

## КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ИЗМЕНЯЮТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГОРМОНАЛЬНЫМ И РОСТОВЫМ СТИМУЛАМ ПРИ 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© 2022 г. А. А. Нуштаева<sup>1, \*</sup>, М. М. Савинкова<sup>1, 2</sup>, М. С. Ермаков<sup>1</sup>, М. Е. Варламов<sup>1, 2</sup>, Д. Д. Новак<sup>1, 2</sup>,  
В. А. Рихтер<sup>1</sup>, О. А. Коваль<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

\*E-mail: nushtaeva.anna@gmail.com

Поступила в редакцию 25.03.2022 г.

После доработки 21.04.2022 г.

Принята к публикации 22.04.2022 г.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании формирования и роста моно- (3D) и гетерогенных (3D-2) сфероидов на основе комбинации опухолевых и стромальных клеток, имитирующих три типа РМЖ: ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> и ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup> при воздействии 17-β эстрадиола (E2) и TGFβ. Линии опухолевых клеток РМЖ MCF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3 использовали в качестве моделей для формирования 3D-культур и фибробласты здоровой ткани молочной железы BN120f для формирования соответствующих гетерогенных 3D-2 культур. Предложены единообразные условия 3D-культивирования всех трех культур клеток РМЖ, позволяющие получать пролиферирующие сфероиды. При смешивании опухолевых клеток и здоровых фибробластов в соотношении 1 : 4 внутреннее ядро формировали фибробласты, а эпителиальные опухолевые клетки образовывали внешний слой 3D-2-структур. Морфологический анализ сфероидов показал, что при таком со-культивировании опухолевых и здоровых клеток в модели 3D-2 формируются более округлые и структурированные сфероиды по типу самоорганизации в микроткань в сравнении с моно-культивированием опухолевых клеток в 3D-модели. Установлено, что E2 стимулирует пролиферацию клеток в составе сфероидов 3D и 3D-2 вне зависимости от имитации типа РМЖ входящих в них опухолевых клеток, тогда как при культивировании в 2D-модели клетки MDA-MB-231 не чувствительны к 17β-эстрадиолу. В составе сфероидов клетки MDA-MB-231 утрачивали, а SK-BR-3 приобретали чувствительность к пролиферативному воздействию TGFβ. Таким образом, показано, что клеточные 3D- и 3D-2-модели РМЖ являются важным инструментом при изучении опухолевой прогрессии и востребованы при тестировании новых противоопухолевых подходов, несмотря на существующие 2D-модели.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, 17-β эстрадиол, трансформирующий фактор роста бета (TGFβ), рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2), опухолевые клетки, фибробласты, клеточные линии, 3D культуры клеток

**DOI:** 10.31857/S0041377122040046

Рак — одна из ведущих причин смерти взрослого населения в мире, которая в 2020 г. унесла жизни почти 10 млн человек (Ferlay et al., 2021). В 2020 г. лидером по выявлению новых случаев заболевания (2.26 млн. случаев) был рак молочной железы (РМЖ), что делает его исследование актуальной биомедицинской проблемой. РМЖ — это гетерогенное заболевание как на гистологическом, так и на молекулярном уровне, опухолевые образования которого состоят из генетически измененных опухоле-

вых клеток, взаимодействующих с нормальными и ассоциированными с опухолью фибробластами, эндотелиальными клетками, перидитами и иммунными клетками (Fouad, Aanei, 2017). Разделение на определенные типы РМЖ проводят на основании экспрессии ключевых молекулярных маркеров — рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2) (Zubair et al., 2021).

Развитие РМЖ часто связано с нарушением регуляции биосинтеза гормонов и факторов роста. Гормоны эстрогенового ряда, такие как 17-β эстрадиол (E2), способны ингибировать апоптоз в клетках гормон-зависимого РМЖ и играют ключевую роль в его прогрессировании (Fernando, Wimalasena, 2004). E2 играет важную роль в регуляции физиологических

**Принятые сокращения:** E2 — 17-β эстрадиол; РМЖ — рак молочной железы; EGF и EGFR — эпидермальный фактор роста и рецептор EGF соответственно; HER2 и HER3 — рецептор эпидермального фактора роста 2-го и 3-го типа соответственно; TGFβ — трансформирующий фактор роста бета.

процессов как у женщин, так и у мужчин, и вовлечен в патологии молочной железы (Acconcia, Marino, 2011; Fernando, Wimalasena, 2004). Для опухолевых клеток молочной железы, которые экспрессируют ER, гормоны эстрогенового ряда способствуют развитию и прогрессированию РМЖ, стимулируют инвазию и метастазирование опухолевых клеток в отдаленные органы или лимфатические узлы (Park et al., 2016). Поэтому терапия, направленная на ингибирование активации ER, достаточно успешна в клинике. В то же время показано, что терапевтическое блокирование активации ER является стрессовым фактором, способствующим сильным компенсаторным механизмам, в том числе в раковых клетках (Suba, 2020). В случае, когда передача сигналов через ER полностью подавлена, опухолевые клетки демонстрируют неконтролируемую пролиферацию, и может наблюдаться рост опухоли (Suba, 2020). Таким образом, взаимосвязь функционального состояния ER и опухолевой прогрессии при РМЖ очевидна.

Трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) является важнейшей сигнальной молекулой иммунной системы, он регулирует генерацию и эффекторные функции многих типов иммунных клеток (Sanjabi et al., 2017). В микроокружении опухоли он оказывает выраженное иммуносупрессивное действие, и его повышенное содержание коррелирует с плохим ответом на иммунотерапию. Реакцией большинства клеток взрослого организма на стимуляцию TGF- $\beta$  является активация пролиферации, дифференцировки, адгезии, метаболических изменений и клеточной гибели (Battlé, Massagué, 2019). TGF- $\beta$  функционирует как опухолевый супрессор, который может индуцировать апоптоз в пред-злокачественных клетках и подавлять пролиферацию в клетках карциномы. Однако клоны раковых клеток, которые инактивируют или изменяют путь TGF- $\beta$ , могут использовать коммуникацию с помощью TGF- $\beta$  для опухолевой прогрессии, в том числе при развитии РМЖ (Tian, Schiemann, 2017). Все эти данные указывают на важность исследования влияния E2 и TGF- $\beta$  на развитие и прогрессирование опухолевых клеток при РМЖ.

2D- и 3D-клеточные модели онкологических заболеваний позволяют осуществлять функциональное профилирование опухолей и выявлять молекулярные и клеточные ансамбли, участвующие в патогенезе (Jo et al., 2018; Weiswald et al., 2015). 2D-культивирование имеет много ограничений из-за того, что клетки в 2D-модели не могут воспроизвести архитектуру и функциональные особенности тканей *in vivo* (Costa et al., 2016). Исследования последних лет показывают способность 3D-культур поддерживать особенности молекулярного фенотипа опухолевых клеток, которые наблюдаются в условиях *in vivo*, и такие модели позволяют оценивать действие гормонов и ростовых факторов в опухолевой прогрессии (Weiswald et al., 2015). 3D-культуры по сравнению с культурами 2D дают возможность моделировать мно-

гоклеточное микроокружение опухоли, более полно отражая ее индивидуальные особенности и оценивать пролиферацию и дифференцировку клеток, анализировать ответы на стимулы, выявлять особенности метаболизма лекарств и т.д. (Antoni et al., 2015).

Трехмерные модели РМЖ обеспечивают как этические, так и экономические преимущества при прогностической оценке ответа опухоли на лечение, например, химио- и таргетную терапию, устраняя разрыв между 2D-культурами и исследованиями *in vivo* на животных, тем самым сокращая количество животных, умерщвляемых в доклинических исследованиях (Langhans, 2018). Однако большинство современных 3D-моделей состоят только из одного типа клеток, в то время как для физиологической релевантности модель должна также учитывать сложные межклеточные взаимодействия в микроокружении опухоли и быть гетерогенной, то есть содержать не только опухолевые клетки. Гетерогенные 3D сфероиды, сформированные опухолевыми и стромальными клетками, далее называются 3D-2-сфероиды по аналогии с моделями, описанными в литературе (Osswald et al., 2019). 3D-2 является наиболее репрезентативной моделью опухоли, в которой может происходить взаиморегуляция метаболических процессов при паракринной секреции цитокинов и факторов роста клетками с различным гистологическим происхождением.

