каждого подтипа, обосновывает применение монотипических сфероидов в качестве инструмента для скрининга стромально-ориентированных агентов, позволяющего селективно оценивать вклад конкретных цитокиновых осей в реализацию инвазивного фенотипа. Важно отметить, что проопухолевые черты могут быть присущи даже фибробластам из морфологически нормальной ткани (BN120f), что подчеркивает необходимость раннего таргетинга стромы. В перспективе функциональная классификация ОАФ на основе их секретома может стать основой для разработки новых прогностических биомаркеров (например, уровня G-CSF или HGF в плазме) и персонализированных терапевтических подходов. Нацеливание на специфические паракринные оси (например, HGF/c-Met, CXCR2-лиганды или G-CSF) в комбинации с традиционной терапией может позволить более эффективно нарушить критическое взаимодействие между опухолью и ее микроокружением (Ohshio et al., 2015; Chen, Song, 2019).

Ограничения исследования. Важным ограничением настоящей работы является *in vitro* характер модели, которая, хотя и воспроизводима, не полностью имитирует сложные межклеточные и биомеханические взаимодействия в нативной опухоли. Для трансляции полученных данных в клиническую практику необходимы: (1) оценка корреляции выявленных цитокиновых профилей с клинико-патологическими данными пациентов; (2) экспериментальная оценка прямого влияния кондиционированной среды от разных подтипов ОАФ на опухолевые клетки и иммунные клетки; (3) интеграция данных секретома с транскриптомными и протеомными профилями для создания комплексной карты функциональных состояний ОАФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Солидные опухоли с выраженным гиперфиброзом представляют собой серьёзную клиническую проблему, во многом обусловленную опухоль-ассоциированными фибробластами (ОАФ) — гетерогенным клеточным компонентом опухолевого микроокружения (Lv, He, 2024). Согласно современным представлениям, гетерогенность этой клеточной популяции имеет комплексную природу. Во-первых, ОАФ представляют собой гетерогенную популяцию клеток, происходящих из широкого спектра клеток, которые преимущественно обнаруживаются в различных солидных опухолях и активируются посредством множества сложных сигнальных путей (Ermakov et al., 2022). Во-вторых, дополнительный вклад в наблюдаемую гетерогенность могут вносить как межпациентная вариабельность, включающая локализацию опухоли, стадию и гистологический тип (Lv, He, 2024), и, в-третьих, технические различия в протоколах выделения и культивирования ОАФ в исследованиях (Mathieson et al., 2025).

Известно, что длительное культивирование может индуцировать фенотипический дрейф как клеточных линий, так и первичных культур, что требует тщательной валидации *in vitro* моделей (Carlson et al., 2009; Pan et al., 2009). Кроме того, ранее было признано, что ОАФ требуют детальной характеристики и исследования их способности поддерживать функции в культуре (Sahai et al., 2020). Несмотря на это, значительная часть исследований опирается на культивируемые клетки, которые остаются основным источником для изучения функций клеток и разработки лекарств. Вместе с тем, пан-канцерный single-cell анализ 226 образцов от пациентов с десятью типами солидных опухолей, убедительно показывает, что гетерогенность ОАФ имеет и глубинную биологическую природу, определяемую их клеточным происхождением и активационным статусом, а не сводится исключительно к артефактам культивирования (Luo et al., 2022).

В настоящей работе с использованием детально охарактеризованной панели культур ОАФ молочной железы показано, что монотипические сфероиды являются адекватной 3D-моделью опухолевого фиброзного очага, воспроизводящей функциональную гетерогенность стромы *in vitro*. Выявлены две принципиально различные стратегии пространственного поведения ОАФ — инвазивная диссеминация и коллективное удержание структуры, соответствующие подтип-специфичным функциям этих клеток. Профилирование секретома подтвердило и расширило функциональную классификацию линий, а также обнаружило проопухолевый фенотип фибробластов, выделенных из морфологически нормальной ткани молочной железы. Полученные данные обосновывают применение монотипических сфероидов в качестве инструмента для скрининга стромально-направленных агентов и подчеркивают необходимость раннего таргетирования стромы с учетом подтипового состава ОАФ. В перспективе функциональная классификация ОАФ на основе их секретома может стать основой для разработки прогностических биомаркеров и персонализированных антистромальных терапевтических стратегий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abdurakhmanova M. M., Ermakov M. S., Richter V. A., Koval O. A., Nushtaeva A. A.* 2022. The optimization of methods for the establishment of heterogeneous three-dimensional cellular models of breast cancer. Genes & Cells. Vol. 17. V 4. P. 91.
https://doi.org/10.23868/gc425244
2. *Abdurakhmanova M. M., Leonteva A. A., Vasilieva N. S., Kuligina E. V., Nushtaeva A. A.* 2025. 3D cell culture models: how to obtain and characterize the main models. Vavilov J. Genet. Breeding. V. 29. P. 175.
https://doi.org/10.18699/vjgb-25-21

