса.

Материалы и методы. Клетки культуры рака молочной железы BT20 выращивали в стандартной культуральной среде, состоящей из среды DMEM (Gibco) с добавлением 10% FBS (Hyclone). При достижении монослоем клеток 70%-й конфлюентности, их снимали с пластика при помощи раствора трипсина-Версена (1 : 1; Биолот, Россия) по стандартной методике. Далее производили подсчёт общего количества и жизнеспособности клеток на счетчике EVE (NanoEntek) с добавлением 0,4% раствора трипанового синего. Сфероиды из клеток культуры BT20 получали методом висячей капли, по способу, использованному нами ранее (Филиппова и др., 2022). А именно, капли клеточной суспензии в стандартной культуральной среде наносили на крышку 10 см чашки Петри, покрытую силиконовым

эластомером СИЭЛ 159-330. Объём наносимых капель составлял 20 мкл, в каждой капле находилось по 10^4 клеток культуры BT20. Всего было нанесено 40 капель клеточной суспензии, после чего крышку аккуратно переворачивали и помещали на нижнюю часть чашки Петри, заполненную фосфатным буфером, для создания влажной камеры и предотвращения слишком быстрого высыхания капель с клетками. Далее чашку Петри с нанесёнными каплями помещали в CO_2 -инкубатор и культивировали 24 часа при 37C° и содержании CO_2 5,0%. Через 24 часа культивирования среду в 20 каплях заменили на среду, содержащую DMEM, 10% FBS и коллаген I (Gibco) в концентрации 150 мкг/мл и фибробласты человека в количестве 2000 клеток на каплю. Культура фибробластов была получена нами ранее из ткани молочной железы, удаляемой во время мастэктомии по поводу РМЖ. В других 20 каплях, служивших контролем без воздействия, произвели замену среды на стандартную среду культивирования без добавления коллагена и фибробластов. Далее клетки помещали в CO_2 -инкубатор и культивировали при 37C° и содержании CO_2 5,0% в течение одной недели. Ещё через 72 часа культивирования производили замену половины культуральной среды во всех вариантах опыта. На протяжении всего эксперимента проводили фотографирование образующихся конгломератов через 48, 72, 96 часов и 1 неделю. Спустя 1 неделю культивирования образовавшиеся конгломераты собирали, фиксировали в 4% формалине и подвергали стандартной процедуре для заключения в парафиновые блоки. Исследование гистологической структуры полученных клеточных конгломератов проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, полученных по стандартной методике.

Результаты и обсуждение. Клетки культуры BT20 уже через 24 часа культивирования сформировали ровные сфероиды с плотной структурой и

низкой вариативностью в размерах и форме (рис 1, а). Высокая вариативность морфологии и структуры получаемых клеточных конгломератов могла бы существенно снизить точность воспроизведения естественных профилей градиентов концентрации газов и питательных веществ в образуемых сфероидах, что затруднило бы сравнение эффективности противоопухолевых препаратов в последующих экспериментах и увеличило затраты на их проведение. Используемое нами покрытие из силиконового эластомера СИЭЛ 159-330 ранее уже показало своё преимущество перед другими покрытиями и добавками, призванными ускорить формирование клеточных сфероидов и уменьшить размах вариации их размеров (Филиппова и др., 2022). В настоящей работе мы, таким образом, получили дополнительное подтверждение высокого качества данного покрытия и больших перспектив его использования в качестве заменителя покрытия из полидиметилсилоксана (PDMS), применяемого в зарубежных работах для улучшения практики получения клеточных сфероидов методом висячей капли (Kuo et al., 2017).

Ускоренное благодаря покрытию из СИЭЛ 159-330 формирование клеточных сфероидов с плотной структурой позволило произвести замену среды культивирования на среду, содержащую коллаген с фибробластами, без существенного повреждения сфероидов уже на следующий день после закладки эксперимента. Обычно формирование плотного сфероида, позволяющего произвести замену среды, в каплях на покрытии из полистирола происходит не ранее, чем через 72 часа (Kelm et al., 2003).

