

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc425244>

# Оптимизация подходов к формированию гетерогенных трёхмерных моделей рака молочной железы

М.М. Абдурахманова<sup>1,2</sup>, М.С. Ермаков<sup>1</sup>, В.А. Рихтер<sup>1</sup>, О.А. Коваль<sup>1,2</sup>, А.А. Нуштаева<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Российская Федерация;<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Сфероиды представляют собой самоорганизованные кластеры-колонии клеток с тканеподобной архитектурой. Процесс формирования сфероидов и последующие манипуляции с ними, позволяющие сохранять трёхмерную структуру таких клеточных моделей, методологически сложны для воспроизводства. Это связано с составом и объёмом питательной среды, продолжительностью культивирования и, что наиболее важно, клеточными взаимодействиями с субстратом для культивирования. В настоящее время для оптимизации условий культивирования клеток в 3D-модели применяют различные матрицы и каркасы: от простых гидрогелей до сложных природных и синтетических композитов.

**Цель исследования** — сравнительный анализ формирования гомогенных (3D) и гетерогенных (3D-2) сфероидов из опухолевых и (или) стромальных клеток рака молочной железы с применением простых гидрогелей, таких как агароза, желатин и Matrigel™, а также при использовании культурального пластика с низкими адгезивными свойствами.

**Материалы и методы.** В качестве моделей были выбраны линии опухолевых клеток рака молочной железы MCF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3 и линии стромальных фибробластов BrC4f, BrC120f и BN120f. Сфероиды получали на подложке из простых гидрогелей или при культивировании на низкоадгезивном пластике. Процессы формирования и роста сфероидов, а также «раздавленные препараты» визуализировали с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа Nikon серии Eclipse Ti-S (Nikon, Япония).

**Результаты.** Показано, что гидрогель на основе желатина не подходит в качестве субстрата для получения 3D- и 3D-2-структур рака молочной железы ни для одной из исследуемых в работе культур клеток. Один тип подложки не позволяет получить весь спектр опухолевых, стромальных и гетерогенных 3D-структур: для сфероидов из фибробластов больше подходит подложка из агарозы, а для опухолевых клеток — Matrigel™; применение низкоадгезивных планшетов Nunclon™ Sphera™ предпочтительно для культивирования 3D-2-сфероидов. Оптимизация методологии работ со сфероидами показала, что применение охлаждённого пластика и растворов является технологическим преимуществом при работе со сфероидами, растущими в отсутствие гидрогелей.

**Заключение.** Предложенные подходы для формирования и гомогенных (3D), и гетерогенных (3D-2) сфероидов из опухолевых и (или) стромальных клеток рака молочной железы представляют собой обобщённое руководство по наиболее эффективному способу получения сфероидов различного клеточного состава.

**Ключевые слова:** гидрогель; доклинические модели; рак молочной железы; опухолевые клетки; стромальные клетки; первичные культуры клеток; 3D-культуры; сфероиды.

## Для цитирования:

Абдурахманова М.М., Ермаков М.С., Рихтер В.А., Коваль О.А., Нуштаева А.А. Оптимизация подходов к формированию гетерогенных трёхмерных моделей рака молочной железы // Гены и клетки. 2022. Т. 17, № 4. С. 91–103. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc425244>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc425244>

# The optimization of methods for the establishment of heterogeneous three-dimensional cellular models of breast cancer

Mariya M. Abdurakhmanova<sup>1,2</sup>, Mikhail S. Ermakov<sup>1</sup>, Vladimir A. Richter<sup>1</sup>, Olga A. Koval<sup>1,2</sup>, Anna A. Nushtaeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation;

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Spheroids are self-assembled clusters of cells mimicking a tissue-like architecture. Since the structure of complex three-dimensional cellular models is not stable, the formation of core spheroids and further maintenance are crucial stages within the cultivation process. There are a lot of options described for the establishment of 3D cell models. A wide range of reagents is presented from simple hydrogels to complex natural and synthetic composites. However, cultivation of 3D models is still a technically challenging task requiring adaptations of protocols for particular purposes.

**AIM:** To compare methods of the formation of homogeneous (3D) and heterogeneous (3D-2) spheroids from tumor and/or stromal cells of breast cancer using hydrogels such as agarose, gelatin and Matrigel™, as well as using ultra-low-adherent plates.

**MATERIALS AND METHODS:** Breast cancer cell lines MCF7, MDA-MB-231 SK-BR-3 and stromal fibroblasts BrC4f, BrC120f, BN120f were used as a models for 3D and 3D-2 cultures. Spheroids were obtained on a substrate of simple hydrogels or when cultured on a low-adhesive plastic. The processes of formation and growth of spheroids, as well as "crushed preparations" were visualized using a Nikon Eclipse Ti-S series fluorescent inverted microscope (Nikon, Japan).

**RESULTS:** We demonstrated, that gelatin-based hydrogel is not suitable as a substrate for obtaining 3D and 3D-2 spheroids for any of the cell lines used in the work. The use of only one type of hydrogels does not allow to obtain the entire repertoire of tumor, stromal, and heterogeneous 3D models. Agarose exhibited high output for stromal spheroids and Matrigel™ for tumor cells, and the use of ultra-low-adherent Nunclon™ Sphera™ plates was preferable for 3D-2 models combining both cell types. We also revealed that the application of cooled cultivation plastic and solutions is a technological advantage for handling spheroids growing in low-adherent plates.

**CONCLUSION:** The proposed approaches for the formation of both homogeneous (3D) and heterogeneous (3D-2) spheroids from tumor and (or) stromal breast cancer cells are a generalized guide to the most effective production of spheroids of various cellular composition.

**Keywords:** hydrogel; preclinical models; breast cancer; tumor cells; stromal cells; primary cell cultures; 3D cultures; spheroids.

## To cite this article:

Abdurakhmanova MM, Ermakov MS, Richter VA, Koval OA, Nushtaeva AA. The optimization of methods for the establishment of heterogeneous three-dimensional cellular models of breast cancer. *Genes & cells*. 2022;17(4):91–103. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc425244>

Received: 26.07.2022

Accepted: 24.10.2022

Published: 31.05.2023

## ВВЕДЕНИЕ

Культивирование клеток в лабораторных условиях позволяет решать широкий спектр медико-биологических задач: от тестирования потенциальных терапевтических агентов до сложных разработок тканевой инженерии [1, 2]. Усовершенствование питательных сред и добавок, культурального пластика и экзогенных каркасов, а также разработка новых способов визуализации живых клеток позволяют приближать 3D-клеточные модели к полноценной тканевой модели. Современные гетерогенные 3D-структуры могут одновременно включать в себя клетки различного гистологического происхождения для имитации тканевой архитектоники, а условия культивирования таких моделей усложняются по сравнению с традиционными 2D-моделями. Можно выделить два основных подхода к культивированию клеток в 3D-моделях: с использованием субстратов, например гидрогелей; или с применением планшетов с неадгезивным покрытием без дополнительных субстратов [3].

Для гидрогелей характерна мягкая и эластичная консистенция, низкое поверхностное натяжение и высокое содержание воды, что делает их подходящей основой для формирования многоклеточных 3D-структур [3]. Источником для получения гидрогелей могут быть как природные, так и синтетические материалы либо их смесь, что обеспечивает широкий спектр химических и механических свойств таких субстратов. Природными материалами, используемыми для гидрогелей, являются коллаген, желатин, альгинат, фибрин, гиалуроновая кислота, агароза, хитозан и др. Среди коммерчески доступных готовых гидрогелей широко используют Matrigel™, в состав которого входят белки внеклеточного матрикса [4–6]. Для формирования 3D-клеточных структур чаще всего суспензию клеток высевают на поверхность гидрогеля после его полимеризации или смешивают с жидким гидрогелем для дальнейшего совместного затвердевания [7].

Ещё один подход к 3D-культивированию клеток — использование культурального пластика с низкими адгезивными свойствами [8]. Дно лунок культуральных планшетов покрывают биополимерами, такими как 2-гидроксиэтилметакрилат, полиэтиленгликоль или хитозан, для предотвращения адгезии клеток к поверхности пластика, что приводит к вынужденной агрегации клеток в сфероиды [8]. Этот метод является одним из старейших подходов к формированию трёхмерных клеточных структур.

Несмотря на разнообразие подходов к 3D-культивированию клеток, все они не лишены определённых недостатков. Во-первых, не существует универсальных стандартизированных методов культивирования любых клеток в виде 3D-моделей и успешное воспроизводство таких моделей всё ещё требует высокого мастерства. Во-вторых, необходима разработка алгоритмов с определением ключевых факторов культивирования,

позволяющих формировать гетерогенные 3D-модели из разного типа клеток.

