УДК 576.08:576.05:616-006.04
DOI: 10.7868/S3034606126030053

СФЕРОИДЫ ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ КАК МОДЕЛЬ ОПУХОЛЕВОГО ФИБРОЗНОГО ОЧАГА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е. А. Березуцкая[2, 3], А. А. Леонтьева[1, 2], А. А. Казакова[1, 2], Д. С. Сергеевичев[1, 4], С. К. Владимиров[1], М. В. Богачек[1], В. А. Рихтер[1], А. А. Нуштаева[1, 2, *]

[1] Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», 354349, Российская Федерация

[2] Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, 630090, Российская Федерация

[3] Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090, Российская Федерация

[4] Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения РФ, Новосибирск, 630090, Российская Федерация

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

Аннотация. **Обоснование и цель.** Опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) — гетерогенная популяция клеток стромы, определяющая ремоделирование матрикса, фиброз и устойчивость к терапии рака молочной железы. Функциональный вклад отдельных подтипов ОАФ в опухолевую прогрессию изучен недостаточно, что сдерживает разработку стромально-направленной терапии. Цель работы — характеризация монотипических сфероидов ОАФ как 3D-модели опухолевого фиброзного очага и анализ инвазивно-миграционного потенциала разных подтипов. **Методы**. Использована панель культур ОАФ молочной железы, ранее охарактеризованная по классификации Косты (Costa et al., 2018). Сфероиды формировали на планшетах с агарозным покрытием. Адгезивный и пролиферативный потенциал оценивали по динамике прикрепления и роста клеток из сфероидов на жестком субстрате с помощью системы xCELLigence RTCA. Инвазивно-миграционное поведение анализировали путем культивирования сфероидов на гидрогелях из Matrigel™ или желатина с последующей световой микроскопией. Секреторный профиль 48 цитокинов, хемокинов и факторов роста определяли мультиплексным анализом xMAP. **Результаты**. Все исследованные культуры ОАФ формировали жизнеспособные сфероиды, сохраняющие метаболическую активность в течение 7 сут. Выявлены две принципиально различные стратегии 3D-поведения: 1) полная диссоциация сфероида с активной клеточной диссеминацией, характерная для иммуносупрессивных и матрикс-ремоделирующих ОАФ; 2) сохранение целостной структуры с образованием направленных клеточных потоков, свойственное стволовоподобным/прогениторным и метастазирующим ОАФ. Для каждой культуры установлен специфичный паракринный профиль, потенциально соответствующий различным стадиям опухолевой прогрессии или функциональным стромальным нишам. Проопухолевый фенотип зафиксирован также у фибробластов, выделенных из морфологически нормальной ткани молочной железы. **Заключение**. Монотипические сфероиды ОАФ воспроизводят функциональную гетерогенность опухолевой стромы *in vitro* и могут служить платформой для скрининга антифибротических агентов. Полученные данные обосновывают необходимость дифференцированного подхода к таргетированию стромы с учетом подтипового состава ОАФ.

Ключевые слова: рак молочной железы, фиброз, десмопластическая строма, микроокружение опухоли, опухоль-ассоциированные фибробласты, воспаление, внеклеточный матрикс, культуры клеток, 3D-культуры, сфероиды

Принятые сокращения: ВКМ — внеклеточный матрикс; МОО — микроокружение опухоли; ОАФ — опухоль-ассоциированные фибробласты; bFGF — основной фактор роста фибробластов; G-CSF — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа I; GRO-α — регулируемый ростом онкоген альфа; HGF — фактор роста гепатоцитов; IL — интерлейкин; MCP-1 — моноцитарный хемоаттрактантный белок-1; MIF — фактор, ингибирующий миграцию макрофагов; SCGFβ — стволовоклеточный фактор роста бета; SDF-1α — стромальный фактор-1 альфа; TNFα — фактор некроза опухоли альфа; VEGF — фактор роста эндотелия сосудов.

Финансирование работы. Работа выполнена за счет средств проекта, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (соглашение № 27-03 от 27.09.2024). Культуры клеток BrC4f и BN120f получены в рамках государственного задания Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, (Новосибирск, Россия) № 125012900932-4.

Соблюдение этических стандартов. Работа не включала эксперименты с участием животных или людей.

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

Благодарности. Авторы выражают благодарность М. И. Прохоровой (ООО «Диаэм») за помощь в проведении анализа цитокинов на приборе QuattroPlex Lab («Диаэм», Москва, Россия).

Ссылка для цитирования. Березуцкая Е. А., Леонтьева А. А., Казакова А. А., Сергеевичев Д. С., Владимиров С. К., Богачек М. В., Рихтер В. А., Нуштаева А. А. Сфероиды из фибробластов как модель опухолевого фиброзного очага рака молочной железы. Цитология / Cell and Tissue Biology. 2026. Т. 68. № 3. С. 276–297. doi: 10.7868/S3034606126030053

Поступила в редакцию 21.02.2026
После доработки 29.05.2026
Принята к публикации 01.06.2026

© Березуцкая Е. А., Леонтьева А. А., Казакова А. А., Сергеевичев Д. С., Владимиров С. К., Богачек М. В., Рихтер В. А., Нуштаева А. А., 2026

DOI: 10.7868/S3034606126030053

Spheroids from Fibroblast Provide a Model of Tumor Fibrous Focus in Breast Cancer

E. A. Berezutskaya[b, c], A. A. Leontieva[a, b], A. A. Kazakova[a], D. S. Sergeevichev[a, d], S. K. Vladimirov[a], M. V. Bogachek[a], V. A. Richter[b], A. A. Nushtaeva[a, b, *]

[a] *Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, 354349, Russian Federation*

[b] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Russian Federation*

[c] *Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090, Russian Federation*

[d] *Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, 630090, Russian Federation*

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

Abstract. **Objective:** Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are a heterogeneous population of stromal cells that govern matrix remodelling, fibrosis, and therapy resistance in breast cancer. The functional contribution of individual CAF subtypes to tumour progression remains insufficiently characterised, impeding the development of stroma-directed therapies. The objective of this study was to characterise monotypic CAF spheroids as a 3D model of a tumour fibrous focus and to analyse the migratory and invasive behaviour of different subtypes. **Materials and methods:** A panel of breast CAF cultures, previously characterised according to the Costa et al. (2018) classification, was utilised in the study. Spheroids were formed on agarose-coated plates. The adhesive and proliferative potential of the cells was assessed by real-time monitoring of cell attachment and outgrowth from spheroids on a rigid substrate using the xCELLigence RTCA system. The migratory and invasive behaviour of the cells was analysed through the culturing of spheroids on Matrigel™ or gelatin hydrogels, followed by the use of light microscopy. The secretory profile of 48 cytokines, chemokines, and growth factors was determined by multiplex xMAP analysis. **Results:** All CAF cultures tested were found to form viable spheroids that maintained metabolic activity for a period of seven days. Two fundamentally different strategies of 3D behaviour were identified. Firstly, the spheroid dissociation process must be complete, accompanied by active cell dissemination. This is a hallmark of immunosuppressive and matrix-remodelling CAFs. Secondly, the spheroid structure must be preserved, accompanied by the formation of directional cell streams. This is characteristic of stem-like/progenitor and metastatic CAFs. A paracrine profile was established for each culture, potentially corresponding to distinct stages of tumour progression or functional stromal niches. Furthermore, a pro-tumor phenotype was identified in fibroblasts isolated from morphologically normal breast tissue. **Conclusions:** Monotypic CAF spheroids are capable of recapitulating the functional heterogeneity of tumour stroma in vitro and thus represent a potential platform for the screening of antifibrotic agents. The findings of this study lend support to the notion that a differential approach to stroma targeting is required, one which takes into account the composition of CAF subtypes.

Keywords: breast cancer, fibrosis, desmoplastic stroma, tumor microenvironment, tumor-associated fibroblasts, inflammation, extracellular matrix, cell cultures, 3D cultures, spheroids

Funding. The project received financial support from the Sirius Federal Territory's state program, "Scientific and Technological Development of the Sirius Federal Territory" (Agreement No. 27-03 dated September 27, 2024). BrC4f and BN120f cell cultures were obtained under state assignment No. 125012900932-4 from the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Novosibirsk, Russia).

Ethics approval and consent to participate. This work does not contain any studies involving human and animal subjects.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments. The authors would like to express their gratitude to M. I. Prokhorova from Dia-M for her assistance in conducting the cytokine analysis on the device QuattroPlex Lab (Dia-M, Moscow, Russia).

For citation. Berezutskaya E. A., Leontieva A. A., Kazakova, Sergeevichev D. S., Vladimirov S. K., Bogachek M. V., Richter V. A., Nushtaeva A. A. Spheroids from fibroblast provide a model of tumor fibrous focus in breast cancer. Tsitologiya / Cell and Tiss. Biol. 2026. V. 68. Nn. 3. P. 276–297. doi: 10.7868/S3034606126030053

Received February 21, 2026
Revised May 29, 2026
Accepted June 1, 2026

© Berezutskaya E. A., Leontieva A. A., Kazakova, Sergeevichev D. S., Vladimirov S. K., Bogachek M. V., Richter V. A., Nushtaeva A. A., 2026

В 1986 году Гарольд Ф. Дворак, профессор патологии Гарвардской медицинской школы в Бостоне, опубликовал в журнале New England Journal of Medicine эссе под названием «Опухоли: незаживающие раны», в котором указал на сходство между образованием опухолевой стромы и заживлением ран (Dvorak, 1986; Ribatti et al., 2018). Процессы, происходящие в опухоли, имеют много общих черт с регенерацией тканей, включая иммунный ответ, пролиферацию клеток, миграцию клеток, ремоделирование тканей и гибель клеток. Сходства между опухолями и воспалительной реакцией, связанной с заживлением ран, известны уже более 150 лет и продолжают вызывать интерес.