Формирование коллагеновых сгустков вокруг сфероидов из клеток культуры BT20 происходило постепенно – в течение недели наблюдалось сокращение площади сгустка, видимое увеличение его оптической плотности

и уменьшение расстояния между включенными в него фибробластами. При этом наиболее драматические изменения данных параметров происходили в первые 48 часов после внесения коллагена (рис 1, б-д). В этом временном промежутке также наблюдались характерные изменения морфологии фибробластов – они распластывались в толще коллагена и образовывали множество отростков, приобретая типичную для данных клеток форму (Завьялова, 2020) (рис 1, е). Несмотря на одинаковое количество вносимого материала, размер коллагенового сгустка варьировал между каплями в большей мере, чем в клеточных сфероидах без добавления коллагена. Также и форма коллагеновых сгустков в большом количестве случаев была неправильной. Наблюдаемое явление можно объяснить неравномерной полимеризацией коллагена, как по объёму капли, так и в разных точках чашки Петри, что может быть связано с разностью температуры в разных точках формирования коллагенового сгустка. В будущем для улучшения результатов применения тестируемого подхода к формированию многокомпонентной модели опухолевого роста потребуется внести в протокол дополнительное охлаждение культуры клеток в висячих каплях в первые часы после добавления раствора коллагена с тем, чтобы увеличить время полимеризации волокон и сделать процесс образования сгустка более равномерным.