В настоящей работе в качестве опухолевых клеток для формирования 3D-культур использовали иммортализованные культуры РМЖ: клетки гормон-зависимой аденокарциномы MCF7, клетки гормон-независимой HER2-положительной аденокарциномы SK-BR-3 и трижды негативной аденокарциномы MDA-MB-231. Первичную клеточную культуру фибробластов BN120f, полученную из ткани здоровой молочной железы использовали для создания 3D-2-модели РМЖ. Основная задача исследования заключалась в сравнении пролиферативного ответа на стимуляцию E2 и TGF- $\beta$  в клеточных моделях 2D, 3D и 3D-2 на основе опухолевых клеток, имитирующих три типа РМЖ (ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup> и ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Реактивы и материалы.** Использовали следующие реактивы: культуральные среды Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) и Leibovitz's L-15 (L-15), эмбриональная бычья сыворотка (FBS), раствор антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицин сульфат, амфотерицин) и TrypLE<sup>TM</sup> Express Enzyme (GIBCO, Life Technologies, США), GlutaMAX<sup>TM</sup> (GIBCO, Invitrogen, Франция), зеоцин (Thermo Fiesher, США), натрий-фосфатный буфер (PBS), бычий сывороточный альбумин (BSA; Amresco, США), Trypan Blue Stain 0.4% (Logos Biosystems, Южная Корея), B-27<sup>TM</sup> Plus Sup-

**Таблица 1.** Характеристика опухолевых клеток

Клетки, 2D-модели	Гормональный статус	Наличие рецепторов факторов роста	Тип РМЖ
MCF7	Гормон-зависимая	HER2 <sup>-</sup> /HER3 <sup>-</sup> /EGFR <sup>-</sup>	Люминальный тип А
MDA-MB-231	Гормон-независимая	HER2 <sup>-</sup> /HER3 <sup>-</sup> /EGFR <sup>+,-</sup>	Трижды негативный тип
SK-BR-3	Гормон-независимая	HER2 <sup>high</sup> /HER3 <sup>-</sup> /EGFR <sup>+</sup>	Тип HER2

plement, рекомбинантный белок человека FGF-basic (LifeTechnologies, США), EGF человека, инсулин человека, 17- $\beta$ -эстрадиол, трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ) (Sigma-Aldrich, Германия), (Amresco, США), гистологический гель Tissue-Tek O.C.T. Compound (Electron Microscopy Sciences, США), монтирующая среда для гистологических препаратов Витрогель, гематоксилин и эозин водно-спиртовой концентрированный (Biovitrum, Россия); флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (ТРР, Швейцария), 96-луночные планшеты с U-образными лунками (Thermo Scientific, Япония), электронные планшеты E-plate RTCA (ASEA Biosciences, США).

**Оборудование.** Использовали центрифугу Minispin (Eppendorf, Германия), CO<sub>2</sub>-инкубатор (Heraeus, Германия), инвертированный микроскоп Axio Scope 2 Plus (Carl Zeiss, Германия) и Eclipse Ti2 (Nikon Corporation, Япония), криотом NX 70 (Thermo FS, Германия) и систему iCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA; ASEA Biosciences, США).

**Клетки и культивирование.** В качестве опухолевых клеток для формирования сфероидов 3D-культур (моно-культивирование) использовали иммортализованные коллекционные культуры: клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MCF7, клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, любезно предоставленную С.М. Деевым (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва), клеточную линию аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (Российская коллекция клеточных культур, ЦВТ ХИМРАР, Москва) и эмбриональные клетки надпочечников человека НЕК-293Т (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) для сборки вирусных частиц и проведения трансдукции. В табл. 1 приведена сводная характеристика опухолевых клеток по экспрессии рецепторов фактора роста и гормонального статуса. В качестве модели стромальных клеток для последующего получения гетерогенных моделей 3D-2 использовали первичную культуру фибробластов BN120f, полученную из здоровой ткани молочной железы по методологии, описанной ранее (Nushtaeva et al., 2018).

Клетки линии MCF7 и BN120f культивировали в среде IMDM, клетки линии MDA-MB-231 – в среде L-15, клетки линии SK-BR-3 и НЕК-293Т – в среде

DMEM/F-12, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco™, США), 2 мМ L-глутамин, раствор антибиотиков-антимикотиков (100 ед/мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицин).

Клетки снимали с подложки с помощью TripLE™ при достижении монослоя, открепленные клетки разбавляли полной ростовой средой в соотношении объемов 1 : 3–1 : 4 для продолжения культивирования. Все клетки культивировали в условиях стандартной влажности при температуре 37.0 ± 1.0°C в атмосфере CO<sub>2</sub> (5.0 ± 0.5%).

Культивирование сфероидов проводили при стандартных условиях в планшетах с U-образным дном Nunclon™ Sphera (Thermo Scientific™, Япония) в питательной среде DMEM/F-12 в присутствии EGF (20 нг/мл), bFGF (20 нг/мл), инсулина (5 мкг/мл), 2% B27 и 0.4% BSA (Yuan, 2011). Формирование и культивирование сфероидов проводили в двух режимах – моно-культивирования (3D), при котором сфероид формировался только из культур опухолевых клеток (10<sup>3</sup> клеток на 1 лунку) и со-культивирования опухолевых и стромальных клеток (3D-2; соотношение клеток на 1 лунку 1 : 1 или 1 : 4 клеток).

**Получение лентивирусных частиц и трансдукция эукариотических клеток для получения линий, продуцирующих флуоресцентные белки mKate2 и eGFP.** Сборку вирусных частиц, псевдотипированных поверхностным белком G вируса везикулярного стоматита (VSV), проводили в клетках линии НЕК-293Т, используя стандартный протокол кальций-фосфатной трансфекции (Kingston et al., 2003). В качестве лентивирусного вектора использовали систему из трёх плазмид: psPAX2 (12260; Addgene, США) – пакующий вектор; pMD2.G (12259; Addgene, США) – вектор оболочки, и векторные лентивирусные плазмиды с необходимым для встройки геном: CDH-EF1a-Luc2-IRES-mKate2, кодирующая флуоресцентный белок mKate2 ( $\lambda_{Ex}$  = 588 нм,  $\lambda_{Em}$  = 633 нм), или pLVX-CMV-Fluc-P2A-EGFP-PGK-Puro, кодирующая зеленый флуоресцентный белок eGFP ( $\lambda_{Ex}$  = 488 нм,  $\lambda_{Em}$  = 509 нм). Клетки НЕК-293Т заранее рассаживали в лунки 6-луночного планшета. Векторные плазмиды psPAX2, pMD2.G, CDH-EF1a-Luc2-IRES-mKate2 (или pLVX-CMV-Fluc-P2A-EGFP-PGK-Puro) инкубировали с буфером HBS (50 мМ Hepes, 10 мМ KCl, 12 мМ декстрозы, 1.5 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 280 мМ NaCl, pH 7.05 ± 0.05). Полученный раствор добавляли по каплям к растущим клеткам НЕК-293Т. Через 48 ч куль-

туральную среду от клеток НЕК-293Т пропускали через фильтр с размером пор 0.45 мкм. Вирусные частицы концентрировали центрифугированием при 20000 g в течение 90 мин при 4°C (Simmons, Alberola-Ila, 2016). К осадку вируса добавляли 100 мкл культуральной среды, инкубировали 40 мин при 4°C, периодически перемешивая, после чего добавляли вирус к клеткам MCF7, SK-BR-3 и MDA-MB-231, растущим в 24-луночных планшетах, добавляли среду с концентрированным вирусом в присутствии полибрена (8 мкг/мл). Планшет с клетками центрифугировали 40 мин при 37°C, после чего клетки с вирусом инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях. Через 48 ч после трансдукции к клеткам добавляли антибиотик пурамицин (1 мкг/мл) для селекции клеток, экспрессирующих целевые нуклеотидные последовательности и продолжали культивирование. Эффективность селекции оценивали методом флуоресцентной микроскопии.

**Морфологический анализ 3D-моделей опухолевых сфероидов и 3D-2-моделей опухолево-стромальных сфероидов.** Микроскопический анализ формирования и роста сфероидов проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения NIS-Elements. Размеры сфероидов высчитывали по формуле объема сферы  $V = 0.5LIW^2$ , где  $L$  определяется как диаметр, соединяющий пару самых дальних точек на контуре сфероида, а  $W$  – наибольший диаметр, перпендикулярный  $L$  (Chen et al., 2014). По полученным данным строили гистограммы роста сфероидов.

Для гистологического анализа сфероиды 3D-культур и гетерогенных 3D-2-культур РМЖ заключали в гистологический водорастворимый реагент гель Tissue-Tek O.C.T. Compound (Electron Microscopy Sciences, США) на основе гликоля и смол, создающий идеальную среду для заморозки тканей и приготовления криосрезов на криотомах. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на криотоме NX 70 (Thermo FS, Германия), окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной схеме. Окрашенный срез заключали в монтирующую среду для гистологических препаратов Витрогель (Biovitrum, Россия). Окрашенные срезы визуализировали с использованием микроскопа Axio scope 2 Plus (Carl Zeiss, GmbH).