3. *Alisafaei F., Mandal K., Saldanha R., Swoger M., Yang H., Shi X., Guo M., Hehnly H., Castaneda C.A., Janmey P.A., Patteson A.E., Shenoy V.B.* 2024. Vimentin is a key regulator of cell mechanosensing through opposite actions on actomyosin and microtubule networks. Commun. Biol. V. 7. P. 658.
https://doi.org/10.1038/s42003-024-06366-4

4. *Alkasalias T., Moyano-Galceran L., Arsenian-Henriksson M., Lehti K.* 2018. Fibroblasts in the tumor microenvironment: shield or spear? Int. J. Mol. Sci. V. 19. Art. ID: 1532.
https://doi.org/10.3390/ijms19051532

5. *Almazrouei K.M., Mishra V., Pandya H., Sambhav K., Bhavsar S.N.* 2025. Tumor microenvironment and its role in cancer progression: an integrative review. Cureus. V. 17. Art. ID: e92707.
https://doi.org/10.7759/cureus.92707

6. *Blondeel E., Peirsman A., Vermeulen S., Piccinini F., De Vuyst F., Estevao D., Al-Jamei S., Bedeschi M., Castellani G., Cruz T., Dedeyne S., Oliveira M.J., Kawakita S., Nguyen H.T., Kunz-Schughart L.A. et al.* 2025. The spheroid light microscopy image atlas for morphometrical analysis of three-dimensional cell cultures. Sci. Data. V. 12. P. 283.
https://doi.org/10.1038/s41597-025-04441-x

7. *Carlson M.A., Prall A.K., Gums J.J., Lesiak A., Shostrom V.K.* 2009. Biologic variability of human foreskin fibroblasts in 2D and 3D culture: implications for a wound healing model. BMC Res. Notes. V. 8. P. 229.
https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-229

8. *Chen X., Song E.* 2019. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. Nat. Rev. Drug Discov. V. 18. P. 99.
https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1

9. *Cheng P.S.W., Zaccaria M., Biffi G.* 2025. Functional heterogeneity of fibroblasts in primary tumors and metastases. Trends Cancer. V. 11. P. 135.
https://doi.org/10.1016/j.trecan.2024.11.005

10. *Costa A., Kieffer Y., Scholer-Dahirel A., Pelon F., Bourachot B., Cardon M., Sirven P., Magagna I., Fuhrmann L., Bernard C., Bonneau C., Kondratova M., Kuperstein I., Zinovyev A., Givel A.M. et al.* 2018. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. Cancer Cell. V. 33. P. 463.
https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.01.011

11. *Dalton C.J., Lemmon C.A.* 2021. Fibronectin: molecular structure, fibrillar structure and mechanochemical signaling. Cells. V. 10. Art. ID: 92443.
https://doi.org/10.3390/cells10092443

12. *Dillekas H., Rogers M.S., Straume O.* 2019. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? Cancer Med. V. 8. P. 5574.
https://doi.org/10.1002/cam4.2474

13. *Dinesh N.E.H., Campeau P.M., Reinhardt D.P.* 2022. Fibronectin isoforms in skeletal development and associated disorders. Am. J. Physiol. Cell Physiol. V. 323. P. 536.
https://doi.org/10.1152/ajpcell.00226.2022

14. *Dormand E.L., Banwell P.E., Goodacre T.E.* 2005. Radiotherapy and wound healing. Int. Wound J. V. 2. V. 112.
https://doi.org/10.1111/j.1742-4801.2005.00079.x

15. *Dvorak H.F.* 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N. Engl. J. Med. V. 315. P. 1650.
https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606

16. *Dvorak H.F.* 2015. Tumors: wounds that do not heal-redux. Cancer Immunol. Res. V. 3. Art. ID: 209.
https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0209

17. *Friedl P., Alexander S.* 2011. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. Cell. V. 147. P. 992.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016

18. *Guerrero-Barbera G., Burday N., Costell M.* 2024. Shaping oncogenic microenvironments: contribution of fibronectin. Front. Cell Dev. Biol. V. 12. Art. ID: 1363004.
https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1363004

19. *Gupta I., Hussein O., Sastry K., Bougarn S., Gopinath N.* 2023. Deciphering the complexities of cancer cell immune evasion: Mechanisms and therapeutic implications. Adv. Cancer Biol. Metastasis. V. 8. Art. ID: 100107.
https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2023.100107

20. *Ermakov M.S., Nushtaeva A.A., Richter V.A., Koval O.A.* 2022 Cancer-associated fibroblasts and their role in tumor progression. Vavilov J. Genet. Breeding. V. 26. P. 14.
https://doi.org/10.18699/VJGB-22-03.