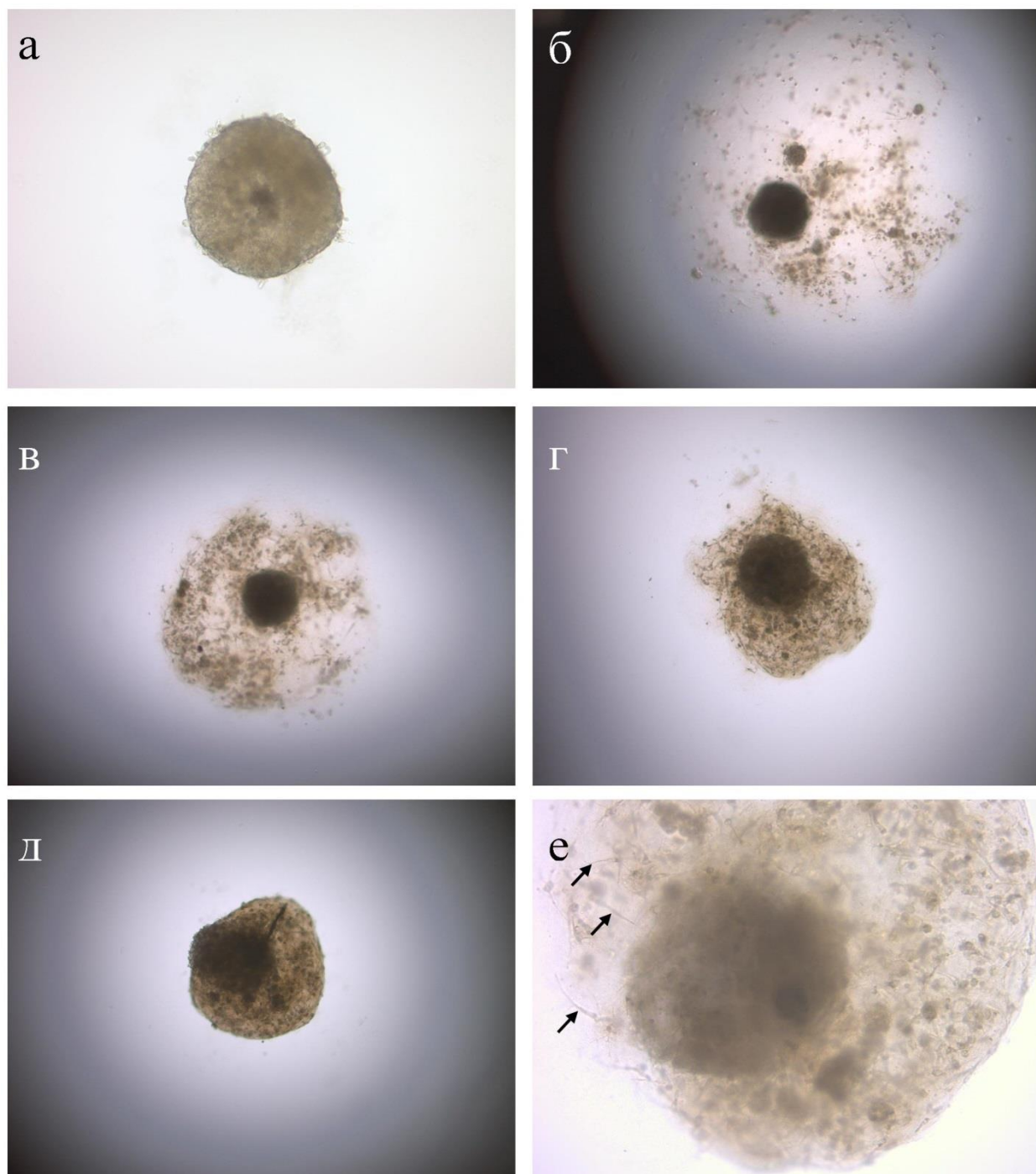


Рис. 1 – Процесс формирования клеточных конгломератов в ходе создания 3хмерной модели опухолевого роста РМЖ: а – вид клеточного сфероида из клеток культуры BT20 через 24 ч. Культивирования; б – формирование коллагенового сгустка с включением фибробластов вокруг клеточного сфероида культуры BT20 спустя 48 часов культивирования; в – тоже самое спустя 72 часа культивирования; г – тоже самое спустя 96

часов культивирования; д – тоже самое спустя 1 неделю культивирования; е – сфероид из клеток культуры BT20, включенный в коллагеновый сгусток с фибробластами спустя 72 часа культивирования при большем увеличении. Стрелками выделены отдельные фибробласты с хорошо выраженными характерными изменениями в морфологии. Увеличение на микрофотографиях: а, е – 100X, б-д – 40X.

По результатам наблюдения за формированием двухкомпонентных конгломератов можно заключить, что включение сформированного сфероида из клеток культуры BT20 в коллагеновый сгусток с фибробластами происходит асимметрично – во всех повторах сгусток формировался вблизи верхнего полюса сфероида. Асимметричное строение получаемых двухкомпонентных агломератов объясняется разницей в весе и плавучести компонентов, входящих в их состав, что и определяет их разное положение в висячей капле. Вероятно, варьируя значения данных параметров для каждого компонента, можно добиться более правильного строения получаемой *in vitro* модели. На гистологических срезах также можно заметить неправильное строение получаемых агломератов – шарообразные клеточные сфероиды погружены полностью или частично в сгустки коллагена дисковидной формы, при этом со смещением от центра диска (рис 2). Тем не менее, нами во всех случаях наблюдался обширный контакт сфероида и коллагенового сгустка, поэтому мы ожидали увидеть миграцию клеток культуры рака молочной железы в коллаген. Однако при гистологическом исследовании полученных конгломератов нами не было обнаружено явного перемещения клеток культуры BT20 за пределы сфероида – морфология границы сфероида мало отличалась в опыте с добавлением коллагена и контроле (рис 2). Также не отмечалось проникновения фибробластов в сфероид, сформированный из опухолевых клеток. Мы наблюдали, таким образом, формирование чётких

границ у обоих компонентов модели (рис 2, г), которые, вероятно, выступают физическими барьерами для перемещения клеток. Решение данной проблемы, возможно, лежит в сокращении времени каждого этапа формирования модели – внесении каждого следующего компонента до завершения формирования предыдущего, во время которого плотная граница уже сформирована, и «дозревание» всех компонентов идет одновременно, а не последовательно. Однако для реализации такого подхода потребуется конструирование и внедрение микрофлюидных решений, позволяющих контролировать введение жидкости в висячую каплю без повреждения уже формирующихся в ней конгломератов. Подобные решения можно найти в имеющейся литературе (Fu et al., 2020; Park et al., 2020). Так в работе Fu et al. (2020) в качестве поверхности для нанесения висячих капель применяют двуслойный чип из лабораторной пленки Parafilm®, в которой проделаны сквозные отверстия двух диаметров – меньшее отверстие обращено к капле, а большее вынесено на внешнюю сторону чипа. Замена среды в капле производится через верхнее отверстие, для чего не требуется переворачивание чипа и нарушение целостности формирующихся клеточных конгломератов. В работе Park et al. (2020) использован похожий подход, но вместо открытых отверстий на верхней поверхности чипа из PDMS авторы применили закрытые камеры, сообщаемые посредством микрофлюидных каналов, что позволило ускорить процедуру замены среды и сделать её результаты более унифицированными по сравнению с конструкционным решением, апробированным в работе Fu et al. (2020). Применение конструкций, подобных описанным в приведённых источниках, также позволило бы уменьшить асимметрию получаемых конструкторов.