**Определение жизнеспособности клеток в режиме реального времени на системе iCELLigence.** Клетки ( $3 \times 10^6$  на 1 флакон) выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> в стандартных условиях. Клетки прикрепляли от подложки с помощью TripLE™. Пролиферацию и жизнеспособность клеток контролировали в режиме реального времени через систему iCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA) (ASEA Biosciences), которая позволяет исследовать динамику роста адгезивных культур клеток в режиме реального времени по описанной ранее методологии (Koval et al., 2015). Действие прибора

основано на том, что в подложку E-plate для роста клеток встроены электроды, и присутствие клеток на поверхности электродов влияет на локальное сопротивление на границе электрода с раствором: чем больше клеток прикрепляется к электродам, тем выше будет сопротивление. Сопротивление является измеряемой величиной (Cell Index, CI) при оценке скорости пролиферации, числа клеток, изменения морфологии и жизнеспособности клеток. Клеточный индекс (CI) рассчитывали для каждой лунки E-планшета с помощью программного обеспечения RTCA 1.2 (Roche Diagnosis, Франция). Кривые роста были сгенерированы в реальном времени из системы iCELLigence.

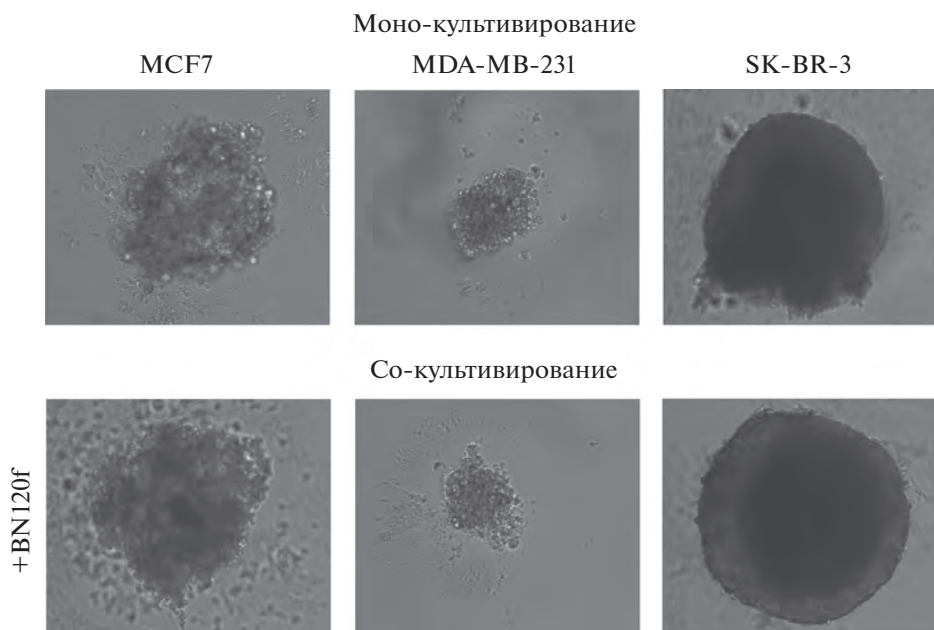
Клетки высаживали (30 тыс. клеток на 1 лунку) на 8-луночные E-plate со встроеной матрицей микроэлектронных датчиков в общем объеме 500 мкл полной культуральной среды. На первом этапе эксперимента измеряли 100 мкл полной культуральной среды для анализа фона.

**Статистическая обработка.** Обработку полученных результатов проводили в программе STATISTICA 10.0. Для определения групповых средних и ошибок среднего использовали описательную статистику (Descriptive statistic). Данные по изменению объема опухолевых сфероидов анализировали с использованием Repeated Measures ANOVA с градациями факторов “экспериментальное воздействие” (стимуляция трансформирующим фактором роста бета (TGF-β), E2 или отсутствие стимуляции) с последующей оценкой межгрупповых различий с помощью апостериорного критерия (Post-hoc) Ньюмана-Кейлса (Newman-Keuls test).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфологический анализ моделей 3D и 3D-2 РМЖ.** Перекрестное взаимодействие между опухолевыми клетками и фибробластами в микроокружении опухоли влияет на секрецию факторов роста и цитокинов (хемокинов), которые, в свою очередь, поддерживают рост или жизнеспособность опухолевых клеток, индуцируют неоваскуляризацию и иммуносупрессию клеток в микроокружении при РМЖ (Majety et al., 2015). Чтобы понять механизмы, лежащие в основе перекрестного взаимодействия между опухолевыми клетками и фибробластами *in vitro*, необходима система совместного культивирования, в которой опухолевые клетки могут взаимодействовать с фибробластами, подобно взаимодействию *in situ*.

Для получения 3D и гетерогенных 3D-2-моделей РМЖ использовали пластик с низкими адгезивными свойствами и среду DMEM/F12 с добавлением ростовых факторов, как указано в разделе “Материал и методика”. На рис. 1 представлены фотографии полученных сфероидов в проходящем свете на 10-е сут культивирования. Наиболее крупные сфероиды с



**Рис. 1.** Сравнительный анализ размеров, формы и плотности сфероидов РМЖ трех клеточных линий, культивируемых в режиме моно-культивирования (3D) и со-культивирования с фибробластами (3D-2). 10-е сут культивирования. Микроскопия в проходящем свете. Увел. об.: 10×.

четкой границей были сформированы клетками культуры SK-BR-3. Уплотнение в центре сфероидов указывало на наличие некротического ядра. Самые мелкие сфероиды были получены из клеток культуры трижды негативного РМЖ MDA-MB-231 и были представлены в виде организованного сфероидов из клеток-колоний. Размер сфероидов из клеток гормон-зависимой культуры MCF7 был сопоставим с размером сфероидов, сформированных клетками культуры SK-BR-3, но не имел четко очерченной границы и плотного некротического ядра.

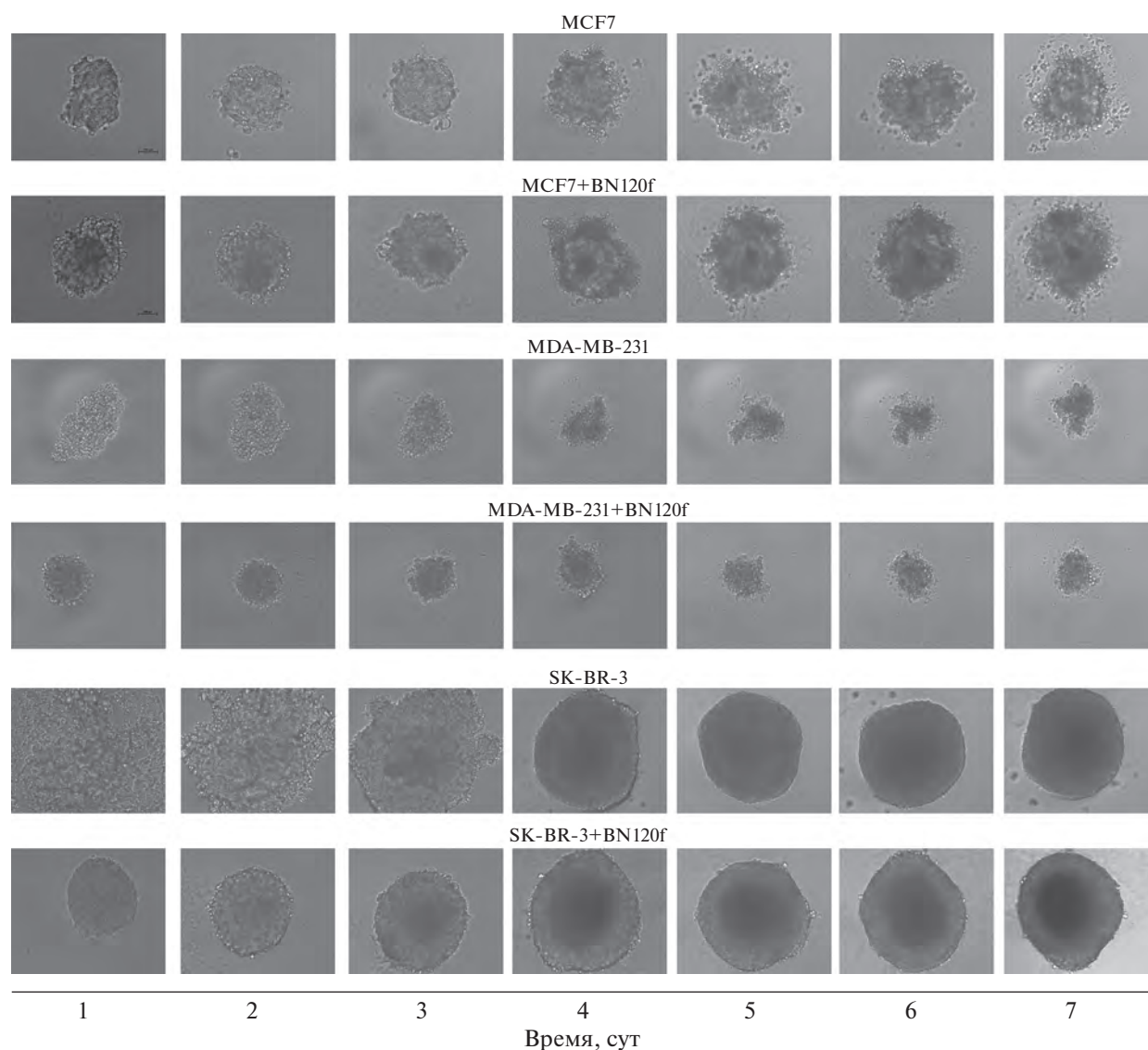
При добавлении фибробластов BN120f к опухолевым клеткам и последующем со-культивировании тенденция к различию размеров сфероидов сохранялась: самыми крупными оставались сфероиды из клеток SK-BR-3, а самыми мелкими — MDA-MB-231. Можно предположить, что опухолевые клетки с высокой скоростью пролиферации вносят основной вклад в размер сфероидов, тогда как медленно пролиферирующие здоровые клетки BN120f растут с одинаковой скоростью в составе различных культур 3D-2 (рис. 1).