21. *Hachey J. S., Viray T. D., Matasci M., Ravazza D., Neri D., Lewis J. S.* 2025. Targeting extra domain of fibronectin to improve noninvasive detection of triple-negative breast cancer. J. Nucl. Med. V. 66. P. 880. https://doi.org/10.2967/jnumed.124.268859

22. *Higuchi Y., Teo J. L., Yi D., Kahn M.* 2025. Safely targeting cancer, the wound that never heals, utilizing CBP/Beta-catenin antagonists. Cancers (Basel). V. 17 Art. ID: 1503. https://doi.org/10.3390/cancers17091503

23. *Hu D., Zhuo W., Gong P., Ji F., Zhang X., Chen Y., Mao M., Ju S., Pan Y., Shen J.* 2023. Biological differences between normal and cancer-associated fibroblasts in breast cancer. Heliyon. V. 9. Art. ID: e19803. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19803

24. *Ilyina A., Leonteva A., Berezutskaya E., Abdurakhmanova M., Ermakov M., Mishinov S., Kuligina E., Vladimirov S., Bogachek M., Richter V., Nushtaeva A.* 2025. Exploring the heterogeneity of cancer-associated fibroblasts via development of patient-derived cell culture of breast cancer. Int. J. Mol. Sci. V. 26. Art. ID: 7789. https://doi.org/10.3390/ijms26167789

25. *Ioachim E., Charchanti A., Briasoulis E., Karavasilis V., Tsanou H., Arvanitis D. L., Agnantis N. J., Pavlidis N.* 2002. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. Eur. J. Cancer. V. 38. P. 2362. https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)00210-1

26. *Kalluri R.* 2016. The biology and function of fibroblasts in cancer. Nat. Rev. Cancer. V. 16. P. 582. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73

27. *Korman B.* 2019. Evolving insights into the cellular and molecular pathogenesis of fibrosis in systemic sclerosis. Transl. Res. V. 209. P. 77. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.02.010.

28. *Kramer N., Walzl A., Unger C., Rosner M., Krupitza G., Hengstschlager M., Dolznig H.* 2013. *In vitro* cell migration and invasion assays. Mutat. Res. V. 752. P. 10. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.08.001

29. *Kuo P. J., Lin P. C., Hsieh C. H.* 2025. Wound healing in cancer patients under immunotherapy. Int. J. Surg. V. 111. P. 7087. https://doi.org/10.1097/JS9.0000000000002819

30. *Lemanska-Perek A., Adamik B.* 2019. Fibronectin and its soluble EDA-FN isoform as biomarkers for inflammation and sepsis. Adv. Clin. Exp. Med. V. 28. P. 1561. https://doi.org/10.17219/acem/104531

31. *Leonteva A., Abdurakhmanova M., Bogachek M., Belovezhets T., Yurina A., Troitskaya O., Kulemzin S., Richter V., Kuligina E., Nushtaeva A.* 2025. The activity of human NK cells towards 3D heterotypic cellular tumor model of breast cancer. Cells. V. 14. Art. ID: 1039. https://doi.org/10.3390/cells14141039

32. *Leonteva A., Kazakova A., Berezutskaya E., Ilyina A., Sergeevichev D., Vladimirov S., Bogachek M., Vakhrushev I., Makarevich P., Richter V., Nushtaeva A.* 2026. Heterotypic 3D model of breast cancer based on tumor, stromal and endothelial cells: cytokines interaction in the tumor microenvironment. Cells. V. 15. Art. ID: 145. https://doi.org/10.3390/cells15020145

33. *Li C. L., Yang D., Cao X., Wang F., Hong D. Y., Wang J., Shen X. C., Chen Y.* 2017. Fibronectin induces epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer MCF-7 cells via activation of calpain. Oncol. Lett. V. 13. P. 3889. https://doi.org/10.3892/ol.2017.5896

34. *Li L., Tang Y., Qiu L., Li Z., Wang R.* 2025a. Extracellular matrix shapes cancer stem cell behavior in breast cancer: a mini review. Front. Immunol. V. 15. Art. ID: 1503021. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1503021

35. *Li R., Wen A., Lin J.* 2020. Pro-inflammatory cytokines in the formation of the pre-metastatic niche. Cancers (Basel). V. 12. Art. ID: 3752. https://doi.org/10.3390/cancers12123752

36. *Li Y., Liu F., Cai Q., Deng L., Ouyang Q., Zhang X. H., Zheng J.* 2025b. Invasion and metastasis in cancer: molecular insights and therapeutic targets. Signal Transduct. Target. Ther. V. 10. P. 57. https://doi.org/10.1038/s41392-025-02148-4