Анализ гистологического строения коллагенового сгустка и клеточного сфероида показал, что полученная *in vitro* модель, несмотря на наличие

физического барьера между двумя компонентами, демонстрирует некоторое сходство с опухолью *in situ*. Во-первых, заметна характерная черта клеточных сфероидов, а именно наличие некротической зоны в центре, которая образуется в результате отмирания части клеток под действием гипоксии и недостатка питательных веществ (рис. 2а-в). Клетки в центре сфероида имеют светло окрашенную или частично распавшуюся цитоплазму, мелкие фрагментированные ядра, часть клеточного материала полностью разложилась, образовав на его месте полость – такие микроскопические признаки являются характерными для некроза ткани (Завьялова, 2020). Наблюдаемая особенность строения сфероидов рассматривается исследователями как наиболее точно отражающая строение опухолевых узлов *in situ*, в которых, как правило, наблюдаются градиенты кислорода и питательных веществ, направленные в центр узла (Галимова, Галагудза, 2018). Вместе с тем, выращивание клеток ВТ20 в условиях трёхмерной культуры не отразилось на их пролиферативной способности – в поверхностной части сфероидов наблюдаются митозы как в опыте с добавлением коллагена, так и без него (рис. 2 б,г). В свою очередь, гистологическое строение образовавшегося коллагенового сгустка напоминает строение рыхлой соединительной ткани из-за неплотного и беспорядочного расположения коллагеновых волокон, среди которых встречаются отдельные клетки фибробластов вытянутой формы с большим количеством цитоплазматических отростков (Завьялова, 2020). Таким образом, полученная с применением тестируемого протокола *in vitro* модель демонстрирует гистологическое сходство с опухолью *in situ* и, несмотря на отсутствие возможности миграции клеток между компонентами модели, отражает некоторые важные аспекты биологии опухоли.

Мы полагаем, что эти свидетельства о гистологическом сходстве полученных клеточных конструкторов с тканью опухоли рака молочной железы и прилегающей нормальной тканью позволяют сделать предположение также и о молекулярно-генетическом сходстве двух объектов. Следовательно, данная модель может быть использована при исследовании влияния различных факторов на молекулярно-генетические особенности рака молочной железы.