Нарушение заживления ран является критическим фактором в развитии рака. В более общем смысле, неправильное заживление ран может способствовать развитию хронических прогрессирующих заболеваний, включая фиброз органов и нейродегенерацию (Higuchi et al., 2025). Заживление ран происходит в перекрывающихся фазах — гемостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование — под контролем иммунных клеток, цитокинов и стромальных клеток. У онкологических больных этот процесс может быть нарушен как факторами, связанными с пациентом, так и факторами, связанными с лечением (Kuo et al., 2025). Кроме того, многие онкологические больные имеют в анамнезе химио- или лучевую терапию, что может вызвать фиброз тканей и снизить способность к заживлению (Dormand et al., 2005).

В контексте концепции опухоли как «незаживающей раны» (Dvorak, 2015), клетки, участвующие в ранозаживлении, при хроническом воспалении начинают взаимодействовать с опухолевыми клетками, формируя микроокружение опухоли (МОО) и способствуя прогрессированию опухоли. МОО рака молочной железы — это комплексная гетерогенная среда, в которой опухолевые клетки находятся в тесном взаимодействии с не мутированными стромальными клетками, включая опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), иммунные, эндотелиальные, мезенхимные стволовые клетки, адипоциты и неклеточные компоненты (белки внеклеточного матрикса (ВКМ), факторы роста, цитокины и хемокины) (Tian et al., 2025).

Особая роль в формировании МОО принадлежит ОАФ, которые участвуют в ремоделировании ВКМ, регуляции ангиогенеза, воспалительных и иммунных реакциях, а также в формировании инвазивных свойств опухоли и её устойчивости к терапии (Hu et al., 2023). Показано, что ОАФ представляют собой гетерогенную популяцию клеток, включающую несколько функциональных подтипов, свойства которых определяются сигналами микроокружения (Cheng et al., 2025). Формирование фиброзной, десмопластической стромы является важным фактором прогрессии опухолей и одним из механизмов снижения эффективности противоопухолевой терапии, поскольку плотный ВКМ ограничивает доставку лекарственных препаратов и изменяет биомеханические и сигнальные свойства опухолевой ткани (Rafaeva et al., 2023).

Большинство существующих *in vitro* моделей основаны на 2D-культурах или на гетеротипических 3D-моделях, где ОАФ культивируются совместно с опухолевыми клетками (Leonteva et al., 2025, 2026; Vakhshiteh et al., 2023). Несомненным достоинством таких систем является возможность анализа взаимодействий опухоль–строма. Однако они малопригодны для изолированной оценки прямого вклада конкретного подтипа ОАФ в ремоделирование внеклеточного матрикса и формирование фиброза, поскольку наблюдаемые эффекты являются результатом сложной суммы межклеточных сигналов (Cheng et al., 2025). В настоящей работе предлагается использовать монотипические сфероиды из ОАФ в качестве редуцированной, но хорошо контролируемой 3D-модели опухолевого фиброзного очага. Такой подход, в отличие от со-культур, позволяет сосредоточиться на внутренних свойствах фибробластов разных подтипов — их способности к самоорганизации, синтезу компонентов матрикса, миграции, инвазии и формированию специфического паракринного окружения.

Для исследований в настоящей работе использована созданная ранее и охарактеризованная по классификации Косты (Costa et al., 2018) панель культур ОАФ молочной железы, которая включает четыре основных подтипа (Abdurakhmanova et al., 2025; Ilyina et al., 2025). Цель — охарактеризовать монотипические сфероиды, полученные на основе этой панели, как экспериментальной платформы для изучения клеточно-молекулярных механизмов опухолевого фиброза при раке молочной железы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Реактивы и материалы. В работе использованы следующие материалы и реактивы: культуральные среды Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (IMDM), эмбриональная бычья сыворотка (FBS), раствор антибиотиков-антимикотиков (пенициллин, стрептомицина сульфат, амфотерицин) и TrypLE™ Express Enzyme (GIBCO, Life Technologies, США), GlutaMAX™ (GIBCO, Invitrogen, Франция), натрий-фосфатный буфер (PBS), трипановый синий (Trypan Blue Stain 0.4%; Logos Biosystems, Южная Корея), Matrigel™ (Corning, США), желатин из кожи холодноводных рыб (Sigma, Канада), агароза (Amresco, США), флуоресцеина диацетат и йодистый пропидий, (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), Hoechst 33342 Ready Flow™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, США), флаконы для культивирования с площадью поверхности 25 см^2 и 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария), 24-луночные планшеты с низкой адгезией (Corning, США), набор для количественного определения белка Bradford Protein Assay Kit (FineTest, Китай), 4—20%-ные гели SDS-PAGE (WSHT, Китай), PVDF-мембраны (Bio-Rad, США), первичные антитела (ABclonal, Китай) к фибронектину (разведение 1:2000), виментину (1:5000) и GAPDH (1:20 000), вторичные HRP-конъюгированные антитела (1:10 000; ABclonal, Китай), набор для хемилюминесцентной детекции ECL (ServiceBio,

Китай), панель Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening 48-Plex Panel (#12007283; Bio-Rad Laboratories, США).

Оборудование. Использовали центрифугу Minispin (Eppendorf, Германия), CO_2 инкубатор (Heraeus, Германия), счетчик клеток LUNA-II™ (Logos Biosystems, Южная Корея), инвертированный микроскоп Axio Skope 2 Plus (Carl Zeiss, Германия) и Eclipse Ti-S (Nikon Corporation, Япония) с программным обеспечением NIS-Elements (версия 5.30.05, Nikon Instruments Inc., США), систему xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA; ASEA Biosciences, США) с планшетами E-plate, систему гель-документирования ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, США) с программным обеспечением ImageLab (Bio-Rad, США), мультиплексный анализатор QuattroPlex Lab (Dia-M, Москва, Россия).

Клетки и культивирование. В работе использованы ранее полученные и охарактеризованные по классификации Косты культуры стромальных фибробластов молочной железы человека (Costa et al., 2018; Ilyina et al., 2025) (табл. 1). Линии BC3f, BC4f, BrC1f (Ilyina et al., 2025) и BrC4f (Nushtaeva et al., 2023) были получены из опухолевого образца пациента с диагнозом рак молочной железы (Ilyina et al., 2025); линия Met-Tem — из образца метастаза РМЖ в головной мозг (Ilyina et al., 2025); линия BN120f — из морфологически нормальной ткани молочной железы человека (Ilyina et al., 2025). В качестве контроля использовали линию фибробластов кожи века человека NSK1 (Ilyina et al., 2025). Выделение клеток проводили методом ферментативной диссоциации ткани, как описано ранее (Nushtaeva et al., 2019). Иммортализацию клеток не проводили. Эксперименты выполняли на клетках 3—5-го пассажа после вывода из криоконсервации.

Культуры фибробластов выращивали в среде IMDM, содержащей 10% FBS, 1-кратные растворы GlutaMAX™ и антибиотиков-антимикотиков. Клетки культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере CO_2 (5.0 ± 0.5%). При достижении монослоя клетки открепляли от подложки с помощью TrypLE ™ Express, разбавляли полной ростовой средой IMDM в соотношении 1:3—1:4 (по объему) и пересевали.

Формирование сфероидов. Монотипические сфероиды получали из многолуночных планшетов с агарозным покрытием, содержащих стромальные клетки. В каждую лунку 96-луночного планшета для культивирования (TPP, Trasadingen, Швейцария) добавляли 50 мкл 2%-ного агарозного гидрогеля и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Стромальные клетки высевали в 100 мкл культуральной среды в концентрации 2500 клеток на лунку. Планшеты культивировали при 37 °C еще 72 часа для образования трехмерных сфероидов в культуре. Анализ проводили на основе результатов трех независимых экспериментов. Результаты визуализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti-S серии (Nikon Corporation, Япония). Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения NIS-Elements (Nikon Instruments Inc., версия 5.30.05 64-бит, Мелвилл, Нью-Йорк, США).

Оценка накопления и отложения белков ВКМ сфероидных моделей. Использовали Вестерн-блот-анализ. Через 5 сут культивирования сфероиды собирали, центрифугировали (15 мин, 1000 об/мин, 4 °C) и лизировали в буфере RIPA (150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 50 мМ Tris-HCl pH 7.4), содержащем 1-кратный коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (ServiceBio, Китай). Концентрацию белка определяли с помощью набора ProteOrange Protein Quantification Kit или Bradford

Таблица 1. Функциональная характеристика различных подтипов ОАФ первичных культур

Параметр	Культура ОАФ					Нормальные фибробласты	
	BC3f	BC4f	BrC1f	BrC4f	Met-Tem	BN120f	NSK1f
Тип ОАФ по классификации Коста (Costa et al., 2018)	S3	S1	S2	S4	S1	Нет	Нет
Функциональная активность	ИС	ИС и ММ	СК/ПК	ММ	МЕТ	Норма	Норма
Молекулярные маркеры	αSMA↓ FAPα→ FSP1→ Ki-67→ CD90→ PDGFRα (–)	αSMA→ FAPα↑ FSP1↑ Ki-67→ CD90→ PDGFRα (–)	αSMA↓ FAPα→ FSP1↓ Ki-67↑ CD90→ PDGFRα↓	αSMA↑ FAPα→ FSP1↑ Ki-67↑ CD90↑ PDGFRα (–)	αSMA→ FAPα→ FSP1→ Ki-67→ CD90↓ PDGFRα ↓	αSMA↓ FAPα↑ FSP1↓ Ki-67↓ CD90→ PDGFRα (–)	αSMA↑ FAPα↑ FSP1↑ Ki-67↓ CD90↑ PDGFRα (–)

Примечание. По данным: (Ilyina et al., 2025). ИС — иммуносупрессивный; ММ — моделирование матрикса; СК/ПК — стволовые клетки/прогениторные клетки; МЕТ — агрессивный метастатический; αSAM — α-гладкомышечный актин; FAPα — белок активации фибробластов; FSP1 — фибробласт-специфический белок 1; Ki-67 — маркер пролиферативной активности опухоли; CD90 — гликофосфатидилинозитол-заякоренный белок; PDGFRα — рецептор фактора роста тромбоцитов α. Уровни: ↓ — низкий, ↑ — высокий; → — средний; (–) — отсутствует.