Динамика изменений морфологии сфероидов 3D и 3D-2 показала, что добавление фибробластов к опухолевым клеткам в модели 3D-2 ведет к более раннему формированию плотных структур с более округлой формой, чем при моно-культивировании в режиме 3D (рис. 2, со-культивирование с BN120f). Для клеток SK-BR-3 этот эффект был отмечен на ранних стадиях культивирования (1–3 сут), а для клеток MDA-MB-231 — на протяжении всего наблюдения (7 сут).

Для визуализации взаимного расположения опухолевых и стромальных клеток в сфероидов были получены линии опухолевых клеток MCF7, SK-BR-3 и MDA-MB-231, стабильно экспрессирующие красный флуоресцентный белок mKate2 (рис. 3). Фибробласты BN120f экспрессировали зеленый флуоресцентный белок eGFP (рис. 3). При смешивании опухолевых клеток и здоровых фибробластов в соотношении 1 : 4 внутренней каркас формировали фибробласты, а эпителиальные опухолевые клетки образовывали внешний слой 3D-2-структур (рис. 4). Формирование внутреннего каркаса из фибробластов не зависело от типа используемых опухолевых клеток.

Анализ препаратов образцов сфероидов, окрашенных гематоксилин-эозином, показал, что при со-культивировании опухолевых и стромальных клеток в модели 3D-2 происходит формирование внутренних стромальных прослоек среди эпителиальных долек, подобных строению опухолевой ткани РМЖ *in vivo* (рис. 5). Можно видеть, что сфероиды SK-BR-3 формируют более плотные межклеточные контакты как в случае моно-культивирования, так и в модели 3D-2. В случае культуры MDA-MB-231 добавление фибробластов к опухолевым клеткам в 3D-2-модели ведет к уплотнению межклеточных контактов с прослойкой стромальных клеток (рис. 5).

**Пролиферация клеток РМЖ в двумерной (2D) модели при воздействии гормоном E2 и фактором роста TGF-β.** Для анализа влияния экзогенных стимулов на пролиферацию клеток иммортализованных культур MCF7, SK-BR-3 и MDA-MB-231, а также клеток



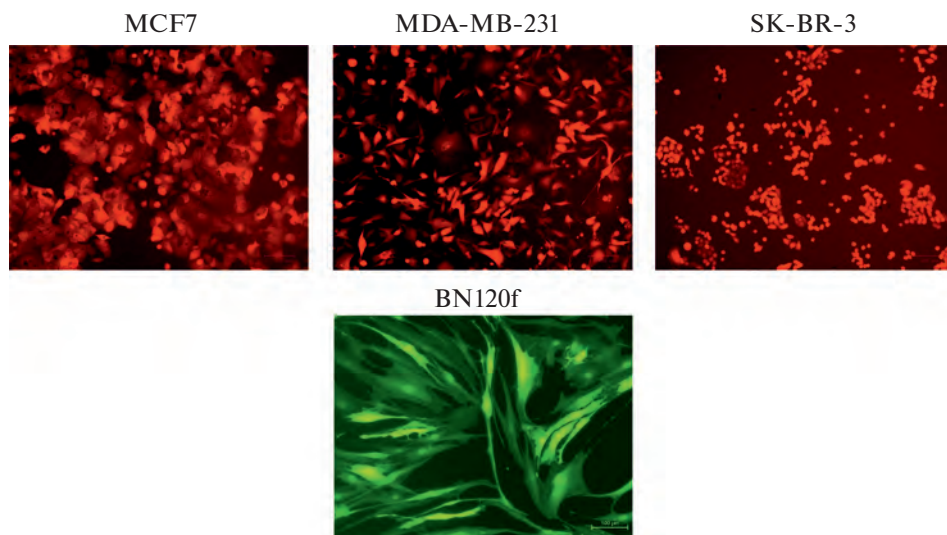
**Рис. 2.** Динамика роста сфероидов РМЖ трех клеточных линий при моно-культивировании (3D) и со-культивировании с фибробластами BN120f (3D-2). Данные ежедневного мониторинга в течение 7 сут культивирования. Микроскопия в проходящем свете. Увел. об.: 10×.

первичной культуры фибробластов, полученной из здоровой ткани молочной железы BN120f, проводили мониторинг роста клеток в режиме реального времени на приборе iCelligence. К клеткам, находящимся в логарифмической фазе роста добавляли E2 (1 нМ) или TGF- $\beta$  (5 нг/мл) и продолжали культивирование в стандартных условиях (Tian, Schiemann 2017). К контрольным образцам добавляли физиологический раствор. Величина клеточного индекса CI (Cell Index) отражает относительное количество клеток в лунке в каждый момент времени.

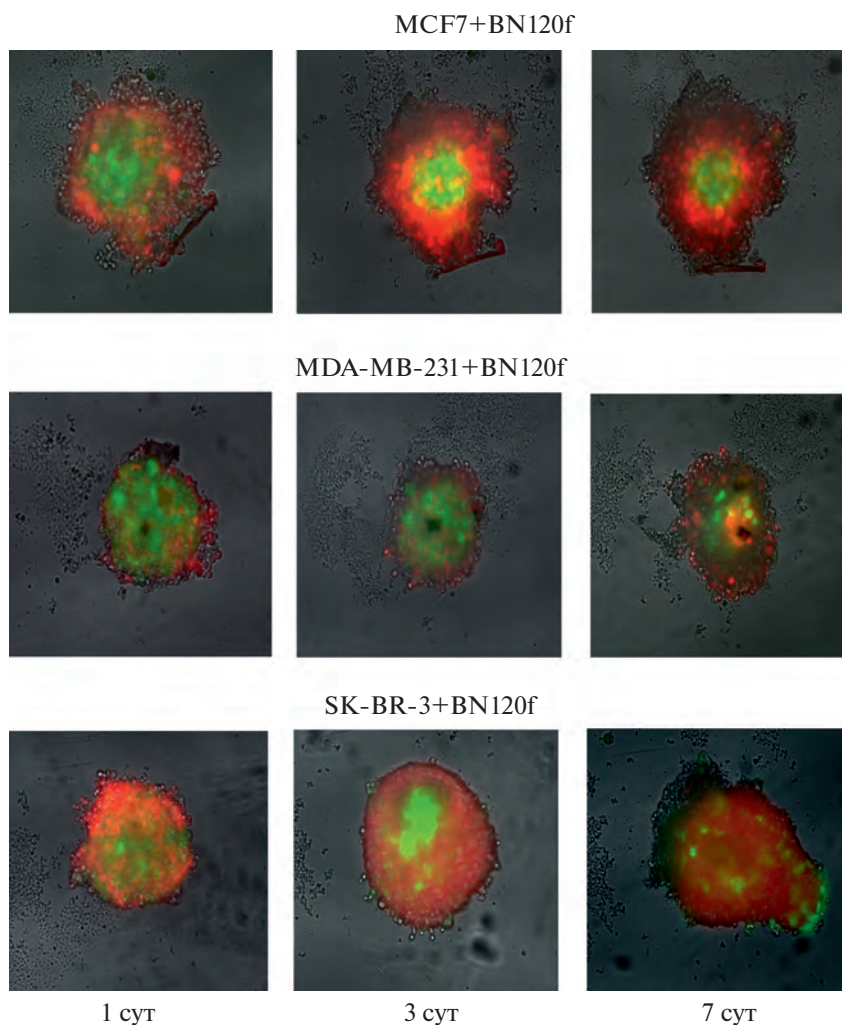
Можно видеть, что E2 оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию всех исследуемых клеток РМЖ — как гормон-зависимых, так и гормон-независимых (рис. 6). При этом минимальный стимули-

рующий эффект отмечен для клеток гормон-независимого типа MDA-MB-231. В то же время E2 не влияет на пролиферацию здоровых фибробластов BN120f.