**Цель исследования** — сравнение простых гидрогелей (агарозы, желатина и Matrigel™) в качестве субстратов для формирования опухолевых, стромальных и гетерогенных сфероидов из клеточных линий рака молочной железы, оценка эффективности формирования сфероидов при использовании культурального пластика с низкими адгезивными свойствами от разных производителей и оптимизация условий приготовления препаратов из сформированных 3D- и 3D-2-структур рака молочной железы для микроскопического анализа.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### Клеточные культуры

Для создания клеточных 3D-моделей рака молочной железы (РМЖ) использовали опухолевые клетки линии MCF7 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург); клетки линии MDA-MB-231 (Российская коллекция клеточных культур, «ЦБТ ХимПар», Москва); клетки линии SK-BR-3, любезно предоставленные д.б.н., профессором С.М. Деевым (ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва); линии стромальных фибробластов BrC4f, BrC120f, ранее полученные из опухолевых образцов ткани РМЖ пациентов, и BN120f, выделенные из нетрансформированной (здоровой) ткани молочной железы; клеточные линии MCF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3, продуцирующие красный флуоресцентный белок (mKate2); культуру клеток BrC120f, продуцирующих зелёный флуоресцентный белок — eGFP (коллекция лаборатории биотехнологии, Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск) [9, 10]. Клетки культивировали в разных питательных средах: MCF7 и фибробласты BrC4f, BrC120f, BN120f — в среде IMDM (Gibco, Великобритания); MDA-MB-231 — в среде L-15 (Gibco, Великобритания); SK-BR-3 — в среде DMEM/F12 (Gibco, Великобритания). Питательные среды для культивирования клеток содержали 10% эмбриональной фетальной сыворотки коров — FBS (Gibco, США), 2 мМ L-глутамин (Gibco, США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (Gibco, США). Все клеточные культуры культивировали в T25 флаконах (TPP, Швейцария) в стандартных условиях (37,0±1,0 °C; 5,0±0,5% CO<sub>2</sub>), в CO<sub>2</sub>-инкубаторе ( Heraeus HeraCell, Германия).

При достижении конфлюэнтного монослоя клетки снимали с подложки с помощью фермента TrypLE™ (Gibco, США) и пересевали в соотношении 1:3–1:4 (v:v). Количество живых клеток считали на приборе LUNA-II™ (Logos Biosystems, Южная Корея) после окраски трипановым синим (Logos Biosystems, Южная Корея). Формирование и культивирование сфероидов проводили в двух

режимах в стандартных условиях: 1) режим монокультивирования, при котором сфероид формировался только из опухолевых или только из стромальных культур клеток (3D-модель РМЖ); 2) режим сокультивирования опухолевых и стромальных клеток (3D-2-модель РМЖ). Формирование сфероидов анализировали каждые 24 ч на протяжении 10 сут. Клетки ресуспендировали в питательной среде в зависимости от режима и техники культивирования. В режиме монокультивирования опухолевые или стромальные клетки высевали в количестве  $1 \times 10^3$  клеток на лунку. В режиме сокультивирования опухолевые клетки и фибробласты высевали в соотношении 1:1 или 1:4 ( $5 \times 10^2$  опухолевых клеток и  $5 \times 10^2$  или  $2 \times 10^4$  стромальных клеток на лунку).

Сфероиды получали в двух вариантах культивирования в обоих режимах: на подложке из простых гидрогелей или при культивировании на низкоадгезивном пластике. В случае использования субстрата из природного гидрогеля дно лунки 96-луночного планшета (TPP, Швейцария) предварительно покрывали водным раствором 2% желатина из кожи северных рыб (Sigma, Канада), 2% агарозой (Amresco, США), растворённой в фосфатно-солевом буфере (PBS), или Matrigel™ (Corning, США) для формирования подложки. С целью полимеризации гидрогеля планшет помещали в термостат на 30 мин при температуре  $37,0 \pm 1,0$  °C. На сформированную подложку из гидрогеля переносили суспензию клеток в питательной среде RPMI-1640 (Gibco, Великобритания), содержащей 2% FBS, для последующего культивирования при стандартных условиях.

Поскольку известно, что планшеты и чашки разных производителей из культурального пластика с низкими адгезивными свойствами могут отличаться по эффективности культивирования 3D-структур, был проведён сравнительный анализ эффективности культивирования 3D-моделей РМЖ с использованием пластика двух производителей: Eppendorf (Eppendorf, Германия) и Nunclon™ Sphera™ (Thermo Fisher Scientific, Япония) [11]. В процессе получения опухолевых сфероидов при использовании низкоадгезивного пластика возможно культивирование в бессывороточной питательной среде, дополненной различными добавками для поддержания жизнеспособности и пролиферации клеток [8, 12, 13]. Типичный протокол [8, 14–16] включает суспендирование клеток в бессывороточной среде DMEM/F12 [17], содержащей добавки эпидермального фактора роста (EGF) [18], основного фактора роста фибробластов (bFGF) [19, 20], инсулина [21], B-27™ Plus Supplement (Gibco, США) [15] и бычьего сывороточного альбумина (BSA) [22].

При использовании низкоадгезивного пластика клетки культивировали в лунках 96-луночного планшета Eppendorf или Nunclon™ Sphera™ при стандартных условиях в бессывороточной среде DMEM/F12, содержащей 20 нг/мл EGF (Sigma-Aldrich, Германия), 20 нг/мл bFGF (Gibco, США), 5 мкг/мл инсулина (Sigma-Aldrich,

Германия), 2% B-27™ Plus Supplement и 0,4% BSA (Amresco, США).

## Приготовление препаратов для микроскопического анализа

Препараты для микроскопического анализа готовили в двух вариантах: используя в работе наконечники, растворы и культуральный планшет со сфероидом без охлаждения дна или охлаждёнными. Для охлаждения дна планшета применяли хладоэлемент, поддерживающий температуру  $-20$  °C.

Полученные сфероиды отмывали от культуральной среды раствором PBS при комнатной температуре или предварительно охлаждённым до 4 °C, переносили на предметные стёкла с адгезивным покрытием (поли-L-лизин; Thermo Fisher Scientific, США) с помощью наконечника, хранившегося при комнатной температуре или предварительно охлаждённого в морозильной камере при  $-20$  °C, накрывали покровным стеклом и осторожно надавливали на них [23]. Процессы формирования и роста сфероидов, а также «раздавленные препараты» визуализировали с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа Nikon серии Eclipse Ti-S (Nikon, Япония).

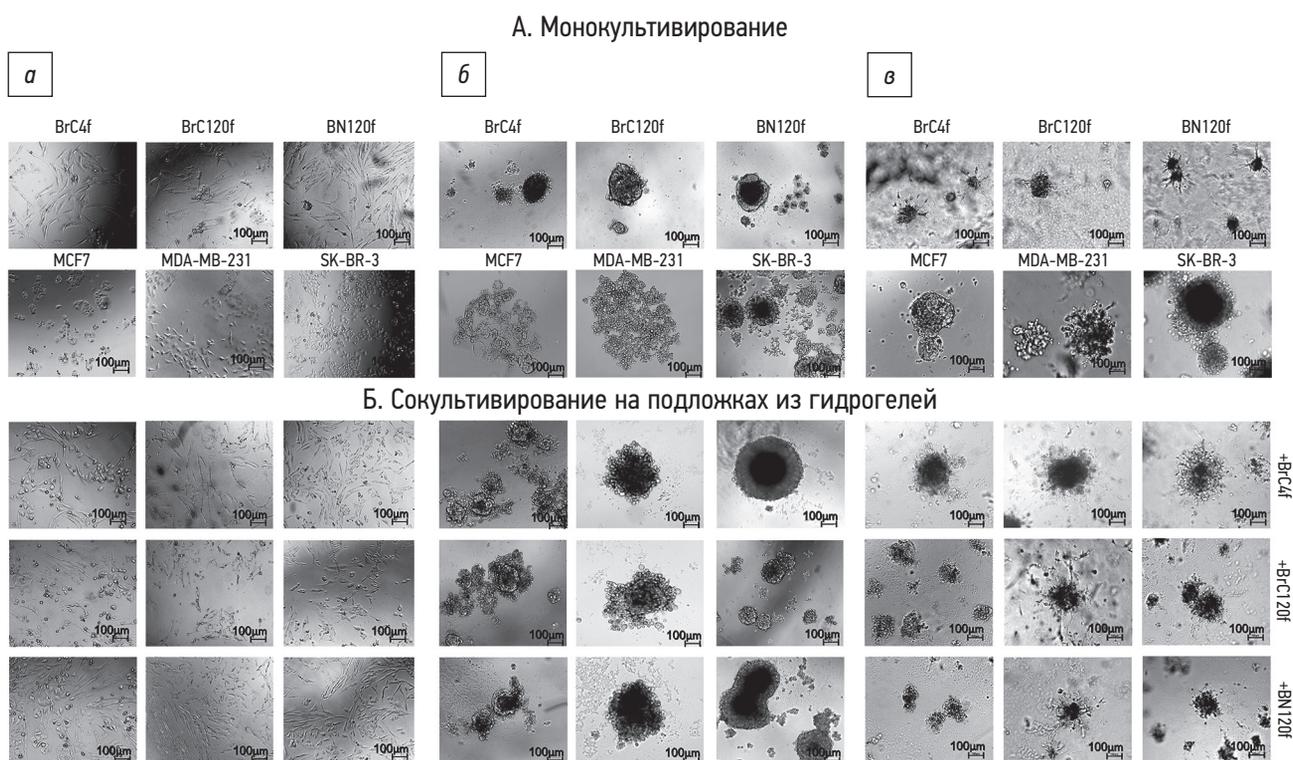
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Сравнительный анализ эффективности использования простых гидрогелей и пластика с низкими адгезивными свойствами для формирования 3D- и 3D-2-моделей рака молочной железы