Protein Assay Kit. Равные по общему количеству белка образцы загружали в лунки 4—20%-ного геля SDS-PAGE. После электрофореза белки переносили влажным способом на PVDF- или нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны блокировали в течение 1 ч 5%-ным обезжиренным молоком и инкубировали в течение ночи при 4 °C с постоянным встряхиванием с первичными антителами к фибронектину (разведение 1:2000), виментину (1:5000) и GAPDH (1:20000). После 5-кратной промывки в трис-буферном солевом растворе, содержащем 0.1% Tween-20 (TBST) по 30 мин, мембраны инкубировали с вторичными HRP-коньюгированными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном встряхивании. Мембраны промывали 5 раз в TBST, проявляли с помощью хемилюминесценции (ServiceBio, Wuhan Optics Valley, Китай). Хемилюминесценцию белков визуализировали с помощью Chemi Doc (Bio-Rad, Hercules, США). Интенсивность полученных полос анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad, США). Количество целевых белков оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH. Уровень GAPDH в образцах варьирует из-за биологических особенностей сфероидов (гипоксии, метаболизма); нормализацию фибронектина на GAPDH проводили для каждого образца.

Оценка инвазивного и миграционного поведения клеток. Миграция и инвазия — два четко разделенных термина в экспериментальной клеточной биологии (Kramer et al., 2013). Миграция определяется как направленное движение клеток по субстрату, которым может быть природный гидрогель. Для оценки способности клеток к миграции *in vitro* в качестве субстрата можно использовать 2% желатин, поскольку это пористый, инертный материал, в котором опухолевые клетки могут беспрепятственно распространяться. Инвазия определяется как движение клетки через трехмерную матрицу, которое сопровождается перестройкой трехмерной среды для выхода клетки. Одним из классических методов изучения инвазии клеток *in vitro* является тест на субстрате из Matrigel™ — гелеобразной смеси, содержащей белки внеклеточного матрикса. Для анализа миграции и инвазии дно лунок 96-луночного планшета покрывали тонким слоем желатина из кожи холодноводных рыб (модель оценки миграции), либо гидрогелем Matrigel™ (модель оценки инвазии) (рис. 1). Гидрогели полимеризовали при 37.0 ± 1.0 °C в течение 30 мин. Сформированные сфероиды аккуратно переносили на гидрогелевую основу и культивировали в стандартных условиях. Миграцию и инвазию клеток из сфероидов документировали с помощью световой микроскопии каждые 24 ч в течение 5 сут. Результаты активации миграционного или инвазивного поведения клеток визуализировали с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon Corporation, Япония). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения NIS-Elements (Nikon Instruments Inc., версия 5.30.05, США).

Оценка способности клеток к повторной адгезии и пролиферации. Адгезию, пролиферацию и разрастание клеток сфероидных моделей оценивали с помощью системы iCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA) в режиме реального времени на системе планшетов E-plate (ACEA Biosciences Inc., США). В лунки этого планшета интегрированны микроэлектронные сенсоры, позволяющие регистрировать изменение сопротивления электрического тока. Величина сопротивления зависит от размера и количества прикрепленных клеток и позволяет рассчитать относительное число жизнеспособных клеток (клеточный индекс, CI). Перед началом эксперимента система записывает нулевой уровень импеданса чистой среды в лунке (базовый нормализованный клеточный индекс CI = 0). Сформированные сфероиды в низкоадегзивных условиях на третий день культивирования переносили в лунки планшетов E-plate в полной ростовой среде IMDM, содержащей 10% FBS, 1-кратный раствор GlutaMAX™ и 1-кратный раствор антибиотиков-антимикотиков. Затем планшет помещали на 30 мин в инкубатор при 37 °C

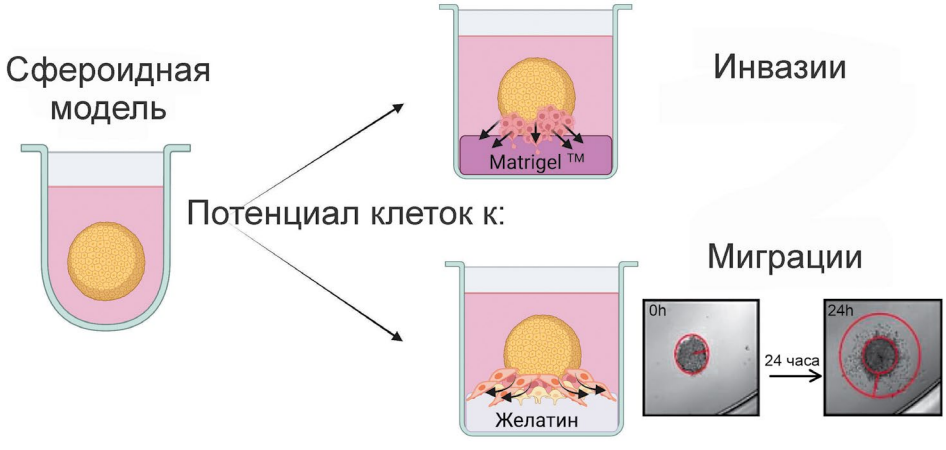


Рис. 1. Схематическое изображение исследования инвазии и миграции клеток из сфероидной модели

в увлажненную атмосферу 5 % CO_2 для естественного осаждения сфероидов на дно лунки. Анализ адгезии и разрастания клеток из сфероида проводили в течение 100 ч в трех повторах.

Оценка секреции цитокинов и хемокинов клетками стромальных сфероидных моделей. Для этого применяли анализ xMAP с использованием Bio-Plex Pro Human Cytokine Screening 48-Plex Panel (#12007283, Bio-Rad Laboratories, Hercules, США) и QuattroPlex Lab («Диаэм», Москва, Россия). Для получения 3D-моделей для анализа клетки (по 200 тыс. кл./лунка) рассевали в лунки 24-луночных планшетов с низкой адгезией и через 5 сут культивирования сфероиды со средой из каждой лунки переносили в центрифужные пробирки, в которые добавляли бычий сывороточный альбумин до конечной концентрации 0.5 % и центрифугировали при 1000 об./мин в течение 15 мин при 4 °C. Затем аликвоты супернатанта добавляли в аналитическую плашку. Остальные этапы анализа проводили в соответствии с инструкциями производителя набора.

Статистический анализ. Данные представлены в виде средних значений и их стандартных ошибок по результатам трех независимых экспериментов. Сравнение уровней белков ВКМ между линиями проводили с помощью непараметрического U-тест Манна–Уитни. Для межгруппового сравнения концентраций цитокинов и хемокинов использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с апостериорным тестом Даннета. Различия считали статистически значимыми при $P < 0.05$. Статистическую обработку выполняли с помощью программы GraphPad Prism v.10.3 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Формирование монотипических сфероидов из ОАФ. Микроокружение опухоли молочной железы является одним из важнейших элементов, поддерживающих прогрессирование опухоли и метастазирование. Главным клеточным компонентом стромального МОО являются фибробласты, которые могут активироваться и дифференцироваться в ОАФ. Поэтому для последующего сравнения характеристик ОАФ молочной железы со здоровыми фибробластами использовали контрольную культуру клеток из неопухолевого образца ткани, содержащего значительное количество стромального компонента (Korman, 2019), например, ткань кожи человека (NSK1).

Клеточные модели *in vitro* играют важную роль в качестве платформ для исследований токсичности, при разработке лекарств и в качестве замены животных в экспериментах. Использование клеточных агрегатов является подходящей 3D-моделью для исследования рака, включая фиброзную зону опухоли. Модели совместного культивирования обычно используются при изучении влияния различных подтипов стромальных клеток на опухолевую прогрессию, однако настоящая работа сосредоточена на исследовании монотипических сфероидов из стромальных клеток, выделенных из образца опухоли молочной железы (табл. 1) как модели десмопластической стромы. С помощью ранее разработанного метод культивирования сфероидальных моделей из стромальных клеток (Abdurakhmanova et al., 2022) и использование охарактеризованной панели культур фибробластов молочной железы (Ilyina et al., 2025), нами были получены монотипические сфероиды из здоровых и ОАФ молочной железы (рис. 2). Ранее показано, что все клетки в 3D-модели сохраняют жизнеспособность в течение 7 сут (Ilyina et al., 2025). Световая микроскопия, как наиболее доступный способ визуализации и оценки морфометрии сфероидов (Blondeel et al., 2025), выявила выраженные межкультуральные различия в морфологии сфероидных моделей. На основании визуального анализа выделено три морфотипа: 1) компактные плотные агрегаты с четким ровным краем (NSK1, BC4f, BrC1f); 2) агрегаты с плотным центром и рыхлой, частично диспергированной периферией (BC3f, BrC4f, BN120f); 3) рыхлые агрегаты неправильной формы (Met-Tem) (рис. 2). Культуры BrC1f, BrC4f и Met-Tem, помимо формирования крупных сфероидных моделей, демонстрировали склонность к формированию мелких аггрегатов, которые преимущественно не объединялись между собой.

Белки ВКМ в монотипических сфероидах фибробластов. В процессе развития рака ВКМ подвергается обширной перестройке, характеризующейся нарушением базальной пластинки, инвазией эндотелиальных клеток сосудов и развитием фиброза в опухолевых клетках и вокруг них, что приводит к увеличению жесткости ткани (Li et al., 2025a). Известно, что жесткость ВКМ изменяется с возрастом или при таких состояниях, как фиброз, прогрессирование рака, диабет и ожирение, и эти изменения жесткости внеклеточной среды меняют роль виментина в клеточном механосенсорном восприятии и взаимодействии между всеми компонентами цитоскелета (Alisafaei et al., 2024). В сравнении со сфероидами из клеток кожи века человека (NSK1) уровень виментина в моделях из клеток молочной железы был ниже в здоровых клетках BN120f (рис. 3). Для сфероидов из ОАФ уровень виментина не различался между моделями.