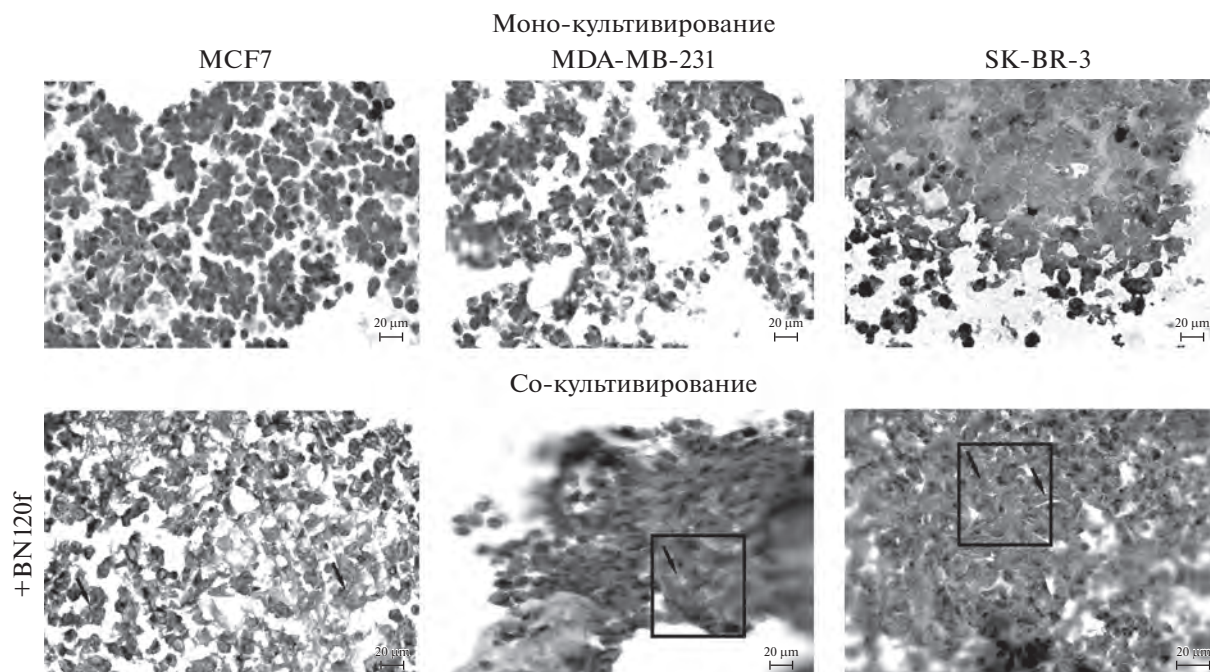
Существенную стимуляцию пролиферации оказывало добавление TGF- $\beta$  к клеткам трижды негативного типа РМЖ MDA-MB-231 — значение CI увеличилось в 4 раза по сравнению с контрольными клетками (рис. 6). В случае клеток MCF7 эффект усиления пролиферации под действием TGF- $\beta$  был непродолжительным (рис. 6), а в случае клеток SK-BR-3 (рис. 6) наблюдали незначительное снижение пролиферации. Таким образом, клетки гормон-зависимой линии РМЖ MCF7 и гормон-независимой SK-BR-3 менее чувствительны к TGF- $\beta$ . Пролифе-



**Рис. 3.** Репрезентативные изображения клеток трех клеточных линий РМЖ, продуцирующих красный флуоресцентный белок mKate2 и фибробластов BN120f, продуцирующих зеленый флуоресцентный белок eGFP. Увел. об.: 10×.



**Рис. 4.** Распределение опухолевых (красное свечение) и стромальных (зеленое свечение) клеток в гетерогенной модели 3D-2. Формирование сфероидов в течение 1, 3 и 7 сут культивирования. Увел. об.: 10×.



**Рис. 5.** Гистологические срезы сфероидов РМЖ трех клеточных линий при моно-культивировании (3D) и со-культивировании с фибробластами BN120f (3D-2) через 6 сут. Световая микроскопия. Окрашивание гематоксилин-эозином. Черным квадратом выделен участок формирования стромальной прослойки (стрелки). Увел. об.: 40×.

рация здоровых фибробластов BN120f незначительно усиливалась при добавлении TGF- $\beta$ .

Можно сделать вывод, что клетки, имитирующие гормон-зависимый тип РМЖ и тип HER2<sup>+</sup> более чувствительны к E2, а клетки трижды негативного РМЖ – к TGF- $\beta$  в используемых концентрациях.

**Пролиферация клеток в составе полученных моделей РМЖ 3D и 3D-2 при стимуляции E2 и TGF- $\beta$ .** Пролиферативную способность клеток в составе сфероидов оценивали по динамике изменения их размера, выраженного через изменение объема сфероида в процессе культивирования, предполагая, что увеличение объема сфероида отражает жизнеспособность делящихся клеток.

Формирование сфероидов анализировали каждые 24 ч на протяжении 9 сут. При анализе размеров сфероидов в первые и последние сут эксперимента и для оценки различий влияния стимулирующего фактора использовали *t*-критерий Стьюдента (рис. 7). Различия считали достоверно значимыми при  $P < 0.05$ . На рис. 7 представлены данные о размерах сфероидов при моно-культивировании (3D) и со-культивировании (3D-2) для культур опухолевых клеток MCF7, SK-BR-3 и MDA-MB-231 при стимуляции E2 и TGF- $\beta$ . Из представленных данных видно, что ни E2, ни TGF- $\beta$  не снижали жизнеспособности сфероидов в исследуемых моделях.

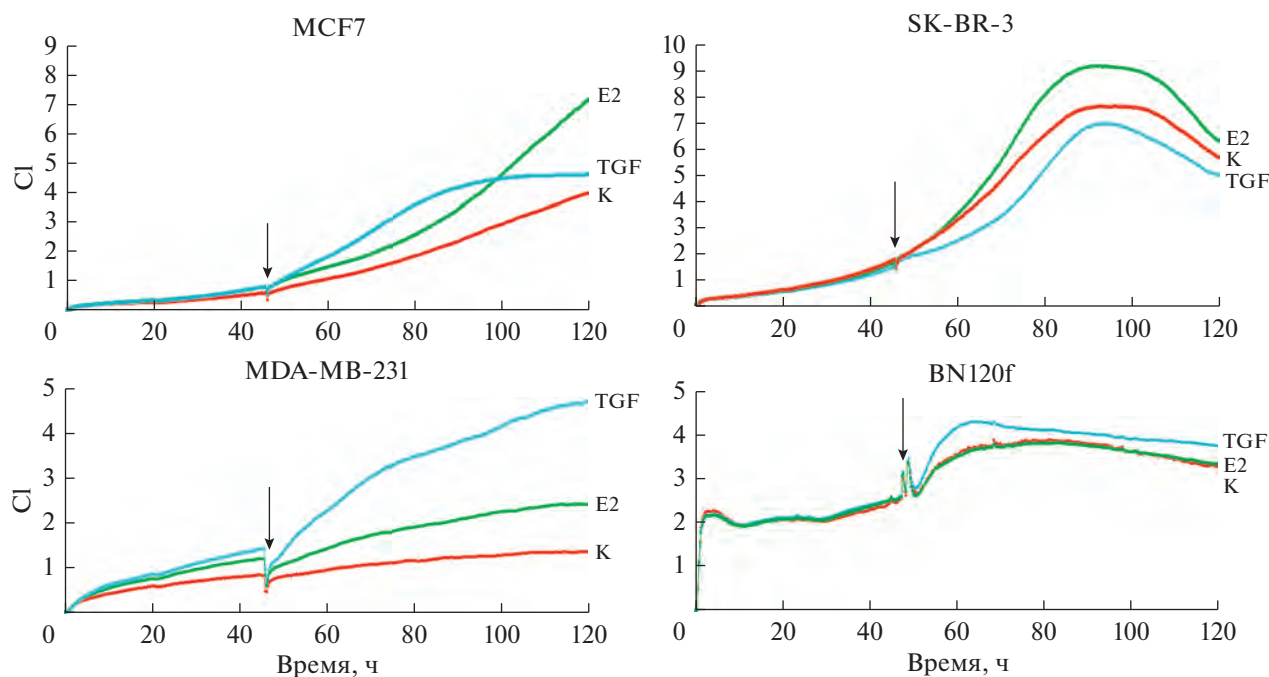
Мы обнаружили, что при стимуляции E2 происходит увеличение объема сфероидов как при моно-культивировании опухолевых клеток, так при со-

культивировании с фибробластами BN120f вне зависимости от использованных опухолевых клеток. Мы предполагаем, что положительный эффект E2 на рост сфероидов может объясняться тем, что E2 способствует самоорганизации сфероида на начальных стадиях. Добавление TGF- $\beta$  эффективно стимулировало рост сфероидов SK-BR-3 как при моно-культивировании, так и в режиме 3D-2-моделей, но не влияло на сфероиды MCF7 и MDA-MB231.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что вектор влияния E2 и TGF- $\beta$  на рост сфероидов при моно-культивировании сохраняется и при культивировании в формате 3D-2 культуры с фибробластами BN120f. Сравнение роста культур в режимах 2D- и 3D-культивирования опухолевых клеток при воздействии E2 и TGF- $\beta$  выявило различия и сходство в ответе на стимуляцию. Так, стимуляция 17 $\beta$ -эстрадиолом вела к увеличению пролиферации клеток как в составе 2D-, так и 3D-культур. Эффект от добавления TGF- $\beta$  различался для 2D и 3D культур: отсутствовала стимуляция роста MDA-MB-231 (рис. 7) и появлялась стимуляция роста клеток SK-BR-3 (рис. 7) в составе 3D-клеточных моделей.