При сравнении эффективности применения простых гидрогелей для формирования гомогенных 3D- и гетерогенных 3D-2-моделей РМЖ (рис. 1) обнаружено, что на субстрате из 2% желатина не удалось получить 3D- и 3D-2-структуры РМЖ ни для одной из используемых в работе культур клеток (рис. 1, а).

Гидрогель на основе 2% агарозы способствовал формированию 3D-структур из стромальных клеток, в случае опухолевых клеток лучшее формирование сфероидов отмечено для клеток SK-BR-3 и с меньшей эффективностью — для клеток MCF7 (рис. 1, б). Клетки MDA-MB-231 находились в состоянии суспензии — без прикрепления к субстрату и расплывания и без формирования 3D-структур. Использование смеси опухолевых и стромальных клеток на подложке из агарозы позволило получить 3D-2-структуры различной плотности: с хорошо структурированным ядром и более рыхлым внешним окружением. Таким образом, формирование 3D-структур на подложке из агарозы характерно для фибробластов или смеси фибробластов и опухолевых клеток.

Высевание суспензии клеток на подложку из Matrigel™ показало, что как фибробласты, так и опухолевые клетки



**Рис. 1.** 3D- и 3D-2-модели рака молочной железы, сформированные при культивировании клеток в двух режимах: *a* — 2% желатин; *б* — 2% агароза; *в* — Matrigel™; 10 сут культивирования.

формируют 3D-структуры (рис. 1, *в*). Основное отличие между получаемыми 3D-структурами заключалось в том, что фибробласты формировали не свободно плавающие структуры, а прикреплённые к субстрату. Гетерогенные 3D-2-сфероиды в большинстве случаев также имели признаки прикрепления к субстрату.

При использовании культурального пластика Eppendorf с низкими адгезивными свойствами не удалось получить сфероиды из стромальных клеток и опухолевых клеток MDA-MB-231 неэпителиального происхождения (рис. 2). Несмотря на заявляемую производителем низкую адгезию, фибробластоподобные клетки адгезировали к поверхности пластика и росли, что указывает на непригодность данного типа культурального пластика для получения 3D-структур из фибробластов. Сокультивирование опухолевых клеток линии SK-BR-3 позволило получить стабильные 3D-структуры со всеми стромальными клетками (см. рис. 2). Для опухолевых клеток линий MCF7 и MDA-MB-231 сокультивирование с клетками BrC4f также способствовало формированию гетерогенных сфероидов.

При использовании культурального пластика Nunclon™ Sphera™ в случае фибробластов наблюдали как плавающие 3D-структуры, так и рост клеток в адгезивном состоянии. В случае опухолевых клеток и смеси опухолевых и стромальных клеток происходило формирование крупных плавающих одиночных 3D-структур. Можно заключить, что культуральный пластик Nunclon™ Sphera™ с низкими адгезивными свойствами наиболее

пригоден для получения опухолевых и опухолево-стромальных сфероидов из клеток РМЖ (см. рис. 2).

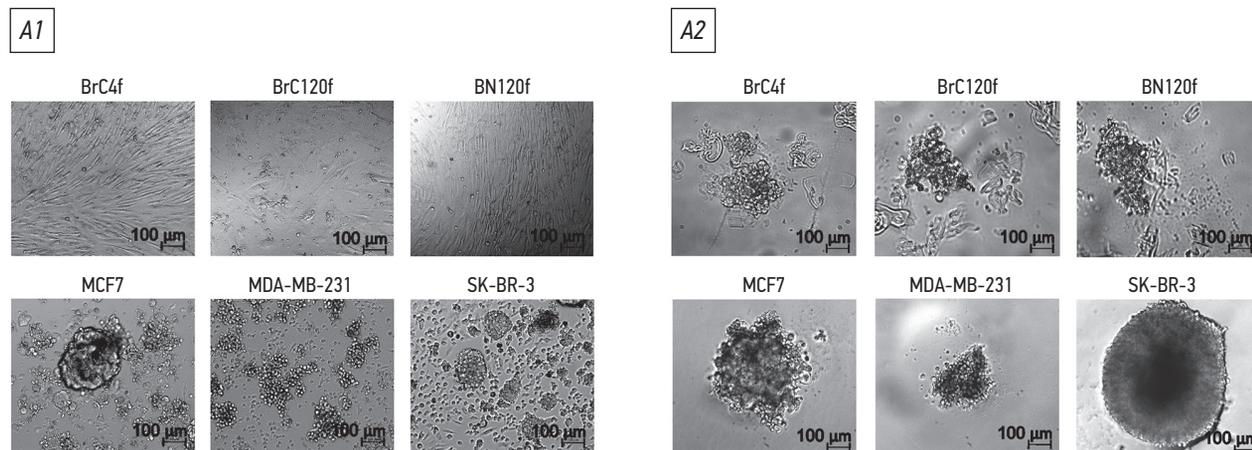
Для подтверждения включения клеток обоих типов — опухолевых и стромальных — в состав гетерогенных сфероидов, образующихся при культивировании на планшетах Nunclon™ Sphera™, использовали линии опухолевых клеток MCF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3, продуцирующие красный флуоресцентный белок (mKate2), и клетки BrC120f, продуцирующие зелёный флуоресцентный белок (eGFP). Флуоресцентная микроскопия показала, что в состав сфероидов входят оба типа клеток — фибробласты и опухолевые клетки (рис. 3). Фибробласты преимущественно формируют внутренний каркас, а опухолевые клетки располагаются на периферии.

Таким образом, среди тестируемых методов использование низкоадгезивных планшетов Nunclon™ Sphera™ оказалось наиболее эффективным для получения крупных плавающих 3D-2-структур округлой формы, состоящих из опухолевых и стромальных клеток РМЖ (табл. 1).