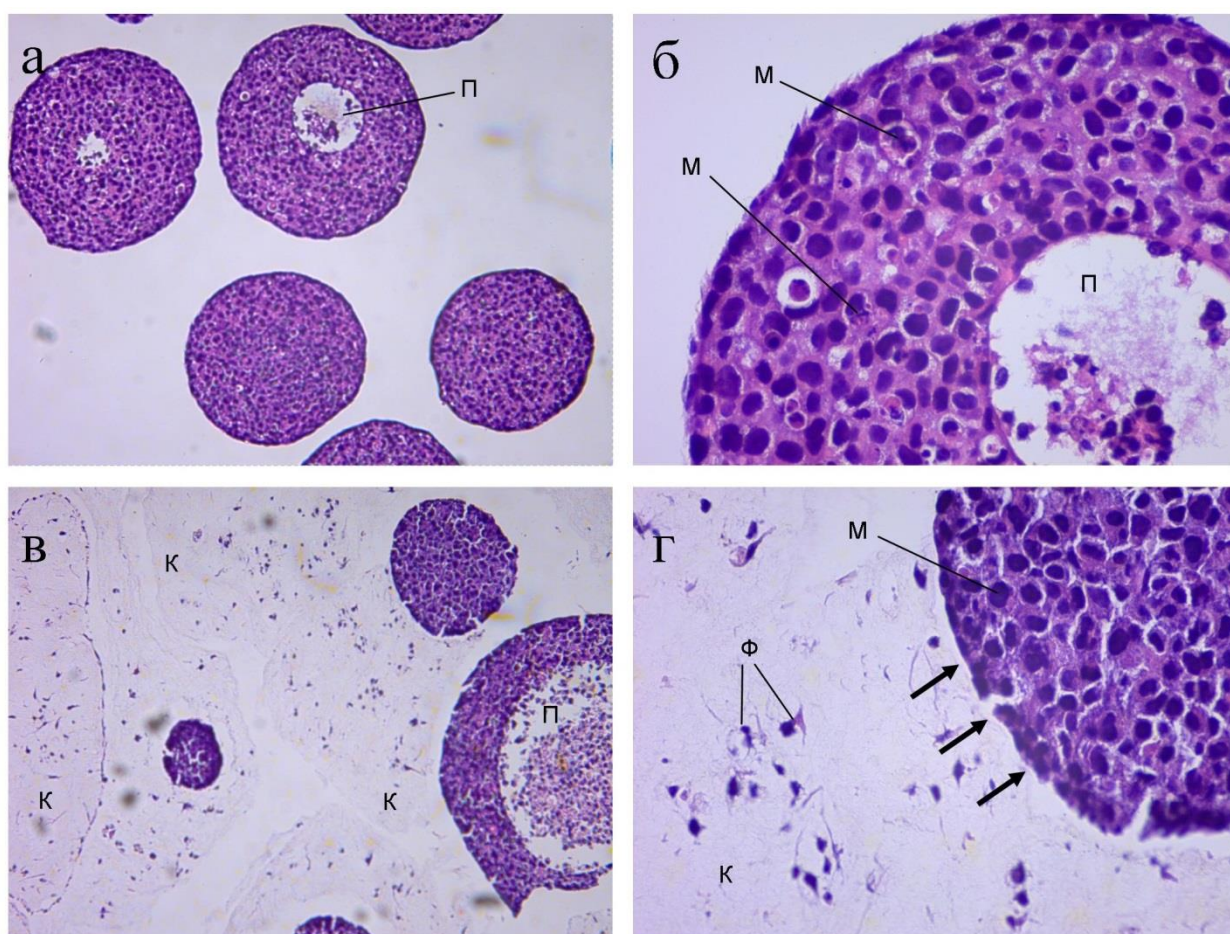


Рис. 2 – Гистологическая структура образуемых клеточных конгломератов спустя 1 неделю культивирования: а,б – контроль без добавления коллагена и фибробластов; в,г – клеточные конгломераты из сфероидов с добавлением коллагенового сгустка, включающего фибробласты. Обозначения: п – некротическая полость внутри сфероидов, м – митозы, ф – фибробласты, к – коллагеновый сгусток. Стрелками

отмечена граница между коллагеновым сгустком и сфероидом из клеток культуры BT20. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение на микрофотографиях: а, в – 100X4 б,г – 400X.

Заключение. Исследование показало, что метод висячей капли является перспективным для применения в процессе создания многокомпонентных моделей клеточного роста рак молочной железы *in vitro*. Несмотря на имеющиеся в настоящий момент недостатки, апробированный нами протокол может быть использован для создания трёхмерных клеточных моделей, воспроизводящих химические градиенты в опухоли. На данный момент, обнаруживаемые в получаемых конструктах физические барьеры для перемещения клеток ограничивают применение таких моделей исследованиями дистанционного взаимодействия между клетками опухоли и микроокружения. Потребуется дальнейшее усовершенствование протокола для введения в модель также контактного взаимодействия между различными клеточными элементами и ещё большего приближения свойств получаемой модели к свойствам опухоли *in situ*.

Список литературы

1. Галимова Э. С., Галагудза М. М. Двухмерные и трехмерные модели культур клеток опухолей *in vitro*: преимущества и недостатки // Бюллетень сибирской медицины, 2018. Т. 17. № 3. С. 188–196. DOI 10.20538/1682-0363-2018-3-188-196. EDN VJUNNB.
2. Ермаков М. С., Нуштаева А. А., Рихтер В. А., Коваль О. А. Опухоль-ассоциированные фибробласты и их роль в опухолевой прогрессии // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2022. Т. 26. № 1. С. 14–21. DOI 10.18699/VJGB-22-03. – EDN NTUPME.