Таким образом, мы показали, что стимуляция E2 опухолевых и опухолево-стромальных сфероидов ведет к увеличению их объема, что позволяет сделать вывод о позитивном влиянии гормонального фактора на жизнеспособность сфероидов как гормон-зависимых, так и гормон-независимых клеточных культур. Мы предполагаем, что положительный эффект стимуляции E2 сфероидов при моно-культивировании





**Рис. 6.** Влияния гормона E2 и TGF- $\beta$  на жизнеспособность клеток MCF7, SK-BR-3, MDA-MB-231 и BN120f (2D-модели) в режиме реального времени на приборе iCelligence. Через 48 ч после культивирования в стандартных условиях к клеткам добавляли 1 нМ/мл E2 или 5нг/мл TGF- $\beta$  (TGF) и продолжали культивирование. В качестве контроля использовали физиологический раствор. Представлены кривые пролиферации в режиме реального времени. Момент добавления препаратов обозначен стрелкой. CI (Cell Index) – относительная величина пролиферации клеток.

может объясняться тем, что 17 $\beta$ -эстрадиол способствует самоорганизации сфероидов. Кроме того, следует отметить, что ни E2, ни TGF- $\beta$  не снижали жизнеспособности сфероидов в исследуемых моделях.

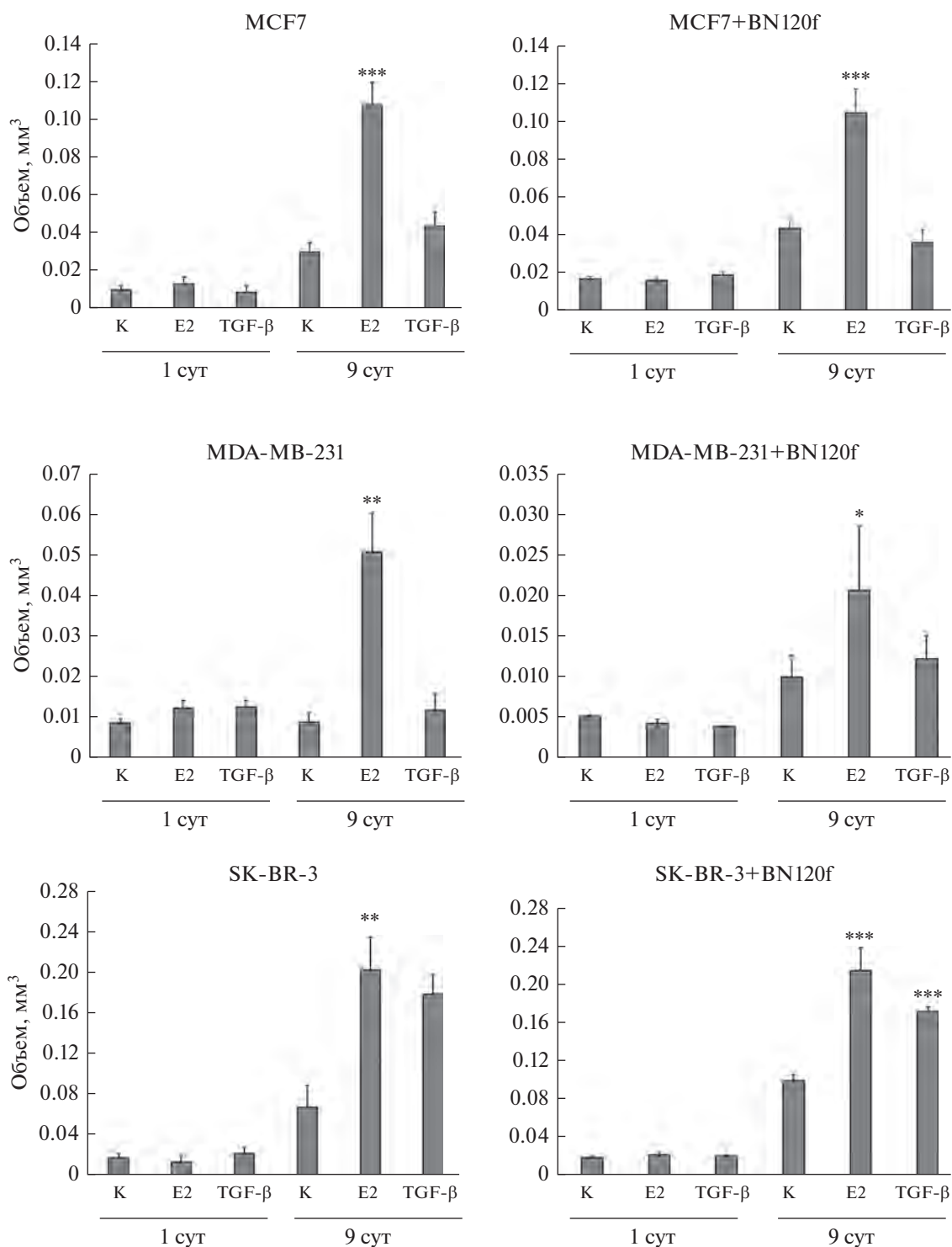
Более того, показано, что чувствительность опухолевых клеток в 2D- и 3D-моделях РМЖ по отношению к гормональным и ростовым стимулам отличается, что указывает на важность применения 3D-культур при тестировании опухолевых клеток на чувствительность к различным препаратам.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Создание 3D-клеточной модели РМЖ предполагает формирование близких к сферическим структур, представляющих собой самоорганизованные кластеры-колонии клеток с тканеподобной архитектурой (Weiswald et al., 2015). Разработка оптимизированного, воспроизводимого и дешевого метода получения 3D-сфероидов все еще является актуальной задачей. В нашей работе предложены единообразные условия 3D-культивирования для трех культур клеток РМЖ – MCF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3, позволяющие получать пролиферирующие сфероиды. Среди указанных линий, получение сфероидов клеток SK-BR-3 можно отнести к наиболее сложным задачам. Так, при сравнении 42-х методов получения сфероидов из тех же опухолевых клеток РМЖ (MCF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3) авторы отмечали значительные отличия способности к сферообразо-

ванию между ними (Froehlich et al., 2016). Культура клеток MCF7 позволяла получить сфероиды при всех исследуемых способах получения, клетки MDA-MB-231 формировали сфероиды только в одном случае – при наслоении клеток на 3.5%-ный матриксель, – а культура клеток SK-BR-3 не позволила получить сфероиды ни при каких из исследуемых условий (Froehlich et al., 2016). В другой работе (Boyer et al., 2021) авторам удалось получить 3D-культуру клеток SK-BR-3 при использовании культурального пластика Nunclon™ Sphera™ (Thermo Fisher Scientific, США), однако полученные структуры они описывали как рыхлые разветвленные агрегаты без четкой внешней границы. Поэтому предложенный в нашей работе метод получения крупных сфероидов SK-BR-3 с четкой округлой границей позволяет в дальнейшем воспроизводимо получать 3D модель SK-BR-3, а также формировать гетерогенные сфероиды на их основе.

Гетерогенные сфероиды, состоящие из опухолевых клеток и клеток, имитирующих опухоль-ассоциированные фибробласты, позволяют изучать взаимодействие опухоли с внеклеточным матриксом (Majety et al., 2015). Такие 3D-2-структуры также полезны для изучения побочных эффектов при химио- и радиотерапии, например, фиброза молочной железы, который является основным непрямым токсическим последствием радиотерапии при РМЖ (Yakovets et al., 2020). В нашей работе для получения гетерогенных 3D-2-моделей РМЖ, состоящих из



**Рис. 7.** Влияния E2 и TGF-β на размеры сфероидов РМЖ трех клеточных линий в модели 3D (левые гистограммы) и 3D-2 (со-культивирование с клетками BN120f, правые гистограммы) при стимуляции E2 и TGF-β в первые и девятые сутки культивирования. К – контроль. Результаты представлены как среднее значение и его ошибка. Различия достоверны при  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  и  $***P < 0.001$  по критерию Ньюман–Кеулса.