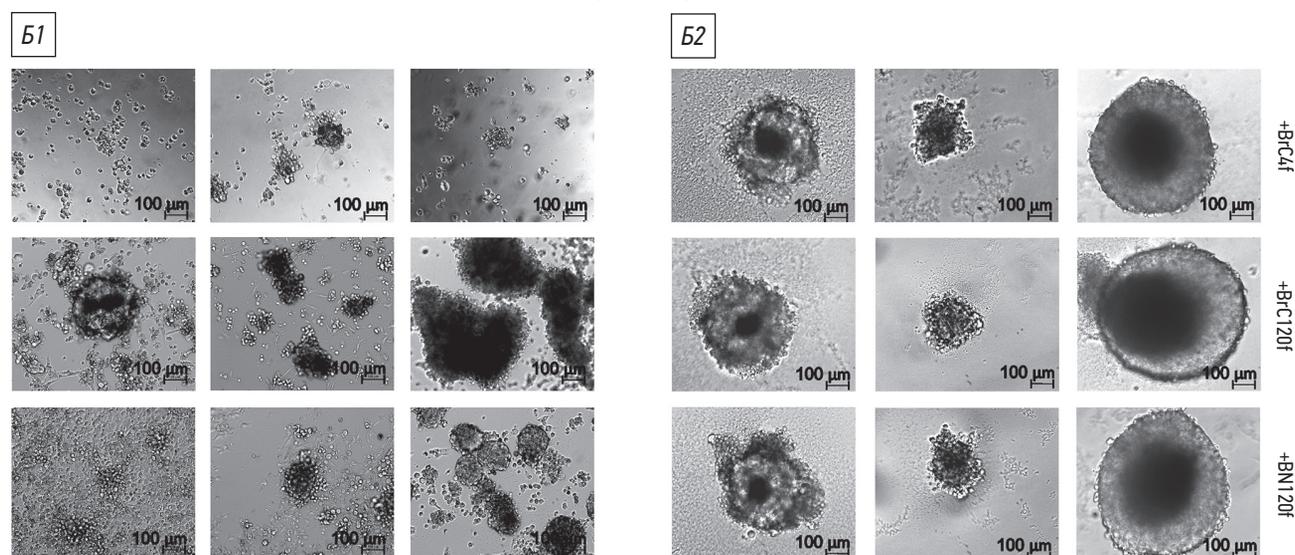
### Оптимизация манипуляций для проведения морфологического анализа сфероидов

Помимо успешного формирования 3D- и 3D-2-клеточных структур *in vitro*, существует проблема сохранения их целостности при различных манипуляциях в процессе анализа сфероидов. Так, многие методы подразумевают перенос и промывку сфероидов при подготовке образцов. Например, одним из распространённых методов

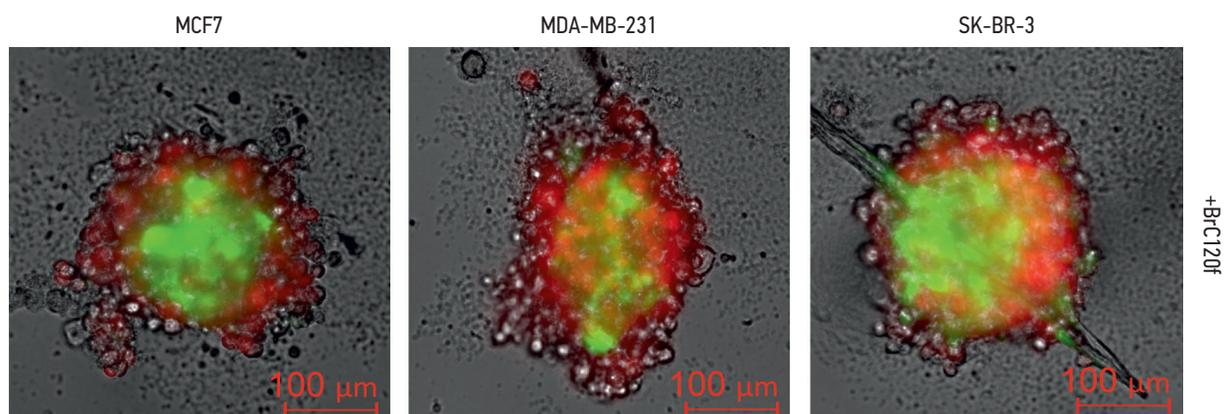
## А. Монокультуривание



## Б. Сокультуривание



**Рис. 2.** Сфероиды сформированы при культивировании на низкоадгезивном пластике: A1, B1 — Eppendorf (Eppendorf, Германия); A2, B2 — Nunclon™ Sphera™ (Thermo Fisher Scientific, Япония).



**Рис. 3.** Сфероиды сформированы опухолевыми клетками, продуцирующими белок mKate2 (красный цвет), и фибробластами, продуцирующими белок eGFP (зелёный цвет). Флуоресцентная микроскопия.

морфологического анализа сфероидов является получение «раздавленных» препаратов сфероидов, когда сфероид помещается на предметное стекло, которое затем

накрывают покровным стеклом [23]. При этом предполагают, что расположение клеток в препарате будет соответствовать расположению клеток в сфероиде [24]. Такие

**Таблица 1.** Сравнительный анализ методов получения 3D- и 3D-2-моделей рака молочной железы

Субстрат	Желатин	Агароза	Matrigel™	Eppendorf	Nunclon™ Sphera™
Опухолевые 3D-модели					
MCF7	–	+/-	+	+/-	+
MDA-MB-231	–	–	+	–	+
SK-BR-3	–	+	+	+/-	+
Стромальные 3D-модели					
BrC4f	–	+	+/-	–	+/-
BrC120f	–	+	+/-	–	+/-
BN120f	–	+	+/-	–	+/-
Опухолево-стромальные 3D-модели					
3D-2-структуры	–	+/-	+/-	+/-	+

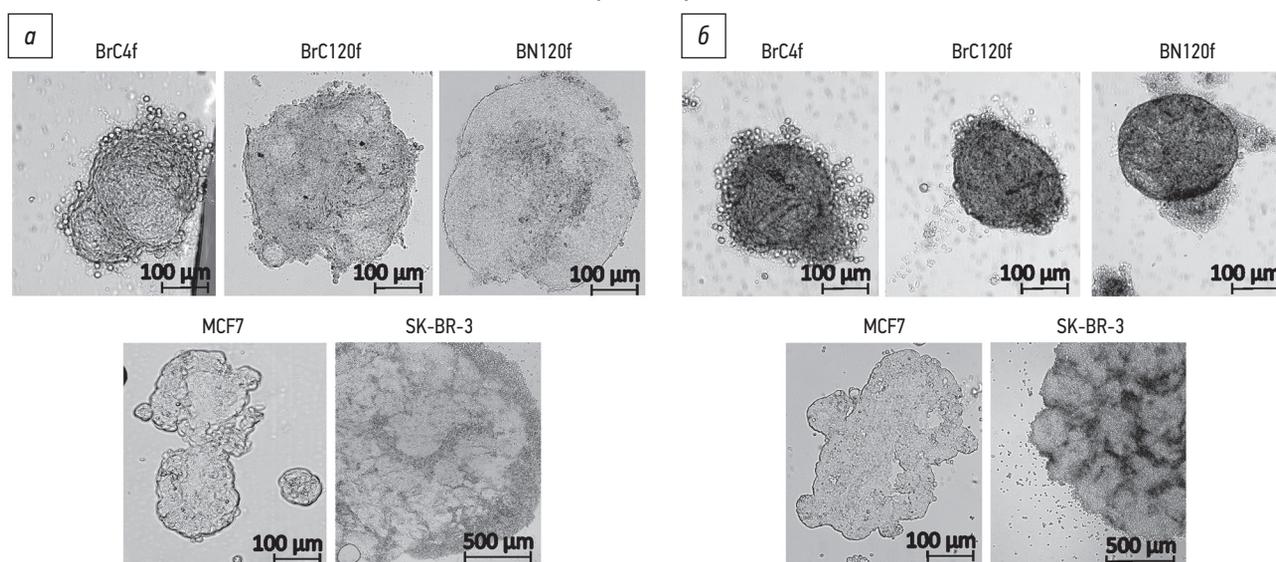
Примечание: «–» — сфероид не формируется; «+/-» — сфероид формируется, наблюдается адгезия клеток к поверхности субстрата; «+» — сфероид формируется.

препараты далее могут быть использованы для иммуноцитохимического окрашивания.

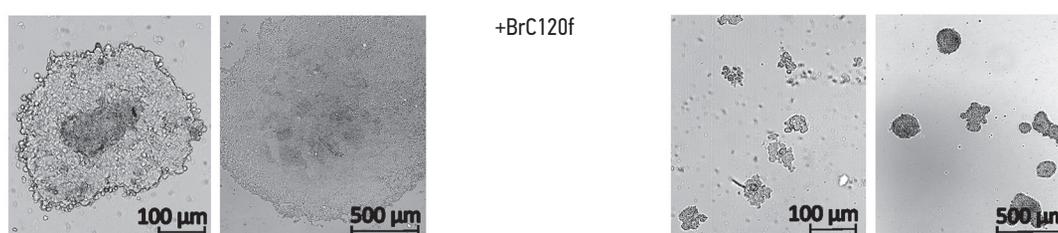
При сравнительном анализе процесса переноса сфероидов на предметное стекло и получения «раздавленных препаратов» сфероидов РМЖ при комнатной температуре и с использованием охлаждённых наконечников,

растворов, а также с охлаждением дна культурального планшета обнаружено, что охлаждение способствует сохранности структуры сфероидов: сохраняется округлая форма отпечатка и присутствует лишь незначительное количество отделённых от сфероидов клеток (рис. 4). В случае использования наконечников и растворов комнатной

#### Монокультивирование



#### Сокультивирование



**Рис. 4.** Препараты «раздавленных» сфероидов, полученные в стандартных условиях и в условиях охлаждения: *а* — охлаждение; *б* — комнатная температура.