Фибронектин (ФН) человека — это крупный многодоменный белок, являющийся важным компонентом ВКМ, взаимодействующий с интегриновыми рецепторами, и играет важную роль в адгезии, миграции, росте и дифференцировке клеток во время эмбрионального развития, заживления ран и, в частности, прогрессирования рака (Schiefner et al., 2012). Клеточный фибронектин, основной стромальный компонент, продуцируемый преимущественно фибробластами, состоит из 2 клеточных димеров фибронектина (~250 кДа), ковалентно связанных 2 дисульфидными связями на С-конце (Hachey et al., 2025). Анализ с помощью Вестерн-блотинга показал наличие двух изоформ белка фибронектина с молекулярными массами 272 кДа и 250 кДа (рис. 3). Субъединица в 250 кДа была идентифицирована как мономер с наиболее распространенным размером (Dinesh et al., 2022; Leonteva et al., 2026). Он является основным компонентом как растворимого плазменного, так и нерастворимого

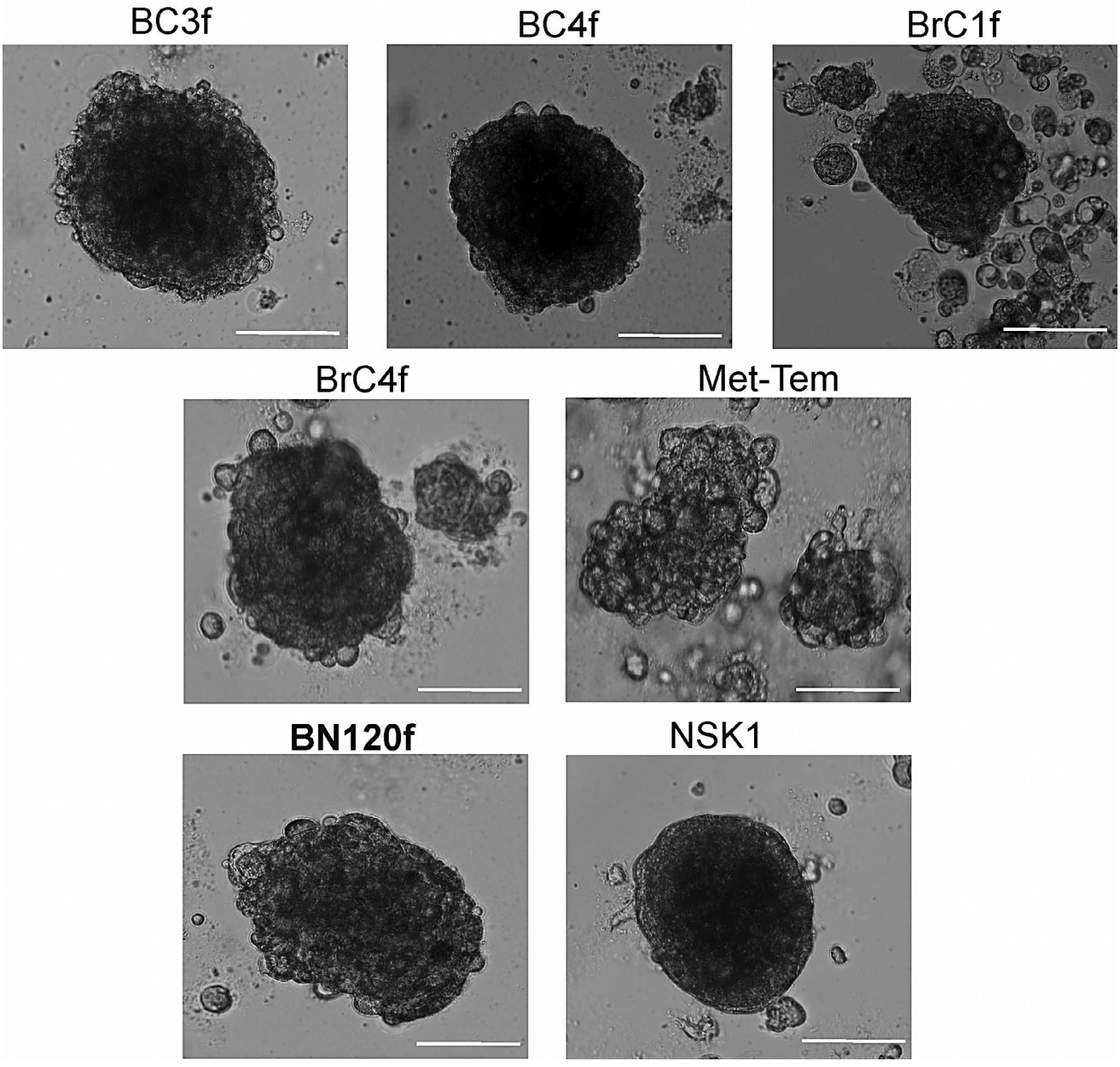


Рис. 2. Репрезентативные изображение 3D-моделей из здоровых (BN120f и NSK1) и опухоль-ассоциированных фибробластов (BC3f, BC4f, BrC1f и BrC4f) молочной железы. Данные представлены на 5-е сут культивирования. Микроскопия в проходящем свете. Масштабная линейка: 100 мкм. Увел. об.: 10×

клеточного фибронектина (Schiefner et al., 2012). Более крупная форма с молекулярной массой 272 кДа является одной из многочисленных изоформ, образующихся в результате альтернативного сплайсинга одного гена. Включение одного из альтернативно сплайсируемых доменов фибронектина — EDA или EDB — добавляет к молекулярной массе белка примерно 5—10 кДа каждый. Наблюдаемая нами разница (~22 кДа) превышает ожидаемые 20 кДа для изоформы, содержащей оба домена (EDA^+EDB^+). Это позволяет предположить, что в наших образцах присутствует изоформа с обоими экстра-доменами, а также, возможно, изменённый паттерн гликозилирования, который дополнительно увеличивает массу белка (Schiefner et al., 2012; Ilyina et al., 2025). Как видно на рис. 3, изоформа фибронектина в 272 кДа характерна для всех монотипических сфероидов фибробластов. По результатам анализа клеток, полученных из здоровой ткани кожи человека (NSK1), можно выделить группы с высоким уровнем синтеза фибронектина размером 272 кДа (клетки Met-Tem), средним (клетки BrC4f и BC3f)

и низким уровнем (клетки BC4f, BrC1f и BN120f). Что касается изоформы фибронектина в 250 кДа, то его высокий уровень синтеза был характерен для сфероидов из клеток Met-Tem и BrC1f, средний — для сфероидов BrC4f и BC3f в сравнении с NSK1 (рис. 3).

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что при активации фибробластов в МОО и формировании плотной фиброзной стромы накапливаются белки, в частности, высокомолекулярные изоформы фибронектина, которые могут служить прямым индикатором

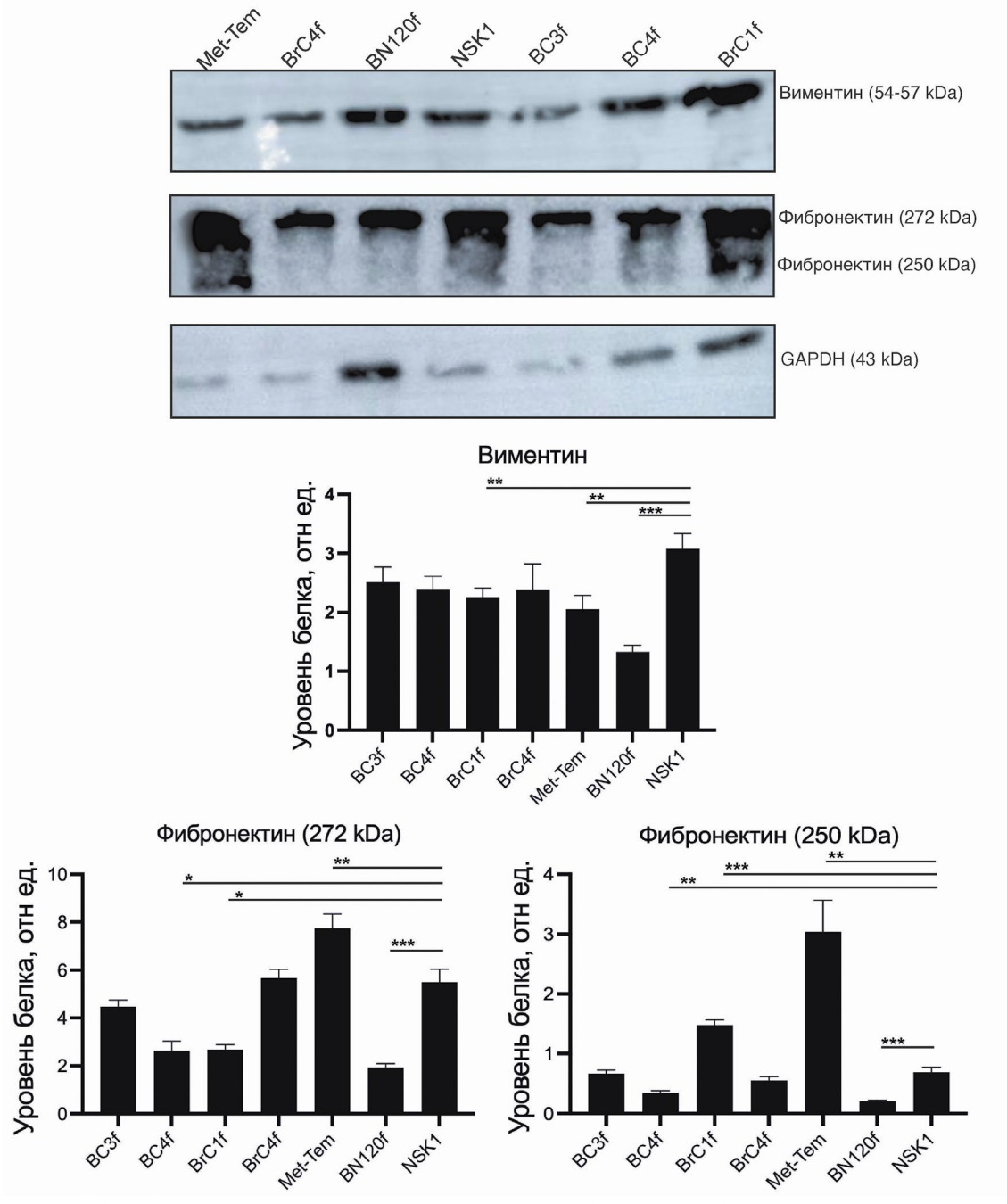


Рис. 3. Уровень фибронектина и виментина в монотипических сфероидах из фибробластов. Вестерн-блот-анализ. Показан один типичный блот из двух независимых экспериментов. Полосы белка-мишени оценивали как относительные значения по отношению к полосам GAPDH. Разница между экспериментальными группами по сравнению с контролем (здоровые клетки кожи века человека NSK1) была статистически значимой при $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ (непараметрический U-тест Манна–Уитни)

активации фибробластов и создания провоспалительной/проинвазивной ниши.