опухолевых клеток и фибробластов, мы использовали тот же метод, как и для 3D культур. Добавление фибробластов ускоряло процесс формирования опухолево-стромальных сфероидов, что согласуется с

данными из литературы (Yakavets et al., 2020; Pal, 2020), в которых показано, что добавление фибробластов MRC-5 или мезенхимальных стволовых клеток к клеткам MCF7 в условиях сферообразования

вело к получению более крупных и хорошо оформленных гетерогенных клеточных структур, когда опухолевые клетки формировали внешний слой, а внутреннее ядро формировали фибробласты. Эти данные согласуются с полученными нами результатами, демонстрирующими формирование фибробластами внутреннего ядра в гетерогенных сфероидов. Тем не менее, обнаруженного нами эффекта ускорения самоорганизации в плотные сфероиды при со-культивировании клеток SK-BR-3 и фибробластов ранее описано не было.

Мы показали, что стимуляция 17- $\beta$  эстрадиолом и TGF- $\beta$  по-разному влияла на пролиферацию клеток в 2D и 3D культурах одних и тех же линий. В 2D-культурах клетки, имитирующие гормон-зависимый тип РМЖ и тип HER2<sup>+</sup> были более чувствительны к E2, а клетки трижды негативного РМЖ – к TGF- $\beta$  в используемых концентрациях. Положительный эффект стимуляции E2 как сфероидов гормон-зависимых, так и гормон-независимых клеток MDA-MB-231 невозможно объяснить только наличием рецепторов и активацией рецептор-опосредованного механизма пролиферации. В случае сфероидов, наиболее вероятно, что E2 способствует их самоорганизации, формированию правильных межклеточных 3D-контактов и взаимобмену сигнальными молекулами. Такими сигнальными молекулами, стимулирующими клеточное деление, могут быть (в том числе) малые некодирующие РНК, выполняющие функции активаторов или ингибиторов экспрессии определенных генов. Известно, например, что miR-22 подавляет экспрессию ER $\alpha$  в опухолях молочной железы и стимулирует пролиферацию клеток в 3D-, но не в 2D-моделях (Vesuna et al., 2021). Экспрессия miR-203, напротив, характерна именно для ER-положительных опухолей молочной железы (Ru et al., 2011).

На основе данных по изменению транскриптома клеток MCF7 в составе 2D- и 3D-культуры в агарозном гидrogеле было показано, что добавление E2 к 3D-структурам приводило к активации не только известных эстроген-чувствительных генов, таких как рецептор прогестерона (PR), белок PDZK1, участвующий в метаболизме холестерина, и лиганд EGFR амфирегулин (AREG), но и множества других генов, в том числе генов, кодирующих белки адгезии, по сравнению с 2D-культурой (Vantangoli et al., 2016). Поэтому обнаруженные нами эффекты ставят новые научные задачи поиска межклеточных регуляторных молекул в 3D-культурах.

Другим важным фактором, влияющим на чувствительность опухолевых клеток в 2D- и 3D-культурах может быть гипоксия (Nushtaeva et al., 2019). При формировании крупных сфероидов изменяется градиент концентрации кислорода от наружных слоев клеток к внутренним, формируя в последних локальную гипоксию. Показано, что состояние гипоксии ведет к подавлению экспрессии рецепторов ER $\alpha$  в ER-положительных опухолях на примере линии клеток T47D (Whitman et al., 2019). Таким обра-

зом, целый ряд факторов может изменять чувствительность опухолевых клеток к гормональным стимулам в 3D-моделях опухолей молочной железы по сравнению с 2D-моделями помимо исходного рецепторного статуса. Учитывая стимулирующий эффект 17 $\beta$ -эстрадиола на рост 3D-культур РМЖ вне зависимости от рецепторного статуса, можно предположить, что адьювантная гормон-супрессирующая терапия, например, с использованием тамоксифена, может быть в некоторой степени полезна не только для гормон-зависимых типов РМЖ, но и для гормон-независимых.

Действие TGF- $\beta$  на пролиферацию клеток тоже различно для 2D- и 3D-культур: в составе клеточных моделей 3D отсутствовала стимуляция роста MDA-MB-231 и появлялась стимуляция роста клеток SK-BR-3. TGF- $\beta$  является лигандом для рецепторов семейства ErbB, к которым относятся HER2, HER3 и рецептор эпидермального фактора роста EGFR (Roskoski, 2014). Среди используемых в нашей работе клеточных линий РМЖ, клетки SK-BR-3 являются HER2-положительной культурой, а MDA-MB-231 высоко положительна по EGFR, и только линия клеток MCF7 негативна как по HER2, так и по EGFR (Brockhoff et al., 2001; Oh et al., 2015). В сравнении с TGF- $\beta$ , для которого не показана про-онкогенная роль на ранних стадиях опухолевой прогрессии, связывание лиганда EGF с рецептором EGFR выражено стимулирует про-онкогенную трансформацию, активируя митозы в большинстве типов клеток (Wee et al., 2015). В то же время для многих типов рака показано, что взаимная регуляция сигнальных путей TGF- $\beta$  и EGFR активирует опухолевую прогрессию: TGF- $\beta$  и EGF могут активировать злокачественный фенотип, действуя синергично (Richter et al., 2011). Показано, что TGF- $\beta$  в эпителиальных опухолевых клетках с экспрессией HER2/EGFR усиливает пролиферацию опухолевых клеток (Huang et al., 2021).

Таким образом, наиболее вероятно, что обнаруженная нами стимуляция роста HER2<sup>-</sup>/EGFR<sup>+</sup> клеток MDA-MB-231 при добавлении TGF- $\beta$  в 2D-модели и HER2<sup>+</sup>/EGFR<sup>+</sup> клеток SK-BR-3 в 3D-модели происходит в результате усложнения регуляторных механизмов сигнального каскада HER2/EGFR при формировании 3D-сфероидов. Отсутствие рецепторов HER2/EGFR в клетках MCF7 объясняет отсутствие чувствительности этих клеток к TGF- $\beta$  как в моделях 2D, так и 3D (Troitskaya et al., 2021).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-10039); работы по культивированию клеток BN120f выполнены в рамках проекта базового бюджетного финансирования Минобрнауки РФ (№ АААА-А17-117020210023-1).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕАТУРЫ

- Acconcia F., Marino M.* 2011. The effects of 17 $\beta$ -estradiol in cancer are mediated by estrogen receptor signaling at the plasma membrane. *Front. Physiol.* V. 2. P. eCollection 2011. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00030>
- Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G.* 2015. Three-dimensional cell culture: A breakthrough *in vivo*. *IJMS.* V. 16. P. 5517. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>
- Battle E., Massagué J.* 2019. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in immunity and cancer. *Immunity.* V. 50. P. 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>
- Boyer J.Z., Phillips G.D.L., Nitta H., Garsha K., Admire B., Kraft R., Dennis E., Vela E., Towne, P.* 2021. Activity of trastuzumab emtansine (T-DM1) in 3D cell culture. *Breast Cancer Res. Treat.* V. 188. P. 65. <https://doi.org/10.1007/s10549-021-06272-x>
- Brockhoff G., Hei P., Schlegel J., Hofstaedter F., Knuechel R.* 2001. Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and c-erbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells. *Cytometry.* V. 44. P. 338. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010801\)44:4<338::AID-CYTO1125>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010801)44:4<338::AID-CYTO1125>3.0.CO;2-V)
- Chen W., Wong C., Vosburgh E., Levine A.J., Foran D.J., Xu E.Y.* 2014. High-throughput image analysis of tumor spheroids: A user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. *JoVE.* P. 51639. <https://doi.org/10.3791/51639>
- Costa E.C., Moreira A.F., de Melo-Diogo D., Gaspar V.M., Carvalho M.P., Correia I.J.* 2016. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Advances.* V. 34. P. 1427. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002>
- Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F.* 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer.* V. 149. P. 778. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fernando R.I., Wimalasena J.* 2004. Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cells through inactivation of BAD: Ras-dependent nongenomic pathways requiring signaling through ERK and Akt. *Mol. Biol. Cell.* V. 15. P. 3266. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0823>
- Ferreira L.P., Gaspar V.M., Mano J.F.* 2018. Design of spherically structured 3D *in vitro* tumor models – advances and prospects. *Acta Biomater.* V. 75. P. 11. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.034>
- Fouad Y.A., Aanei C.* 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* V. 7. P. 1016.
- Froehlich K., Haeger J.-D., Heger J., Pastuschek J., Photini S.M., Yan Y., Lupp, A. Pfarrer, C., Mrowka R., Schlußner E., Markert U.R., Schmidt A.* 2016. Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* V. 21. P. 89. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2>
- Huang Y., Ognjenovic J., Karandur D., Miller K., Merk A., Subramaniam S., Kuriyan, J.* 2021. A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor. *eLife.* V. 10. P. e73218. <https://doi.org/10.7554/eLife.73218>
- Jo Y., Choi N., Kim K., Koo H.-J., Choi J., Kim H.N.* 2018. Chemoresistance of cancer cells: requirements of tumor microenvironment-mimicking *in vitro* models in anti-cancer drug development. *Theranostics.* V. 8. P. 5259. <https://doi.org/10.7150/thno.29098>
- Kingston R.E., Chen C.A., Rose J.K.* 2003. Calcium Phosphate Transfection. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* V. 63. P. 9.1.1–9.1.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0901s63>
- Koval O.A., Sakaeva G.R., Fomin A.S., Nushtaeva A.A., Semenov D.V., Kuligina E.V., Gulyaeva L.F., Gerasimov A.V., Richter V.A.* 2015. Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumor samples to new potential anticancer peptide lactaptin. *J. Cancer Res. Ther.* V. 11. P. 345. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.157301>
- Langhans S.A.* 2018. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front. Pharmacol.* V. 9. P. 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>
- Majety M., Pradel L.P., Gies M., Ries C.H.* 2015. Fibroblasts influence survival and therapeutic response in a 3D co-culture model. *PLoS One.* V. 10. P. e0127948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127948>
- Nushtaeva A.A., Karpushina A.A., Ermakov M.S., Gulyaeva L.F., Gerasimov A.V., Sidorov S.V., Gayner T.A., Yunusova A.Y., Tkachenko A.V., Richter V.A., Koval O.A.* 2019. Establishment of primary human breast cancer cell lines using “pulsed hypoxia” method and development of metastatic tumor model in immunodeficient mice. *Cancer Cell Int.* V. 19. P. 46. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0766-5>
- Nushtaeva A.A., Stepanov G.A., Semenov D.V., Juravlev E.S., Balahonova E.A., Gerasimov A.V., Sidorov S.V., Savelyev E.I., Kuligina E.V., Richter V.A., Koval O.A.* 2018. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. *BMC Cancer.* V. 18. P. 728. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4635-8>
- Oh S., Ju J., Yang W., Lee K., Nam K., Shin I.* 2015. EGFR negates the proliferative effect of oncogenic HER2 in MDA-MB-231 cells. *Archives Biochem. Biophys.* V. 575. P. 69. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.04.008>
- Osswald A., Hedrich V., Sommergruber W.* 2019. 3D-3 Tumor Models in Drug Discovery for Analysis of Immune Cell Infiltration. *Methods Mol. Biol.* V. 1953. P. 151–162. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7_10)
- Pal A., Ashworth J., Collier P., Probert C., Jones S., Pernaut Leza E., Meakin M., Ritchie A., Onion D., Clarke P., Allegrucci C., Grabowska A.* 2020. A 3D heterotypic breast cancer model demonstrates a role for mesenchymal stem cells in driving a proliferative and invasive phenotype. *Cancers (Basel).* V. 12. P. 2290. <https://doi.org/10.3390/cancers12082290>
- Park S.-J., Kim J.-G., Kim N.D., Yang K., Shim J.W., Heo K.* 2016. Estradiol, TGF- $\beta$ 1 and hypoxia promote breast cancer stemness and EMT-mediated breast cancer migration. *Oncol. Letters.* V. 11. P. 1895. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4115>

- Richter P., Umbreit C., Franz M., Berndt A., Grimm S., Uecke A., Böhrer F.D., Kosmehl H., Berndt A. 2011. EGF/TGFβ1 co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332: EGF/TGFβ1 co-stimulation of OSCC cells causes an EMT cell phenotype. *J. Oral Pathol. Med.* V. 40. P. 46.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00936.x>
- Roskoski R. 2014. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research.* V. 79. P. 34.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>
- Ru P., Steele R., Hsueh E.C., Ray R.B. 2011. Anti-miR-203 Up-regulates SOCS3 expression in breast cancer cells and enhances cisplatin chemosensitivity. *Genes Cancer.* V. 2. P. 720.  
<https://doi.org/10.1177/1947601911425832>
- Sanjabi S., Oh S.A., Li M.O. 2017. Regulation of the immune response by tgf-β: from conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* V. 9. P. a022236.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022236>
- Simmons A., Alberola-Ila J. 2016. Retroviral Transduction of T Cells and T Cell Precursors. *Methods Mol. Biol.* V. 1323. P. 99–108.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2809-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2809-5_8)
- Suba Z. 2020. Compensatory estrogen signal is capable of dna repair in antiestrogen-responsive cancer cells via activating mutations. *J. Oncol.* P. 1.  
<https://doi.org/10.1155/2020/5418365>
- Tian M., Schiemann W.P. 2017. TGF-β stimulation of EMT programs elicits non-genomic ER-α activity and anti-estrogen resistance in breast cancer cells. *JCMT.* V. 3. P. 150.  
<https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.38>
- Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. 2021. EGFR Transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells spheroids with partly loss of HER3 receptor. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22. P. 12937.  
<https://doi.org/10.3390/ijms222312937>
- Vantangoli M.M., Madnic, S.J., Wilson S., Boekelheide K. 2016. Estradiol exposure differentially alters monolayer versus microtissue MCF-7 human breast carcinoma cultures. *PLoS One.* V. 11. P. e0157997.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157997>
- Vesuna F., Lisok A., van Diest P., Raman V. 2021. Twist activates miR-22 to suppress estrogen receptor alpha in breast cancer. *Mol. Cell Biochem.* V. 476. P. 2295.  
<https://doi.org/10.1007/s11010-021-04065-w>
- Wee P., Shi H., Jiang J., Wang Y., Wang Z. 2015. EGF stimulates the activation of EGF receptors and the selective activation of major signaling pathways during mitosis. *Cellular Signalling.* V. 27. P. 638.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.11.030>
- Weiswald L.-B., Bellet D., Dangles-Marie V. 2015. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* V. 17. P. 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>
- Whitman N.A., Lin Z.-W., Kenney R.M., Albertini L., Lockett M.R. 2019. Hypoxia differentially regulates estrogen receptor alpha in 2D and 3D culture formats. *Archives Biochem. Biophys.* V. 671. P. 8.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.05.025>
- Yakavets I., Francois A., Benoit A., Merlin J.-L., Bezdetnaya L., Vogin G. 2020. Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study. *Sci. Rep.* V. 10. P. 21273.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78087-7>
- Yuan Y. 2011. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int. J. Oncol.*  
<https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1275>
- Zubair M., Wang S., Ali N. 2021. Advanced Approaches to breast cancer classification and diagnosis. *Front. Pharmacol.* V. 11. P. 632079.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.632079>

## Breast Cancer Cells in 3D Models Changes Their Response to Hormonal and Growth Factors

A. A. Nushtaeva<sup>a, \*</sup>, M. M. Savinkova<sup>a, b</sup>, M. S. Ermakov<sup>a</sup>, M. E. Varlamov<sup>a, b</sup>, D. D. Novak<sup>a, b</sup>, V. A. Richter<sup>a</sup>, and O. A. Koval<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

<sup>b</sup>*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

\*e-mail: nushtaeva.anna@gmail.com

The aim of this study was to investigate the formation and growth of mono- (3D) and heterogeneous (3D-2) spheroids consisting of stromal cells and tumor cells simulating three types of BC: ER<sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>; HER2<sup>+</sup>; ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup> including under exposure to 17-β estradiol and TGFβ. MCF7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 BC cell lines were used as a models for 3D cultures, and BN120f fibroblasts of healthy breast tissue were used for 3D-2 spheroids. In this work, we proposed uniform 3D culturing conditions for all three cultures of breast cancer cells, which produce proliferating spheroids. In 3D-2 structures the inner core was composed of fibroblasts while external layer was formed by epithelial cancer cells when tumor cells and fibroblasts were mix in in proportion 1 : 4. Morphological analysis of the spheroids showed that co-culture of tumor and stromal cells in 3D-2 model leads to the formation of more rounded and structured spheroids than in 3D monoculture, imitating self-organization into microtissue. It was found that 17β-estradiol stimulates cell proliferation in 3D and 3D-2 spheroids regardless tumor type simulation by cells used, whereas in the 2D model MDA-MB-231 cells are not sensitive to 17β-estradiol. Then incorporated into spheroids, MDA-MB-231 cells have lost the sensitivity to TGFβ while SK-BR-3 cells become TGFβ-sensitive. Thus, 3D and 3D-2 cell models of breast cancer are shown to be essential tools in studying tumor progression and important in testing new antitumor approaches, despite the existing 2D models.

**Keywords:** breast cancer, 17-β estradiol, transforming growth factor beta (TGFβ), epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), tumor cells, stromal cells, cell lines, 3D cell cultures