37. *Li Y., Wei Y., Tang W., Luo J., Wang M., Lin H., Guo H., Ma Y., Zhang J., Li Q.* 2019. Association between the degree of fibrosis in fibrotic focus and the unfavorable clinicopathological prognostic features of breast cancer. Peer J. V. 7. Art. ID: e8067. https://doi.org/10.7717/peerj.8067

38. *Lv K., He T.* 2024 Cancer-associated fibroblasts: heterogeneity, tumorigenicity and therapeutic targets. Mol Biomed. V. 5. P. 70. https://doi.org/10.1186/s43556-024-00233-8.

39. *Mathieson, L., Jones, P., Koppensteiner, L., Neilson L., Dorward D.A., O'Connor R., Akram A.R.* 2025 Patient derived cancer-associated fibroblasts from non-small cell lung cancer undergo phenotypic drift in culture. BJC Rep. V. 3. P. 50. https://doi.org/10.1038/s44276-025-00159-w

40. *Luo H., Xia X., Huang L.B., An H., Cao M., Kim G.D., Chen H.N., Zhang W.H., Shu Y., Kong X., Ren Z., Li P.H., Liu Y., Tang H., Sun R. et al.* 2022. Pan-cancer single-cell analysis reveals the heterogeneity and plasticity of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. Nat. Commun. V. 13. P. 6619. https://doi.org/10.1038/s41467-022-34395-2

41. *McAllister S.S., Weinberg R.A.* 2014. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. Nat. Cell. Biol. V. 16. P. 717. https://doi.org/10.1038/ncb3015

42. *Moses K., Brandau S.* 2016. Human neutrophils: their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. Semin. Immunol. V. 28. P. 187. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.018

43. *Nakamura T., Mizuno S.* 2010. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci. Vol. 86. P. 588. https://doi.org/10.2183/pjab.86.588

44. *Nushtaeva A., Ermakov M., Abdurakhmanova M., Troitskaya O., Belovezhets T., Varlamov M., Gayner T., Richter V., Koval O.* 2023. "Pulsed Hypoxia" gradually reprograms breast cancer fibroblasts into pro-tumorigenic cells via mesenchymal–epithelial transition. Int. J. Mol. Sci. Vol. 24. Art. ID: 2494. https://doi.org/10.3390/ijms24032494

45. *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

46. *Ohshio Y., Teramoto K., Hanaoka J., Tezuka N., Itoh Y., Asai T., Daigo Y., Ogasawara K.* 2015. Cancer-associated fibroblast-targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell-based vaccine. Cancer Sci. V. 106. P. 134. https://doi.org/10.1111/cas.12584

47. *Pan C., Kumar C., Bohl S., Klingmueller U., Mann M.* 2009. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. Mol. Cell Proteomics. V. 8. P. 443. https://doi.org/10.1074/mcp.M800258-MCP200.

48. *Pietras K., Ostman A.* 2010. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. Exp. Cell. Res. V. 316. P. 1324. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045

49. *Piwocka O., Sterzynska K., Malinska A., Suchorska W.M., Kulcenty K.* 2025. Development of tetraculture spheroids as a versatile 3D model for personalized breast cancer research. Sci. Rep. V. 15. P. 27449. https://doi.org/10.1038/s41598-025-12556-9

50. *Qian B.Z., Pollard J.W.* 2010. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell. V. 141. P. 39. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014

51. *Quintela-Fandino M., Bermejo B., Zamora E., Moreno F., Garcia-Saenz J.A., Pernas S., Martinez-Janez N., Jimenez D., Adrover E., de Andres R., Mouron S., Bueno M.J., Manso L., Vinas G., Alba E. et al.* 2024. High mechanical conditioning by tumor extracellular matrix stiffness is a predictive biomarker for antifibrotic therapy in HER2-negative breast cancer. Clin. Cancer Res. V. 30. P. 5094 https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-24-1518

52. *Rafaeva M., Jensen A.R.D., Horton E.R., Zornhagen K.W., Strobech J.E., Fleischhauer L., Mayorca-Guiliani A.E., Nielsen S.R., Gronseth D.S., Kus F., Schoof E.M., Arnes L., Koch M., Clausen-Schaumann H., Izzi V., et al.* 2023. Fibroblast-derived matrix models desmoplastic properties and forms a prognostic signature in cancer progression. Front. Immunol. V. 14. Art. ID: 1154528. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1154528

53. *Ribatti D., Tamma R.* 2018. A revisited concept. Tumors: wounds that do not heal. Crit. Rev. Oncol. Hematol. V. 128. P. 65. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.05.016