Миграционный и инвазивный потенциал стромальных клеток в монотипических сфероидных моделях. Миграция и инвазия являются основными факторами метастазирования, ответственного за 90% смертности от рака (Dillekas et al., 2019). Нами выявлена функциональная гетерогенность ОАФ, здоровых фибробластов BN120f и NSK1 по их способности к миграции и инвазии. На рис. 4*а* можно видеть, что сфероиды клеток BC3f, BC4f и BrC4f прикреплялись к желатиновому субстрату, и клетки мигрировали от центра сфероида

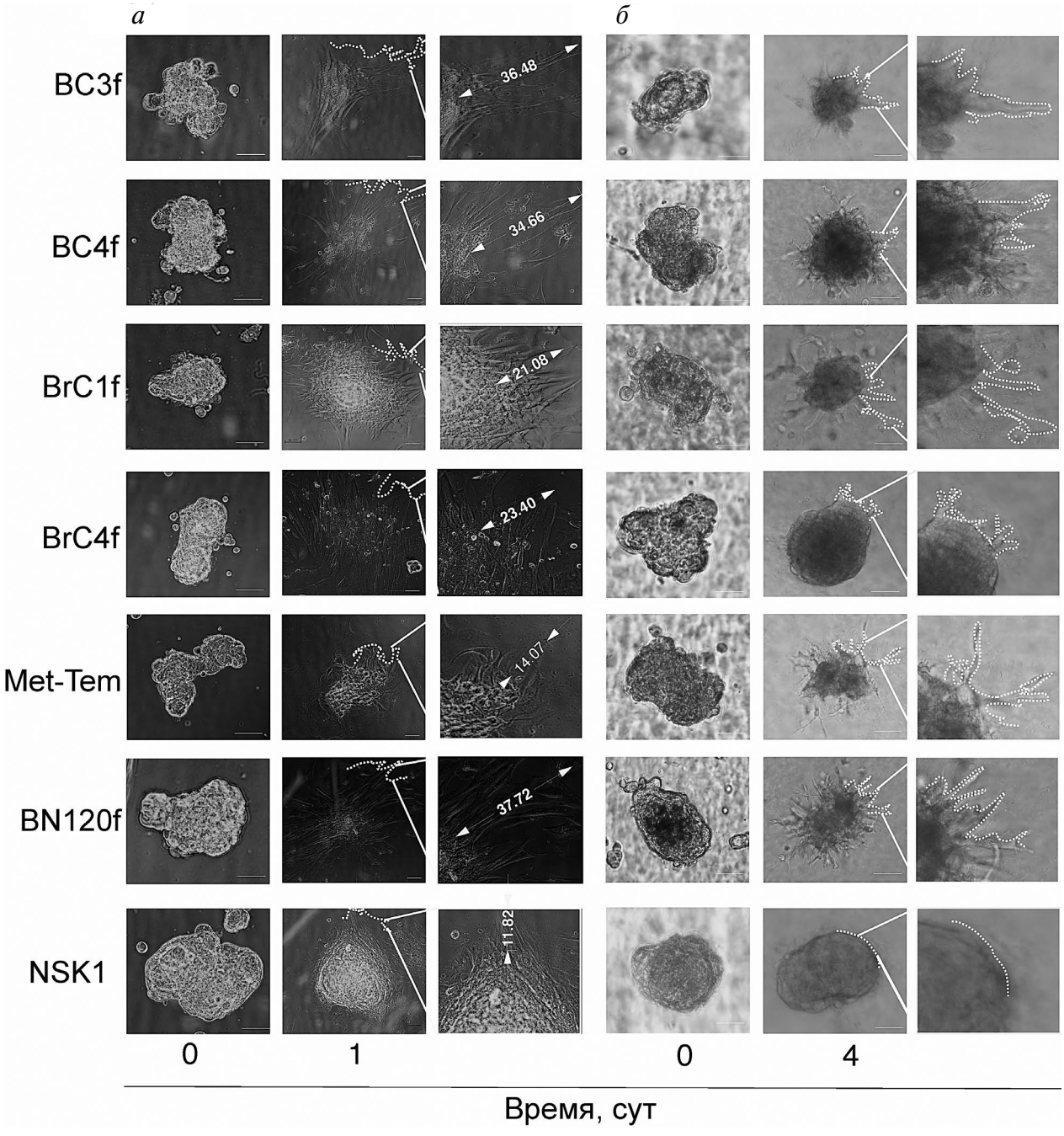


Рис. 4. Миграция (*а*) и инвазия (*б*) стромальных клеток из сфероидных моделей опухолей молочной железы. *а* — На подложке из желатина, *б* — на подложке из Matrigel™. Точечные линии на фото показывают участки препарата с вышедшими из сфероида клетками, белые стрелки показывают распространение клеток от сфероида (расстояние указано в мкм). Микроскопия в проходящем свете. Масштабная линейка: 100 мкм. Увел. об.: 10×

с полным разрушением структуры модели в первые сутки. В то время как сфероиды клеток BrC1f, Met-Tem, BN120f и NSK1 сохраняли плотную структуру и формировали направленную траекторию выхода клеток. При этом наименьшее распространение клеток от сфероида было характерно для здоровых клеток из кожи века человека (NSK1) и метастаза опухоли молочной железы в головной мозг (Met-Tem). Низкая миграция клеток Met-Tem может быть связана с адаптацией к специфической нише головного мозга, которая могла привести к изменению адгезионных свойств и снижению подвижности в условиях эксперимента *in vitro*. Анализ инвазивной активности на субстрате из Matrigel^{TM} показал, что для всех клеток молочной железы было характерно формирование инвазивных выступов из сфероидной модели. Наименьшее формирование инвазивных выступов было у клеток BrC4f и здоровых клеток NSK1 (рис. 4*б*).

Полученные нами данные о функциональном фенотипе ОАФ (табл. 1) совпадают с описанными ранее (Ilyina et al., 2025) и отражают их различный вклад в прогрессию опухоли: от быстрой колонизации и организации стромы (BrC1f) до диссеминации и модификации микроокружения (BC3f, BC4f, BrC4f).

Кинетика повторной адгезии и пролиферации на жестком субстрате. Данные по кинетике адгезии к жесткому субстрату и пролиферации (рис. 5) также свидетельствуют о функциональной гетерогенности ОАФ и здоровых клеток молочной железы. Лишь прогениторные ОАФ линии BrC1f проявляют высокую скорость повторного прикрепления и распластывания, что является ключевой характеристикой, лежащей в основе их повышенной проопухолевой активности. Другие стромальные клетки, включая нормальные фибробласты BN120f и метастатические Met-Tem, адгезируют с задержкой, тогда как остальные типы ОАФ полностью утрачивают эту способность, сохраняясь в виде компактных сфероидов, что совпадает с описанием их фенотипа и проявлением функциональных особенностей.

Секреция цитокинов и хемокинов клетками в монотипических сфероидах из фибробластов. Для количественной оценки функциональной гетерогенности ОАФ был проведен мультиплексный анализ секреции 48 цитокинов, хемокинов и факторов роста в кондиционированной среде 5-суточных сфероидов. Аналиты были сгруппированы по функциональным категориям: провоспалительные, иммуносупрессивные/противовоспалительные (рис. 6) и факторы миграции, инвазии и ангиогенеза (рис. 7, 8).

Контрольная линия клеток NSK1 продемонстрировала умеренный, но выраженный провоспалительный и хемотаксический профиль с высоким базальным уровнем секреции IL-6 (43372.8 ± 11589.5 пг/мл), а также значимыми уровнями (пг/мл) IL-1rα (662.0 ± 56.8), MCP-1 (4425.3 ± 842.8), IL-8 (1659.9 ± 650.5), SCGFβ (3693.9 ± 311.7) и SDF-1α (65.3 ± 11.2). Напротив, линия нормальных фибробластов молочной железы BN120f проявила чрезвычайно высокую секреторную активность, превышающую клетки NSK1по отдельным аналитам: наиболее показательно это проявилось в секреции (пг/мл) G-CSF (149560.7 ± 25501.9 против 147.8 ± 29.6), HGF (1199.7 ± 17.4 против 112.2 ± 5.1), VEGF (48.8 ± 12.5 против 21.5 ± 3.2) и bFGF (173.3 ± 46.9 против 59.9 ± 3). Другие цитокины и хемокины секретировались на схожем уровне (пг/мл): IL-6 (22744.0 ± 2695.9),

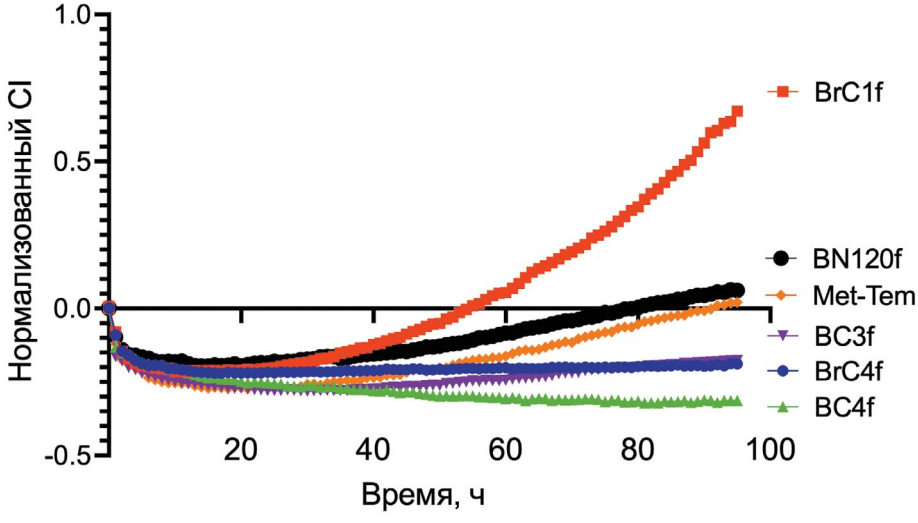


Рис. 5. Типичные кривые повторной адгезии и разрастания клеток разных линий из монотипических сфероидных моделей на жестком субстрате в режиме реального времени. Данные клеточного анализатора xCELLigence. CI — безразмерная величина, отражающая изменения сопротивления (импеданса) потоку электронов. Для анализа динамики CI значения импеданса нормализуют относительно питательной среды без клеток в заданную временную точку (1 мин) перед началом эксперимента