3. Завьялова М. В. Морфологическая диагностика патологических процессов. Общая патология. Томск: Издательство СибГМУ, 2020. 79 с.
4. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с.
5. Кит О. И., Шатова Ю. С., Новикова И. А., Владимирова Л. Ю., Ульянова Е. П., Комова Е. А., Кечеджиева Э. Э. Экспрессия P53 и BCL2 при различных подтипах рака молочной железы // Фундаментальные исследования, 2014. № (10–1). С. 85–88.
6. Кит О. И., Шатова Ю. С., Франциянц Е. М., Новикова И. А., Златник Е. Ю., Ващенко Л. Н., Владимирова Л. Ю., Никипелова Е. А., Николаева Н. В. Путь к персонифицированной тактике лечения больных раком молочной железы // Вопросы онкологии, 2017. Т. 63. №5. С. 718–721. – DOI: 10.37469/0507-3758-2017-63-5-719-723.
7. Тимофеева С. В., Шамова Т. В., Ситковская А. О. 3D-биопринтинг микроокружения опухоли: последние достижения // Журнал общей биологии, 2021. Т. 82. № 5. С. 389–400. DOI: 10.31857/S0044459621050067.
8. Филиппова С. Ю., Ситковская А. О., Тимофеева С. В., Шамова Т. В., Межевова И. В., Гненная Н. В., Новикова И. А. Применение силиконового покрытия для оптимизации процесса получения клеточных сфероидов методом висячей капли // Южно-Российский онкологический журнал, 2022. Т. 3. №3. С. 15–23. DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-3-2.

9. Butelmann T., Gu Y., Li A., Tribukait-Riemenschneider F., Hoffmann J., Molazem A., Jaeger E., Pellegrini D., Forget A., Shastri V. P. 3D Printed Solutions for Spheroid Engineering and Cancer Research // International journal of molecular sciences, 2022. 23(15). P. 8188. DOI: 10.3390/ijms23158188.
10. Cheng W., Xiao X., Liao Y., Cao Q., Wang C., Li X., Jia Y. Conductive target range of breast cancer: Hypoxic tumor microenvironment // Frontiers in oncology, 2022. 12: 978276. DOI: 10.3389/fonc.2022.978276.
11. Fu J. J., Lu X. H., Wang L. X., He X., Li Y., Yu L., Li C. M. Cutting and Bonding Parafilm® to Fast Prototyping Flexible Hanging Drop Chips for 3D Spheroid Cultures // Cellular and molecular bioengineering, 2020. 14(2). P. 187–199. DOI: 10.1007/s12195-020-00660-x.
12. Jeong Y, Tin A, Irudayaraj J. Flipped Well-Plate Hanging-Drop Technique for Growing Three-Dimensional Tumors // Front Bioeng Biotechnol., 2022. 4(10): 898699. DOI: 10.3389/fbioe.2022.898699.
13. Kelm J. M., Timmins N. E., Brown C. J., Fussenegger M., Nielsen L. K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types // Biotechnology and bioengineering, 2003. 83(2). P. 173–180. DOI: 10.1002/bit.10655.
14. Kim H., Cho C. H., Park J. K. High-throughput culture and embedment of spheroid array using droplet contact-based spheroid transfer // Biomicrofluidics, 2018. 12(4): 044109. DOI: 10.1063/1.5039965.
15. Kuo C. T., Wang J. Y., Lin Y. F., Wo A. M., Chen B. P. C., Lee H. Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array // Sci Rep., 2017. 7(1): 4363. DOI: 10.1038/s41598-017-04718-1.

16. Park J., Kim H., Park J. K. Microfluidic channel-integrated hanging drop array chip operated by pushbuttons for spheroid culture and analysis // *The Analyst.*, 2020. 145(21). P. 6974–6980. DOI: 10.1039/d0an01091j.
17. Teh J. L., Abdul Rahman S. F., Domnic G., Satiyasilan L., Chear N., Singh D., Mohana-Kumaran N. Rapid spheroid assays in a 3-dimensional cell culture chip // *BMC research notes*, 2021. 14(1): 310. DOI: 10.1186/s13104-021-05727-0.

References

1. Galimova E. S., Galagudza M. M. Two-dimensional and three-dimensional cell culture models in vitro: pros and cons. // *Bulletin of Siberian Medicine.* – 2018. – 17(3):188-196. – DOI 10.20538/1682-0363-2018-3-188-196. – EDN VJUHHB.
2. Ermakov M. S., Nushtaeva A. A., Richter V.A., Koval O.A. Cancer-associated fibroblasts and their role in tumor progression // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* – 2022. – 26(1): 14-21. – DOI 10.18699/VJGB-22-03. – EDN NTUPME.
3. Zav'yalova M. V. Morphological diagnosis of pathological processes. General pathology. Tomsk: SibSMU Publishing House, 2020. – 79 P.
4. Kaprin A. D., Starinskoi V. V., Shahzadova A. O. Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Moscow: MNIOI im. P.A. Herzen - branch of the Federal State Budgetary Institution "NMRC of Radiology" of the Ministry of Health of Russia, 2021. – 252 P.
5. Kit O. I., Shatova JU. S., Novikova I. A., Vladimirova L. JU., Ul'janova E. P., Komova E. A., Kechedzhieva JE. JE. P53 and BCL2