температуры происходила дезагрегация сфероидов на отдельные клетки на разных стадиях — как на стадии переноса из лунки на предметное стекло, так и на стадии касания сфероида покровным стеклом, что выражалось в получении препаратов в виде отдельно лежащих клеток (см. рис. 4). Следовательно, можно заключить, что использование охлаждённого пластика и растворов является технологическим преимуществом при работе со сфероидами, растущими в отсутствие подложки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Рак молочной железы — лидирующее диагностируемое онкологическое заболевание у женщин во всём мире [25]. Клеточные 2D- и 3D-модели злокачественных опухолей позволяют осуществлять их функциональное профилирование и выявлять молекулярные и клеточные механизмы, участвующие в патогенезе [26, 27].

Выбор субстрата для формирования 3D- и 3D-2-моделей РМЖ является ключевым этапом. Использование природных гидрогелей для конструирования сфероидных моделей позволяет максимально имитировать строение и свойства тканей [3]. Так, желатин получают в результате необратимого гидролиза коллагена, поэтому в биоматериалах для тканевой инженерии он способен частично выполнять функции коллагена [28, 29]. При 3D-печати «органов на чипе» часто применяют желатин как один из компонентов для создания более сложного геля с целью получения сфероидов [30, 31]. В нашем исследовании использование 2% желатина в качестве субстрата для формирования 3D- и 3D-2-моделей РМЖ не привело к формированию 3D- и 3D-2-структур (см. рис. 1). Известно, что желатиновый гидрогель обладает высокой проницаемостью для кислорода и питательных веществ [30], но не способствует агрегации клеток в сфероиды. Таким образом, наши эксперименты также подтвердили субстратную неэффективность гидрогеля на основе желатина без дополнительных компонентов для создания сфероидов из клеток РМЖ.

Агароза — биоразлагаемый, неадгезивный и нетоксичный природный полисахарид, получаемый из агара морских водорослей [32], который позволяет формировать и поддерживать архитектуру ткани за счёт возможности газообмена и проницаемости для малых молекул [32, 33]. Обычно сфероиды формируют из эпителиальных клеток. Имется не так много исследований, посвящённых получению сфероидов из стромальных клеток. Мы показали, что использование агарозы как субстрата максимально эффективно для образования сфероидов из стромальных клеток и менее эффективно для получения сфероидов из опухолевых клеток. 3D-2-модели РМЖ, сформированные на 2% агарозе, собираются в структуры различной плотности — с хорошо структурированным ядром и более рыхлым внешним окружением.

N. Kanda [34] показал, что первичные фибробласты лёгких человека способны образовывать непролиферирующие сфероиды с чёткой организацией и ориентацией клеток внутри сфероида в течение 24 ч. J. Bizik и соавт. [35] получили сфероиды из дермальных фибробластов, которые формировались в течение 24 ч и разрушались через 120 ч (авторы использовали субстрат из 0,8% агарозы). В работе Y. Tan и соавт. [36] получена 3D-модель фиброза микротканей человека из клеток первичных фибробластов кожи человека, продемонстрирована повышенная секреция ими коллагена по сравнению с фибробластами, выращенными в 2D-модели, через 7 сут культивирования в формах из 2% агарозного гидрогеля. В нашем исследовании удалось сформировать и культивировать гомо-сфероиды из фибробластов, выделенных из здоровой и опухолевой ткани молочной железы человека минимум в течение 240 ч (см. рис. 1). Подобные 3D-модели только из стромальных клеток способны имитировать фиброзный очаг в опухоли, что позволяет рассматривать их как модели для исследования противифиброзных препаратов.

Matrigel™ представляет собой смесь белков внеклеточного матрикса, в состав которого входят белки базальной мембраны из клеток опухоли мыши Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), необходимые для поляризации, адгезии клеток и регуляции их роста [5, 37]. Высевание суспензии клеток на Matrigel™ (см. рис. 1) позволило в данном исследовании сформировать опухолевые, стромальные и опухолево-стромальные сфероиды. Однако в качестве способа последующего длительного культивирования такой метод не подходит из-за наблюдаемой адгезии клеток к субстрату для сфероидов только из фибробластов или для гетерогенных 3D-2-моделей.

Сравнение культурального пластика с низкими адгезивными свойствами с U-образным дном от двух разных производителей позволило установить, что планшеты фирмы Nunclon™ Sphera™ (см. рис. 2) являются наиболее подходящими для культивирования 3D-структур. Гидрофильное полимерное покрытие Nunclon™ Sphera™ ингибирует прикрепление клеток ко дну пластика для культивирования, блокируя белки внеклеточного матрикса, необходимые для адгезии клеток [11, 38]. C. Neeley и соавт. [11] показали, что использование пластика Nunclon™ Sphera™ оптимально для формирования и поддержания роста в виде сфероидов клеток различного гистологического происхождения, в том числе клеток аденокарциномы молочной железы MCF7. J. Mei и соавт. [39] установили, что клетки MCF7 формируют компактные и крупные сфероиды на планшетах Nunclon™ Sphera™ в присутствии 10% сыворотки, в то время как опухолевые клетки SK-BR-3 и MDA-MB-231 не образуют компактных оформленных сфероидов.

Эмбриональная сыворотка содержит некоторые компоненты внеклеточного матрикса (например,

фибронектин, ламинин), которые могут способствовать адгезии клеток [17], поэтому для предотвращения прикрепления клеток к пластику нами были сформированы сфероиды в бессывороточных условиях, в питательной среде DMEM/F12, в присутствии факторов роста EGF, bFGF, инсулина, B-27™ Plus Supplement, BSA [10, 40]. Поскольку среда DMEM/F12 лишена большей части питательных веществ, для поддержания роста клеток человека и агрегации их в сфероиды *in vitro* также требуются дополнительные компоненты, такие как белки-переносчики (альбумин), инсулин и факторы роста [41]. Используемое в данном исследовании соотношение дополнительных компонентов и факторов роста для формирования и культивирования опухолевых сфероидов впервые описано в работах S. Johnson и соавт. [15] и P.K. Lo и соавт. [16].

Применение планшетов Nunclon™ Sphera™ в сочетании с бессывороточной средой позволило получать в лунках одиночные сфероиды. Такое формирование сфероидов из различных по происхождению клеток может упрощать последующую количественную оценку по следующим критериям: динамическое измерение диаметра сфероидов в процессе культивирования, оценка степени «округлости» сфероидов [10], а также определение количества жизнеспособных клеток и прироста популяций на разных стадиях культивирования. Так, наиболее крупные 3D-2-сфероиды РМЖ с чёткой внешней границей были сформированы опухолевыми клетками SK-BR-3 вне зависимости от типа используемых стромальных клеток, а рыхлые опухолевые и опухолево-стромальные сфероиды — из клеток MDA-MB-231. Ранее нами было описано, что фибробласты, полученные из здоровой ткани молочной железы, выступают центральным каркасом для формирования внешнего опухолевого слоя в гетерогенных 3D-2-моделях [10]. В предлагаемом исследовании мы показали, что для клеток культур MCF7 и MDA-MB-231 добавление стромальных клеток способствовало формированию более крупных и плотных структур по сравнению с 3D-моделью РМЖ (см. рис. 3). В работе J. Mei и соавт. [39] подчеркнуто, что в присутствии нормальных фибробластов кожи человека сфероиды из клеток MDA-MB-231 становятся более компактными.

Ранее [10] нами продемонстрировано, что добавление нормальных фибробластов кожи к клеткам SK-BR-3 ускоряло формирование 3D-2-структур. Размер опухолевых и гетерогенных сфероидов, выраженный через изменение объёма сфероида, уменьшался в зависимости от используемых опухолевых клеток в ряду SK-BR-3 > MCF-7 > MDA-MB-231. Предложенный нами вариант сочетания пластика Nunclon™ Sphera™ и бессывороточных условий культивирования позволил получать опухолевые и опухолево-стромальные сфероиды единообразно и с высокой эффективностью для всех используемых

в работе опухолевых клеток вне зависимости от типа стромальных клеток.