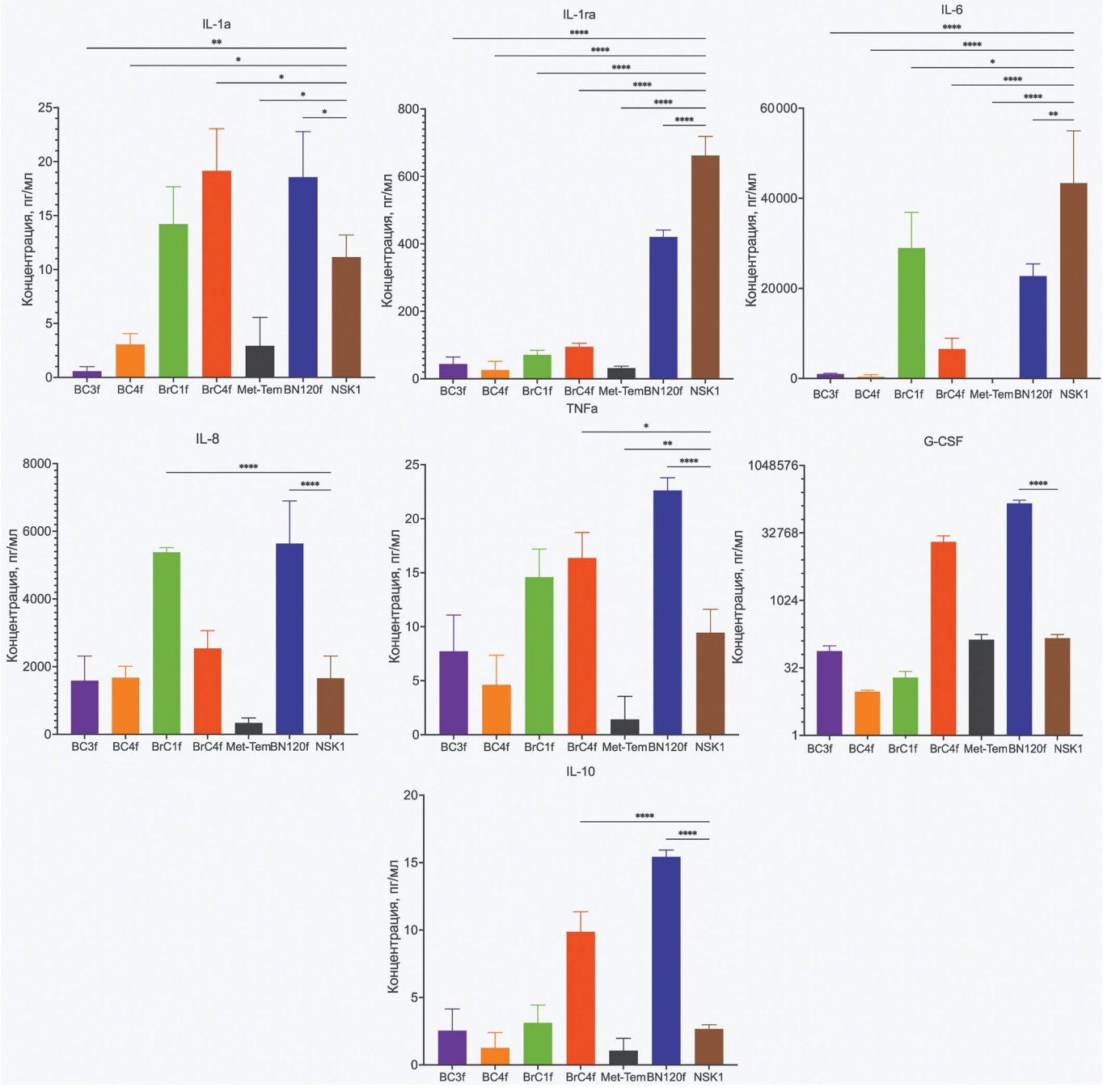


Рис. 6. Гистограммы концентраций провоспалительных (IL-1a, IL-1ra, IL-6, IL-8, TNF-α, G-CSF) и иммуносупрессивных/противовоспалительных (IL-10) цитокинов (пг/мл), измеренных в кондиционированных средах стромальных сфероидов клеток разных линий. Различия с данными для клеток NSK1 достоверны при $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ и $****P < 0.0001$. Здесь и на рис. 7, 8: каждая гистограмма соответствует одному аналиту; данные представлены в виде среднего значения и их ошибки из значений кондиционированной среды трех лунок; однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с апостериорным тестом Даннета

IL-1rα (420.4 ± 20.7), MCP-1 (2555.0 ± 63.9), IL-8 (5639.0 ± 1257.2), SCGFβ (9859.2 ± 433.3) и SDF-1α (49.3 ± 14.8), что соответствует активному проопухолевому фенотипу.

Среди исследуемых линий ОАФ выявлены отчетливые и воспроизводимые секреторные паттерны (табл. 2, рис. 9), определенные относительно здоровых клеток кожи века человека NSK1.

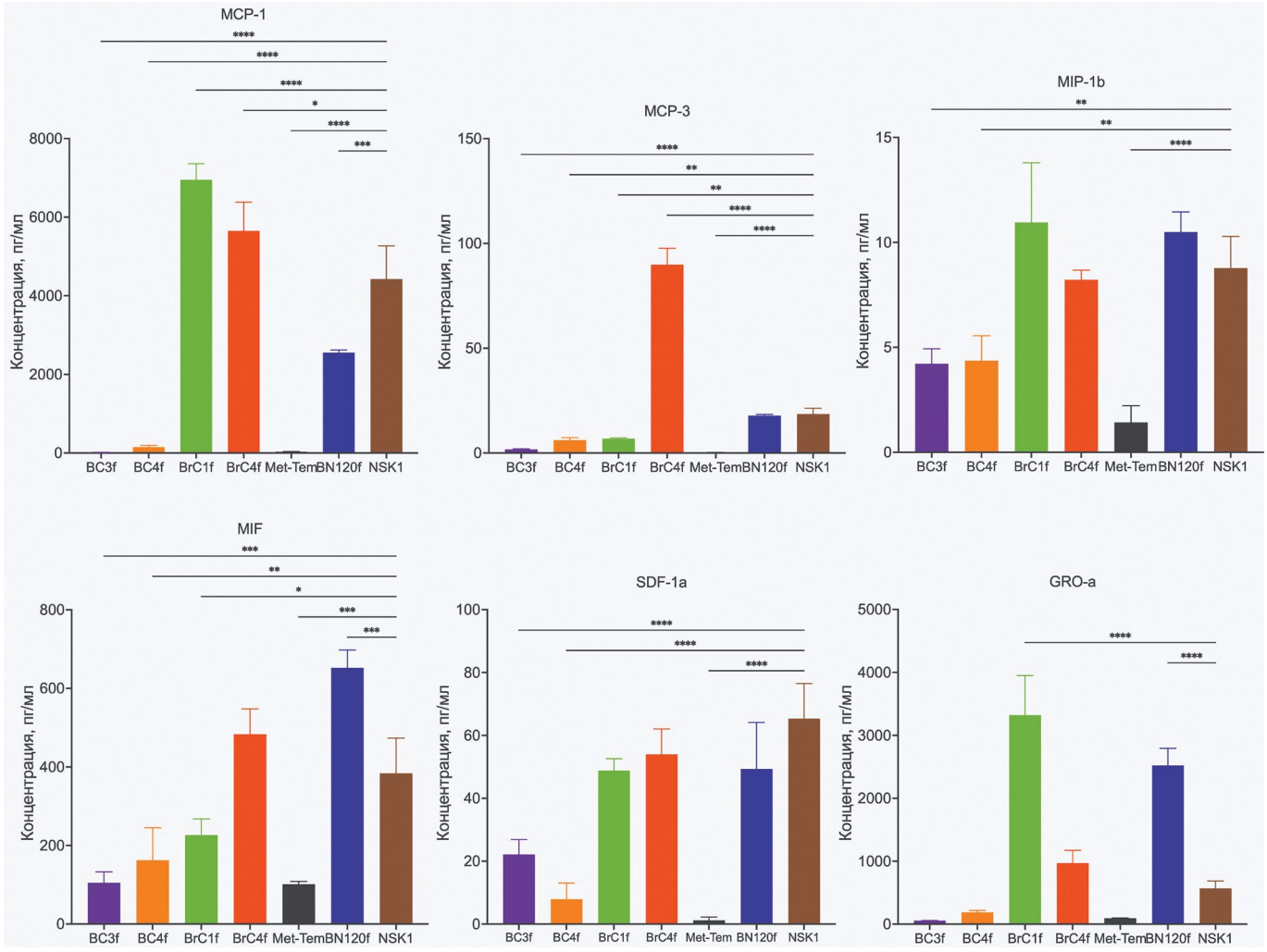


Рис. 7. Секреторный профиль хемокинов, регулирующих клеточную миграцию, в кондиционированной среде стромальных сфероидов. (Уровни секреции хемокинов (пг/мл) стромальных сфероидов клеток разных линий.) Различия с данными для NSK1 достоверны при $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ и $****P < 0.0001$

Секреторный профиль клеток BC3f сочетает черты инвазивного и воспалительного фенотипов ОАФ. Клетки продемонстрировали селективное повышение (пг/мл) SCGFβ (1751.6 ± 95.5), но сниженную секрецию других факторов инвазии/роста/ангиогенеза (пг/мл): HGF (10.0 ± 0.6) и bFGF (14.0 ± 1.7). На фоне повышенных уровней IL-6 (985 ± 155) и IL-8 (1583.2 ± 727.3) пг/мл другие провоспалительные цитокины были снижены: IL-1α (0.6 ± 0.4), IL-1β (1.2 ± 0.5) и TNFα (7.7 ± 3.3) пг/мл.