- Expression in Different Breast Cancer Subtypes // *Fundamental Research*. – 2014. – (10-1): 85-88.
6. Kit O. I., Shatova JU. S., Frantsiyants E. M., Novikova I. A., Zlatnik E. JU., Vashchenko L. N., Vladimirova L. JU., Nikipelova E. A., Nikolaeva N. V. The Path to Personalized Treatment of Breast Cancer Patients // *Voprosy Onkologii*. – 2017. – 63(5): 718-721. – DOI: 10.37469/0507-3758-2017-63-5-719-723.
 7. Timofeeva S. V., Shamova T. V., Sitkovskaya A. O. 3D bioprinting of Tumor Microenvironment: Recent Achievements // *Zhurnal Obshechi Biologii*. – 2021. – 82(5): 389-400. – DOI 10.31857/S0044459621050067.
 8. Filippova S. Yu., Sitkovskaya A. O., Timofeeva S. V., Shamova T. V., Mezhevova I. V., Gnennaya N. V., Novikova I. A. Application of Silicone Coating to Optimize the Process of Obtaining Cellular Spheroids by the Hanging Drop Method // *South Russian Journal of Cancer*. – 2022. – 3(3): 15-23. – DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-3-2.
 9. Butelmann T., Gu Y., Li A., Tribukait-Riemenschneider F., Hoffmann J., Molazem A., Jaeger E., Pellegrini D., Forget A., Shastri V. P. 3D Printed Solutions for Spheroid Engineering and Cancer Research // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – 23(15): 8188. – DOI: 10.3390/ijms23158188.
 10. Cheng W., Xiao X., Liao Y., Cao Q., Wang C., Li X., Jia Y. Conducive target range of breast cancer: Hypoxic tumor microenvironment // *Frontiers in oncology*. – 2022. – 12: 978276. – DOI: 10.3389/fonc.2022.978276.

11. Fu J. J., Lv X. H., Wang L. X., He X., Li Y., Yu L., Li C. M. Cutting and Bonding Parafilm® to Fast Prototyping Flexible Hanging Drop Chips for 3D Spheroid Cultures // Cellular and molecular bioengineering. – 2020. – 14(2): 187–199. – DOI: 10.1007/s12195-020-00660-x.
12. Jeong Y, Tin A, Irudayaraj J. Flipped Well-Plate Hanging-Drop Technique for Growing Three-Dimensional Tumors // Front Bioeng Biotechnol. – 2022. – 4(10): 898699. – DOI: 10.3389/fbioe.2022.898699.
13. Kelm J. M., Timmins N. E., Brown C. J., Fussenegger M., Nielsen L. K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types // Biotechnology and bioengineering. – 2003. – 83(2): 173–180. – DOI: 10.1002/bit.10655.
14. Kim H., Cho C. H., Park J. K. High-throughput culture and embedment of spheroid array using droplet contact-based spheroid transfer // Biomicrofluidics. – 2018. – 12(4): 044109. – DOI: 10.1063/1.5039965.
15. Kuo C. T., Wang J. Y., Lin Y. F., Wo A. M., Chen B. P. C., Lee H. Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array // Sci Rep. 2017. – 7(1): 4363. – DOI: 10.1038/s41598-017-04718-1.
16. Park J., Kim H., Park J. K. Microfluidic channel-integrated hanging drop array chip operated by pushbuttons for spheroid culture and analysis // The Analyst. – 2020. – 145(21): 6974–6980. – DOI: 10.1039/d0an01091j.
17. Teh J. L., Abdul Rahman S. F., Domnic G., Satiyasilan L., Chear N., Singh D., Mohana-Kumaran N. Rapid spheroid assays in a 3-

dimensional cell culture chip // BMC research notes. – 2021. – 14(1):
310. – DOI: 10.1186/s13104-021-05727-0.