Новые подходы к получению и культивированию 3D-культур делают возможным создание релевантных физиологических клеточных моделей. Однако последующие трудоёмкие этапы пипетирования для манипуляций со сфероидами, такие как сбор образца для повторного переноса и множественные промывки [42] для микроскопического анализа, могут влиять на качество препарата. Для сохранности сфероидов, сформированных без каркаса из гидрогеля, при манипуляциях с ними было использовано охлаждение наконечников и растворов (см. рис. 4). Обычно охлаждение наконечников и растворов практикуют при манипуляциях с агентами, затвердевающими на фоне повышения температуры (коллаген, Matrigel™ и т.д.) [43–45]. M.G. Rolver и соавт. [46] для предотвращения потери целостности сфероидов в ходе пробоподготовки предварительно охлаждали растворы при проведении промежуточных отмывок, но без охлаждения наконечников и планшетов. Применение холодных наконечников и растворов в процессе пробоподготовки к микроскопии в предлагаемом исследовании позволило сохранить структуру сфероида.

Таким образом, хотя для получения сфероидов из монослойных культур клеток доступно несколько методов и большое количество различных протоколов [47], тем не менее эти протоколы по-прежнему противоречивы [48].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сфероиды — это распространённая система культивирования клеток многоклеточной опухолевой модели *in vitro* для имитации трёхмерности опухоли. В нашем исследовании сравниваются разные типы подложек из гидрогелей и планшеты с низкоадгезивным покрытием для получения трёхмерных клеточных структур. Показано, что применение только одного типа подложки из гидрогеля не позволяет получить весь спектр 3D-структур рака молочной железы: для сфероидов из фибробластов и опухолево-стромальных сфероидов больше подходит подложка из агарозы, а для опухолевых клеток — из Matrigel™. Более оптимальным методом получения 3D-2-структур, состоящих из опухолевых и стромальных клеток рака молочной железы, является использование низкоадгезивных планшетов Nunclon™ Sphera™. Предварительное охлаждение наконечников и растворов способствует сохранности структуры сфероидов при манипуляциях с ними во время пробоподготовки к микроскопии.

Предложенные подходы для формирования и гомогенных (3D), и гетерогенных (3D-2) сфероидов из опухолевых и (или) стромальных клеток рака молочной железы представляют собой обобщённое руководство

по наиболее эффективному способу получения сфероидов различного клеточного состава.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНО

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-10039).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Segeritz C.-P., Vallier L. Cell culture: growing cells as model systems in vitro. In: Jalali M., Saldanha F., Jalali M., editors. Basic science methods for clinical researchers. Elsevier: Academic Press, 2017. P. 151–172. doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
2. Lin A., Sved Skottvoll F., Rayner S., et al. 3D cell culture models and organ-on-a-chip: meet separation science and mass spectrometry // *Electrophoresis*. 2020. Vol. 41, N 1-2. P. 56–64. doi: 10.1002/elps.201900170
3. Saji Joseph J., Tebogo Malindisa S., Ntwasa M. Two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culturing in drug discovery. In: Ali Mehanna R., editor. Cell culture. London : IntechOpen, 2019. P. 21–42. doi: 10.5772/intechopen.81552
4. Ravi M., Kaviya S.R., Paramesh V. Culture phases, cytotoxicity and protein expressions of agarose hydrogel induced Sp2/0, A549, MCF-7 cell line 3D cultures // *Cytotechnology*. 2016. Vol. 68, N 3. P. 429–441. doi: 10.1007/s10616-014-9795-z
5. Badea M.A., Balas M., Hermenean A., et al. Influence of Matrigel on single- and multiple-spheroid cultures in breast cancer research // *SLAS Discov*. 2019. Vol. 24, N 5. P. 563–578. doi: 10.1177/2472555219834698
6. Zhao Y., Yao R., Ouyang L., et al. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model in vitro // *Biofabrication*. 2014. Vol. 6, N 3. P. 035001. doi: 10.1088/1758-5082/6/3/035001
7. Hoarau-Véchet J., Rafii A., Touboul C., Pasquier J. Halfway between 2d and animal models: are 3d cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? // *Int J Mol Sci*. 2018. Vol. 19, N 1. P. 181. doi: 10.3390/ijms19010181
8. Park Y., Huh K.M., Kang S.-W. Applications of biomaterials in 3D cell culture and contributions of 3D cell culture to drug development and basic biomedical research // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 5. P. 2491. doi: 10.3390/ijms22052491
9. Nushtaeva A.A., Karpushina A.A., Ermakov M.S., et al. Establishment of primary human breast cancer cell lines using “pulsed hypoxia” method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice // *Cancer Cell Int*. 2019. Vol. 19, N 1. P. 46. doi: 10.1186/s12935-019-0766-5
10. Нуштаева А.А., Савинкова М.М., Ермаков М.С., и др. Клетки рака молочной железы изменяют чувствительность к гормональным и ростовым стимулам при 3D-культивировании // *Цитология*. 2022. Т. 64, № 4. С. 353–365. doi: 10.31857/S0041377122040046
11. Neeley C., Gaarn L., Marwood T., et al. Abstract 208: a novel cell culture surface supports effective formation of three dimensional cancer spheroids in suspension // *Cancer Res*. 2013. Vol. 73, N 8 (suppl.). P. 208. doi: 10.1158/1538-7445.AM2013-208
12. Van Der Valk J., Brunner D., De Smet K., et al. Optimization of chemically defined cell culture media — replacing fetal bovine se-

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

rum in mammalian in vitro methods // *Toxicol In Vitro*. 2010. Vol. 24, N 4. P. 1053–1063. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016

13. Bielecka Z.F., Maliszewska-Olejniczak K., Safir I.J., et al. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research: 3D cell culture models in CSCs research // *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2017. Vol. 92, N 3. P. 1505–1520. doi: 10.1111/brv.12293

14. Xie G., Ji A., Yuan Q., et al. Tumour-initiating capacity is independent of epithelial–mesenchymal transition status in breast cancer cell lines // *Br J Cancer*. 2014. Vol. 110, N 10. P. 2514–2523. doi: 10.1038/bjc.2014.153

15. Johnson S., Chen H., Lo P.-K. In vitro tumorsphere formation assays // *Bio Protoc*. 2013. Vol. 3, N 3. P. e325. doi: 10.21769/bioprotoc.325

16. Lo P.K., Kanojia D., Liu X., et al. CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin–TGFβ signaling // *Oncogene*. 2012. Vol. 31, N 21. P. 2614–2626. doi: 10.1038/onc.2011.439

17. Yang Z., Xiong H.R. Culture conditions and types of growth media for mammalian cells. In: Ceccherini-Nelli L, Matteolo B., editors. Biomedical tissue culture. Rijeka : InTech, 2012. P. 3–18. doi: 10.5772/52301

18. Jorissen R. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling // *Exp Cell Res*. 2003. Vol. 284, N 1. P. 31–53. doi: 10.1016/s0014-4827(02)00098-8

19. Yun Y.R., Won J.E., Jeon E., et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration // *J Tissue Eng*. 2010. Vol. 1, N 1. P. 218142. doi: 10.4061/2010/218142

20. Dallas M., Balhouse B., Navarro D., et al. Improving cell culture outcomes through stabilized bFGF // *Genetic Engineering & Biotechnology News*. 2018. Vol. 38, N 19. P. 22–23. doi: 10.1089/gen.38.19.07

21. Devireddy L.R., Myers M., Screven R., et al. A serum-free medium formulation efficiently supports isolation and propagation of canine adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells // *PLoS One*. 2019. Vol. 14, N 2. P. e0210250. doi: 10.1371/journal.pone.0210250

22. Francis G.L. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications // *Cytotechnology*. 2010. Vol. 62, N 1. P. 1–16. doi: 10.1007/s10616-010-9263-3

23. Mokhtari R.B., Qorri B., Sambhi M., et al. 3d multicellular stem-like human breast tumor spheroids enhance tumorigenicity of orthotopic xenografts in athymic nude rat model // *Cancers (Basel)*. 2021. Vol. 13, N 11. P. 2784. doi: 10.3390/cancers13112784

24. Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., et al. EGFR Transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells

- spheroids with partly loss of HER3 receptor // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 23. P. 15. doi: 10.3390/ijms222312937
25. Azamjah N., Soltan-Zadeh Y., Zayeri F. Global trend of breast cancer mortality rate: a 25-year study // *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019. Vol. 20, N 7. P. 2015–2020. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.7.2015
26. Jo Y., Choi N., Kim K., et al. Chemoresistance of cancer cells: requirements of tumor microenvironment-mimicking *in vitro* models in anti-cancer drug development // *Theranostics*. 2018. Vol. 8, N 19. P. 5259–5275. doi: 10.7150/thno.29098
27. Weiswald L.-B., Bellet D., Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology // *Neoplasia*. 2015. Vol. 17, N 1. P. 1–15. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004
28. Echave M.C., Burgo L.S., Pedraz J.L., Orive G. Gelatin as biomaterial for tissue engineering // *Curr Pharm Des*. 2017. Vol. 23, N 24. P. 3567–358. doi: 10.2174/0929867324666170511123101
29. Bello A.B., Kim D., Kim D., et al. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: from cell culture to medical applications // *Tissue Eng Part B Rev*. 2020. Vol. 26, N 2. P. 164–180. doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0256
30. Saotome T., Shimada N., Matsuno K., et al. Gelatin hydrogel nonwoven fabrics of a cell culture scaffold to formulate 3-dimensional cell constructs // *Regen Ther*. 2021. Vol. 18, P. 418–429. doi: 10.1016/j.reth.2021.09.008
31. Shim K., Kim S.H., Lee D., et al. Fabrication of micrometer-scale porous gelatin scaffolds for 3D cell culture // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2017. Vol. 50. P. 183–189. doi: 10.1016/j.jiec.2017.02.012
32. Shin S., Ikram M., Subhan F., et al. Alginate–marine collagen–agarose composite hydrogels as matrices for biomimetic 3D cell spheroid formation // *RSC advances*. 2016. Vol. 6, N 52. P. 46952–46965. doi: 10.1039/C6RA01937D
33. Tang Y., Liu J., Chen Y. Agarose multi-wells for tumour spheroid formation and anti-cancer drug test // *Microelectronic Engineering*. 2016. Vol. 158, P. 41–45. doi: 10.1016/j.mee.2016.03.009
34. Kanda N. Fibroblast spheroids: a useful assay for drug screening in idiopathic pulmonary fibrosis? [dissertation]. London (UK), 2015.
35. Bizik J., Kankuri E., Ristimäki A., et al. Cell–cell contacts trigger programmed necrosis and induce cyclooxygenase-2 expression // *Cell Death Differ*. 2004. Vol. 11, N 2. P. 183–195. doi: 10.1038/sj.cdd.4401317
36. Tan Y., Suarez A., Garza M., et al. Human fibroblast-macrophage tissue spheroids demonstrate ratio-dependent fibrotic activity for *in vitro* fibrogenesis model development // *Biomater Sci*. 2020. Vol. 8, N 7. P. 1951–1960. doi: 10.1039/C9BM00900K
37. Kleinman H.K., Martin G.R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity // *Semin Cancer Biol*. 2005. Vol. 15, N 5. P. 378–386. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.004
38. Lerman M.J., Lembong J., Muramoto S., et al. The evolution of polystyrene as a cell culture material // *Tissue Eng Part B Rev*. 2018. Vol. 24, N 5. P. 359–372. doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0056
39. Mei J., Böhländ C., Geiger A., et al. Development of a model for fibroblast-led collective migration from breast cancer cell spheroids to study radiation effects on invasiveness // *Radiat Oncol*. 2021. Vol. 16, N 1. P. 159. doi: 10.1186/s13014-021-01883-6
40. Xie G., Yao Q., Liu Y., et al. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures // *Int J Oncol*. 2012. Vol. 40, N 4. P. 1171–1179. doi: 10.3892/ijo.2011.1275
41. Karnieli O., Friedner O.M., Allackson J.G., et al. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies // *Cytotherapy*. 2017. Vol. 19, N 2. P. 155–169. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.011
42. Han C., Takayama S., Park J. Formation and manipulation of cell spheroids using a density adjusted PEG/DEX aqueous two phase system // *Sci Rep*. 2015. Vol. 5, N 1. P. 11891. doi: 10.1038/srep11891
43. De Hoogt R., Estrada M.F., Vidic S., et al. Protocols and characterization data for 2D, 3D, and slice-based tumor models from the PREDECT project // *Sci Data*. 2017. Vol. 4, N 1. P. 170. doi: 10.1038/sdata.2017.170
44. Vinci M., Box C., Eccles S.A. Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay // *J Vis Exp*. 2015. N 99. P. 52686. doi: 10.3791/52686
45. Summerbell E.R., Mouw J.K., Bell J.S.K., et al. Epigenetically heterogeneous tumor cells direct collective invasion through filopodia-driven fibronectin micropatterning // *Sci Adv*. 2020. Vol. 6, N 30. P. eaaz6197. doi: 10.1126/sciadv.aaz6197
46. Rolver M.G., Elingaard-Larsen L.O., Pedersen S.F. Assessing cell viability and death in 3D spheroid cultures of cancer cells // *J Vis Exp*. 2019. N 148. P. 59714. doi: 10.3791/59714
47. Nagelkerke A., Bussink J., Sweep F.C.G.J., Span P.N. Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: how to go three-dimensional // *Anal Biochem*. 2013. Vol. 437, N 1. P. 17–19. doi: 10.1016/j.ab.2013.02.004
48. Froehlich K., Haeger J.D., Heger J., et al. Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols // *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2016. Vol. 21, N 3-4. P. 89–98. doi: 10.1007/s10911-016-9359-2

## REFERENCES

1. Segeritz C-P, Vallier L. Cell culture: growing cells as model systems *in vitro*. In: Jalali M, Saldanha F, Jalali M, editors. *Basic science methods for clinical researchers*. Elsevier: Academic Press; 2017. P. 151–172. doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6
2. Lin A, Sved Skottvoll F, Rayner S, et al. 3D cell culture models and organ-on-a-chip: meet separation science and mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2020;41(1-2):56–64. doi: 10.1002/elps.201900170
3. Saji Joseph J, Tebogo Malindisa S, Ntwasa M. Two-dimensional (2d) and three-dimensional (3d) cell culturing in drug discovery. In: Ali Mehanna R, editor. *Cell culture*. IntechOpen; 2019. doi: 10.5772/intechopen.81552
4. Ravi M, Kaviya SR, Paramesh V. Culture phases, cytotoxicity and protein expressions of agarose hydrogel induced Sp2/0, A549, MCF-7 cell line 3D cultures. *Cytotechnology*. 2016;68(3):429–441. doi: 10.1007/s10616-014-9795-z
5. Badea MA, Balas M, Hermenean A, et al. Influence of matrigel on single- and multiple-spheroid cultures in breast cancer research. *SLAS Discov*. 2019;24(5):563–578. doi: 10.1177/2472555219834698
6. Zhao Y, Yao R, Ouyang L, et al. Three-dimensional printing of Hela cells for cervical tumor model *in vitro*. *Biofabrication*. 2014;6(3):035001. doi: 10.1088/1758-5082/6/3/035001

7. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2d and animal models: are 3d cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? *Int J Mol Sci.* 2018;19(1):181. doi: 10.3390/ijms19010181
8. Park Y, Huh KM, Kang SW. Applications of biomaterials in 3d cell culture and contributions of 3d cell culture to drug development and basic biomedical research. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2491. doi: 10.3390/ijms22052491
9. Nushtaeva AA, Karpushina AA, Ermakov MS, et al. Establishment of primary human breast cancer cell lines using “pulsed hypoxia” method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice. *Cancer Cell Int.* 2019;19(1):46. doi: 10.1186/s12935-019-0766-5
10. Nushtaeva AA, Karpushina AA, Ermakov MS, et al. Breast cancer cells in 3D models changes their response to hormonal and growth factors. *Tsitologiya.* 2022;64(4):353–365. (In Russ). doi: 10.31857/S0041377122040046
11. Neeley C, Gaarn L, Marwood T, et al. Abstract 208: a novel cell culture surface supports effective formation of three dimensional cancer spheroids in suspension. *Cancer Res.* 2013;73(8 suppl.):208. doi: 10.1158/1538-7445.AM2013-208
12. Van Der Valk J, Brunner D, De Smet K, et al. Optimization of chemically defined cell culture media — replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(4):1053–1063. doi: 10.1016/j.tiv.2010.03.016
13. Bielecka ZF, Maliszewska-Olejniczak K, Safir IJ, et al. Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research: 3D cell culture models in CSCs research. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2017;92(3):1505–1520. doi: 10.1111/brv.12293
14. Xie G, Ji A, Yuan Q, et al. Tumour-initiating capacity is independent of epithelial-mesenchymal transition status in breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 2014;110(10):2514–2523. doi: 10.1038/bjc.2014.153
15. Johnson S, Chen H, Lo PK. In vitro tumorsphere formation assays. *Bio Protoc.* 2013;3(3):e325. doi: 10.21769/BioProtoc.325
16. Lo PK, Kanojia D, Liu X, et al. CD49f and CD61 identify Her2/neu-induced mammary tumor-initiating cells that are potentially derived from luminal progenitors and maintained by the integrin-TGFβ signaling. *Oncogene.* 2012;31(21):2614–2626. doi: 10.1038/ncr.2011.439
17. Yang Z, Xiong HR. Culture conditions and types of growth media for mammalian cells. In: Ceccherini-Nelli L, editor. *Biomedical tissue culture.* InTech; 2012. doi: 10.5772/52301
18. Jorissen R. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res.* 2003;284(1):31–53. doi: 10.1016/S0014-4827(02)00098-8
19. Yun YR, Won JE, Jeon E, et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng.* 2010;1(1):218142. doi: 10.4061/2010/218142
20. Dallas M, Balhouse B, Navarro D, et al. Improving cell culture outcomes through stabilized bfgf. *Genetic Engineering & Biotechnology News.* 2018;38(19):22–23. doi: 10.1089/gen.38.19.07
21. Devireddy LR, Myers M, Screven R, et al. A serum-free medium formulation efficiently supports isolation and propagation of canine adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One.* 2019;14(2):e0210250. doi: 10.1371/journal.pone.0210250
22. Francis GL. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology.* 2010;62(1):1–16. doi: 10.1007/s10616-010-9263-3
23. Mokhtari RB, Qorri B, Sambhi M, et al. 3d multicellular stem-like human breast tumor spheroids enhance tumorigenicity of orthotopic xenografts in athymic nude rat model. *Cancers (Basel).* 2021;13(11):2784. doi: 10.3390/cancers13112784
24. Troitskaya O, Novak D, Nushtaeva A, et al. Egrf transgene stimulates spontaneous formation of mcf7 breast cancer cells spheroids with partly loss of her3 receptor. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12937. doi: 10.3390/ijms222312937
25. Azamjah N, Soltan-Zadeh Y, Zayeri F. Global trend of breast cancer mortality rate: a 25-year study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019;20(7):2015–2020. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.7.2015
26. Jo Y, Choi N, Kim K, et al. Chemoresistance of cancer cells: requirements of tumor microenvironment-mimicking in vitro models in anti-cancer drug development. *Theranostics.* 2018;8(19):5259–5275. doi: 10.7150/thno.29098
27. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015;17(1):1–15. doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004
28. Echave MC, Burgo LS, Pedraz JL, Orive G. Gelatin as biomaterial for tissue engineering. *Curr Pharm Des.* 2017;23(24):3567–3584. doi: 10.2174/0929867324666170511123101
29. Bello AB, Kim D, Kim D, et al. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: from cell culture to medical applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2020;26(2):164–180. doi: 10.1089/ten.teb.2019.0256
30. Saotome T, Shimada N, Matsuno K, et al. Gelatin hydrogel nonwoven fabrics of a cell culture scaffold to formulate 3-dimensional cell constructs. *Regen Ther.* 2021;18:418–429. doi: 10.1016/j.reth.2021.09.008
31. Shim K, Kim SH, Lee D, et al. Fabrication of micrometer-scale porous gelatin scaffolds for 3D cell culture. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry.* 2017;50:183–189. doi: 10.1016/j.jiec.2017.02.012
32. Shin S, Ikram M, Subhan F, et al. Alginate-marine collagen-agarose composite hydrogels as matrices for biomimetic 3D cell spheroid formation. *RSC Adv.* 2016;6(52):46952–46965. doi: 10.1039/C6RA01937D
33. Tang Y, Liu J, Chen Y. Agarose multi-wells for tumour spheroid formation and anti-cancer drug test. *Microelectronic Engineering.* 2016;158:41–45. doi: 10.1016/j.mee.2016.03.009
34. Kanda N. *Fibroblast spheroids: a useful assay for drug screening in idiopathic pulmonary fibrosis?* [dissertation]. London (UK); 2015.
35. Bizik J, Kankuri E, Ristimäki A, et al. Cell-cell contacts trigger programmed necrosis and induce cyclooxygenase-2 expression. *Cell Death Differ.* 2004;11(2):183–195. doi: 10.1038/sj.cdd.4401317
36. Tan Y, Suarez A, Garza M, et al. Human fibroblast-macrophage tissue spheroids demonstrate ratio-dependent fibrotic activity for in vitro fibrogenesis model development. *Biomater Sci.* 2020;8(7):1951–1960. doi: 10.1039/C9BM00900K
37. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(5):378–386. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.004
38. Lerman MJ, Lembong J, Muramoto S, et al. The evolution of polystyrene as a cell culture material. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018;24(5):359–372. doi: 10.1089/ten.teb.2018.0056
39. Mei J, Böhländ C, Geiger A, et al. Development of a model for fibroblast-led collective migration from breast cancer cell

spheroids to study radiation effects on invasiveness. *Radiat Oncol.* 2021;16(1):159. doi: 10.1186/s13014-021-01883-6

**40.** Xie G., Yao Q., Liu Y., et al. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol.* 2012;40(4):1171–1179. doi: 10.3892/ijo.2011.1275

**41.** Karnieli O, Friedner OM, Allickson JG, et al. A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies. *Cytotherapy.* 2017;19(2):155–169. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.11.011

**42.** Han C, Takayama S, Park J. Formation and manipulation of cell spheroids using a density adjusted PEG/DEX aqueous two phase system. *Sci Rep.* 2015;5(1):11891. doi: 10.1038/srep11891

**43.** De Hoogt R, Estrada MF, Vidic S, et al. Protocols and characterization data for 2D, 3D, and slice-based tumor models from the PREDECT project. *Sci Data.* 2017;4(1):170. doi: 10.1038/sdata.2017.170

**44.** Vinci M, Box C, Eccles SA. Three-dimensional (3d) tumor spheroid invasion assay. *J Vis Exp.* 2015;(99):52686. doi: 10.3791/52686

**45.** Summerbell ER, Mouw JK, Bell JSK, et al. Epigenetically heterogeneous tumor cells direct collective invasion through filopodia-driven fibronectin micropatterning. *Sci Adv.* 2020;6(30):eaaz6197. doi: 10.1126/sciadv.aaz6197

**46.** Rolver MG, Elingaard-Larsen LO, Pedersen SF. Assessing cell viability and death in 3d spheroid cultures of cancer cells. *J Vis Exp.* 2019;(148):59714. doi: 10.3791/59714

**47.** Nagelkerke A, Bussink J, Sweep FCGJ, Span PN. Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: how to go three-dimensional. *Anal Biochem.* 2013;437(1):17–19. doi: 10.1016/j.ab.2013.02.004

**48.** Froehlich K, Haeger JD, Heger J, et al. Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2016;21(3-4):89–98. doi: 10.1007/s10911-016-9359-2

## ОБ АВТОРАХ

\* **Нуштаева Анна Андреевна**, к.б.н.;

адрес: Россия, 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 8;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9367-807X>;

eLibrary SPIN: 7964-9774;

e-mail: nushtaeva.anna@gmail.com

**Абдурахманова Мария Маджидовна**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6557-553X>;

eLibrary SPIN: 6160-7608

**Ермаков Михаил Сергеевич**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7107-4187>;

eLibrary SPIN: 7929-4095

**Рихтер Владимир Александрович**, к.б.н.;

eLibrary SPIN: 7182-1120

**Коваль Ольга Александровна**, д.б.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7788-2249>;

eLibrary SPIN: 4227-8496

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## AUTHORS' INFO

\* **Anna A. Nushtaeva**, Cand. Sci. (Biol.);

address: 8 Lavrentiev Avenue, Novosibirsk 630090, Russia;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9367-807X>;

eLibrary SPIN: 7964-9774;

e-mail: nushtaeva.anna@gmail.com

**Mariya M. Abdurakhmanova**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6557-553X>;

eLibrary SPIN: 6160-7608

**Mikhail S. Ermakov**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7107-4187>;

eLibrary SPIN: 7929-4095

**Vladimir A. Richter**, Cand. Sci. (Biol.);

eLibrary SPIN: 7182-1120

**Olga A. Koval**, Dr. Sci. (Biol.);

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7788-2249>;

eLibrary SPIN: 4227-8496