Клетки BC4f на фоне остальных выделялись доминированием хемотаксической функции и отличалась комбинацией высокой секреции факторов (пг/мл) GRO-α (189.3 ± 29.3), MCP-1 (149.5 ± 45.5), MIF (162.6 ± 82.6), IL-8 (1676.3 ± 337.6) и SCGFβ (5009.7 ± 1381) при базальном уровне секреции VEGF (18.1 ± 3.9) и SDF-1α (7.9 ± 5.1) пг/мл.

Клетки BrC1f имели профиль, способный поддерживать хроническое воспаление и обеспечивать привлечение мононуклеарных клеток. Наблюдалась высокая секреция IL-6 (28971.5 ± 7914.6), наивысшая из всех ОАФ секреция IL-8 (5382.6 ± 132.8), GRO-α (3322.4 ± 627.6 пг/мл) и MCP-1 (6952.1 ± 407.5) пг/мл, а также значительная продукция моноцитарно-макрофагальных хемокинов LIF (1937.3 ± 84.5, MIF (226.3 ± 41.3) и SCGFβ (1448.4 ± 47.5) пг/мл.

Профиль секреции цитокинов/хемокинов клетками BrC4f указывает на их высокоагрессивный многофункциональный фенотип. Линия характеризовалась максимальными среди всех ОАФ уровнями G-CSF (20713.72 ± 7436.89), HGF (153.1 ± 57.4), VEGF (54.0 ± 9.5), а также значительной секрецией MCP-1 (5653.1 ± 729.5), SCGFβ (8377.3 ± 1344.2) и присутствием IL-1rα (95.0 ± 10.4) пг/мл.

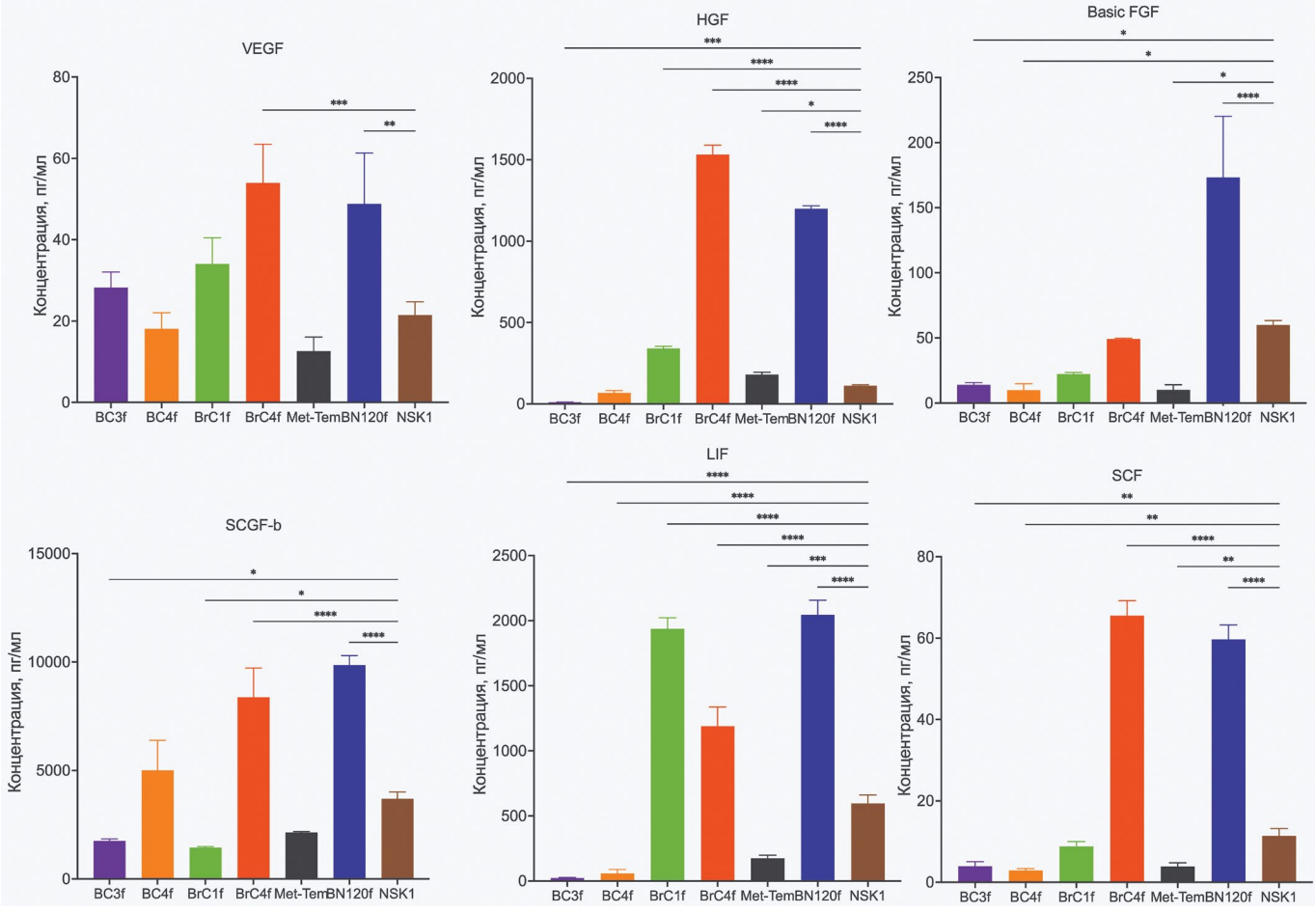


Рис. 8. Уровни секреции (пг/мл) ключевых белковых факторов, регулирующих ремоделирование ткани, измеренных в кондиционированных средах стромальных сфероидов клеток разных линий. Различия с данными для NSK1 достоверны при $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ и $****P < 0.0001$

В противоположность этому, линия Met-Tem показала минимальную паракринную активность с уровнями большинства медиаторов, сопоставимыми или ниже, чем у клеток NSK1, за исключением умеренно повышенных G-CSF (136.9 ± 41.4), HGF (179.6 ± 15.6) и IL-8 (339.3 ± 146.7) пг/мл.

Выявление доминирующих медиаторов для каждой линии ОАФ может служить основой для разработки комбинированного подхода к противоопухолевой терапии и персонализированному подходу, направленному на блокирование конкретных опухолевых цитокиновых сигналов от стромального микроокружения.

Таблица 2. Ключевые секреторные паттерны в культуральных супернатантах через 5 сут культивирования фибробластов в сфероидной модели

Клетки	Ключевые характерные маркеры
BC3f	VEGF (8×), SCGFβ, IL-6, IL-8
BC4f	GRO-α, MCP-1, MIF, IL-8, SCGFβ
BrC1f	IL-6, IL-8, GRO-α, MCP-1, LIF, MIF, SCGFβ
BrC4f	G-CSF (140×), HGF (13×), VEGF (19×), MCP-1
Met-Tem	G-CSF, HGF IL-8
BN120f	G-CSF (1000×), HGF (11×), VEGF (20×), bFGF, IL-8, MIP-1α (20×)
NSK1	IL-6, MCP-1, IL-8, SDF-1α, SCGFβ

Примечание. В скобках указана кратность повышения относительно клеток NSK1.

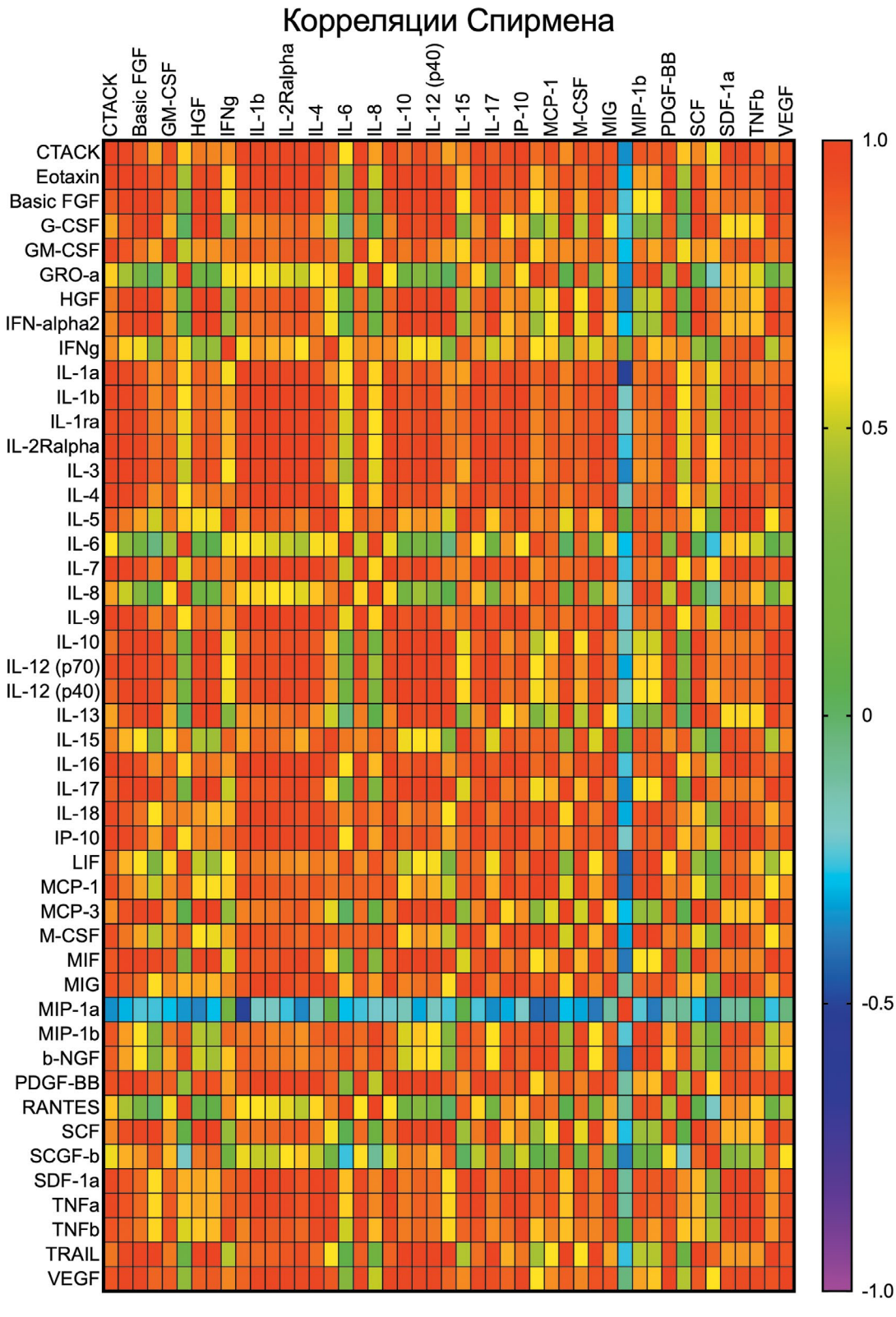


Рис. 9. Корреляции Спирмена для массива цитокинов и хемокинов мультиплексной панели скрининга, показывающей относительное кратное изменение внеклеточной секреции цитокинов/хемокинов человека для культур клеток популяций ОАФ, культивируемых в 3D модели. Справа показана цветовая шкала значений

ОБСУЖДЕНИЕ

Микроокружение опухоли (МОО) играет решающую роль в прогрессировании рака, метастазировании, уклонении от иммунного ответа и резистентности к лечению (Almazrouei et al., 2025). МОО представляет собой богатую смесь клеток, обладающих различными функциями и по-разному влияющих на рост и прогрессию опухоли. Прогрессирование опухоли связано с уплотнением ВКМ, вызванным фиброзом (Quintela-Fandino et al., 2024). Фиброзное микроокружение опухоли формируется при центральном участии ОАФ (Guerrero-Barbera et al., 2024), которые, однако, не являются однородной популяцией, а имеют различные происхождение, фенотипы и функции (Yang et al., 2025). Таргетирование ОАФ является привлекательной стратегией борьбы с раком, и существует множество клинических испытаний, направленных на снижение активации фибробластов, модуляцию их активности, либо перепрограммирование в состояние нормальных фибробластов (Sahai et al., 2020). Однако клиническая модуляция фенотипов ОАФ остается сложной задачей из-за их биологической гетерогенности (Cheng et al., 2025).

Доклинические исследования показали, что неправильное таргетирование ОАФ приводит не к подавлению роста опухоли, а ее прогрессии, поскольку различные субпопуляции ОАФ могут оказывать и про-, и противоопухолевое действие (Saputra et al., 2025). Таким образом, полное понимание роли различных субпопуляций ОАФ, а также клеточной динамики может иметь важное значение для разработки новых методов лечения и улучшения клинических результатов. Для решения таких задач необходимо иметь эффективную и трансляционную модель стромы. Стандартно для моделирования взаимодействия ОАФ и опухоли *in vitro* были разработаны модели клеточных линий ко-культур, но они сосредоточены на характеризации взаимодействий опухоль-строма (Vakhshiteh et al., 2023; Leonteva et al., 2025, 2026; Piwocka et al., 2025; Wang et al., 2025). Такая модель малопригода для изолированной оценки прямого вклада конкретного подтипа ОАФ в ремоделирование ВКМ и формирование фиброза, поскольку наблюдаемые эффекты являются результатом сложной суммы межклеточных сигналов.

Для повышения достоверности и трансляционного потенциала исследований необходимо применять максимально охарактеризованные модели ОАФ. Стандартизация и глубокий фенотипический анализ клеточных линий позволят повысить физиологическую релевантность моделей и обеспечить успешный переход к клиническим исследованиям. На основе стромальных клеток, выделенных из опухолей молочной железы, ранее сформирована панель культур клеток, охарактеризованных как четыре различных подтипа ОАФ (S1–S4) по классификации Косты (Costa et al., 2018; Ilyina et al., 2025).

Высокая степень фиброза в ткани молочной железы тесно связана с выраженной инвазивностью и высокой злокачественностью опухоли. Степень фиброза может рассматриваться как очень важный и информативный патологический признак рака молочной железы (Li et al., 2019). Отсутствие реалистичной модели *in vitro* препятствует исследованию механизмов фиброза, при этом монослойная культура фибробластов, которая является стандартом, имеет ограниченную применимость. Одним из вариантов клеточных моделей являются сфероиды (Abdurakhmanova et al., 2025). Чаще всего исследователи сосредотачиваются на добавлении ОАФ и изучении их функциональности с точки зрения влияния на опухолевые клетки (Leonteva et al., 2025, 2026). В настоящем исследовании, напротив, оценена способность фибробластов образовывать сфероиды в качестве клеточной модели фиброза. Все культуры ОАФ и здоровых клеток эффективно образовывали сфероиды (рис. 2), и клетки в этой модели оставались жизнеспособными в течение 7 сут без образования некротического ядра (Leonteva et al., 2025). Данный подход позволил сосредоточиться на внутренних свойствах фибробластов разных подтипов.

Фибриллы фибронектина служат важнейшим связующим звеном между клетками и окружающей средой, особенно при фиброзных заболеваниях (Dalton et al., 2021). Фибронектин является основным компонентом мезенхимного компартмента молочной железы и претерпевает значительные изменения в процессе развития опухоли (Li et al., 2017). Фибронектин не экспрессируется в нормальной ткани молочной железы взрослых, тогда как в строме опухолей молочной железы наблюдается повышение уровня мРНК и белка (Ioachim et al., 2002). Особое значение при этом приобретают онкофетальные изоформы фибронектина, содержащие дополнительные EDA- и (или) EDB-домены, которые практически не обнаруживаются в ткани нормальной молочной железы взрослых, но реэкспрессируются в опухолях (Schiefner et al., 2012; Lemanska-Perek et al., 2019). Анализ с помощью Вестерн-блотинга показал наличие двух изоформ белка фибронектина с молекулярными массами 272 кДа и 250 кДа (рис. 3) (Leonteva et al., 2026). Изоформа фибронектина с молекулярной массой 272 кДа была характерна для всех монотипических сфероидов из фибробластов, но при этом ее уровень варьировал между различными субпопуляциями. Вариабельность уровня ее синтеза в разных культурах стромальных клеток отражает гетерогенность популяции ОАФ и их различный вклад в ремоделирование опухолевой стромы и прогрессирование рака (Spada et al., 2021).

Инвазия и метастазирование рака являются ключевыми событиями, которые превращают локально растущую опухоль в системное, метастатическое и угрожающее жизни заболевание (Li et al., 2025b). Начальные этапы локальной инвазии включают активацию сигнальных путей, контролирующих динамику цитоскелета в опухолевых клетках и изменения межклеточных соединений, за которыми следует активная миграция опухолевых клеток в прилегающие ткани (Friedl et al., 2011). В зависимости от типа клетки и тканевого окружения миграция может осуществляться двумя основными способами: индивидуально, когда межклеточные соединения отсутствуют,

или коллективно в виде многоклеточных групп, когда сохраняется межклеточная адгезия (Wu et al., 2021).

Линии BC3f, BC4f и BrC4f демонстрировали индивидуальный тип миграции, при котором сфероид быстро терял целостность, и клетки мигрировали поодиночке (рис. 4). Для линий BrC1f, Met-Tem и BN120f был характерен коллективный тип с формированием многоклеточных инвазивных выступов. Контрольные клетки NSK1 проявляли минимальную активность к инвазии и миграции, в отличии от здоровых клеток молочной железы BN120f. Клетки BC3f, BC4f и BrC4f описаны как иммуносупрессивные (BC3f, BC4f) и матрикс-моделирующие (BrC4f) типы ОАФ, обеспечивающие максимальное расположение по всему объему опухоли, что может объяснять их поведение — полное разрушение структуры сфероида и формирование множественных не удлиненных инвазивных отростков. При этом клетки BrC1f (стволовоподобные/прогениторные) и Met-Tem (метастазирующие) сохраняют структуру сфероида и образуют удлиненные инвазивные отростки, которые обеспечивают формирование тяжей для последующей коллективной миграции опухолевых клеток. Для здоровых клеток NSK1 характерно отсутствие инвазивной и миграционной активности, что обеспечивает их физиологическое поведение и поддержание гомеостаза ткани. При этом для здоровых клеток молочной железы BN120f, наоборот, характерна активизация миграционных и инвазивных свойств, что может быть связано с их физиологической пластичностью и ролью в динамическом ремоделировании ткани.

Проведенный мультиплексный анализ секретома не только подтвердил гетерогенность ОАФ на уровне паракринных сигналов, но и позволил расширить классификацию исследуемых линий по их функциональной специализации (табл. 2). Полученные данные служат экспериментальным подтверждением концепции функциональной гетерогенности ОАФ, предложенной Костой (Costa et al., 2018).

Профиль клеточной линии BC3f, характеризующийся высокой секрецией SCGF-β на фоне умеренного воспалительного сигнала (IL-6, IL-8), предполагает ее специализацию на ремоделировании стромы и васкулогенезе. SCGF-β может способствовать поддержанию пула прогениторных и стволовых клеток в нише (Zhang et al., 2025). Такой профиль согласуется с S3-типом ОАФ, играющим роль в создании пермиссивного МОО для локальной инвазии и роста, возможно, через механизмы, связанные с гипоксией и активацией HIF-путей (Pietras, Ostman, 2010).

Демонстрирующая доминирование хемокинов линия BC4f с высокими уровнями GRO-α (CXCL1) и MCP-1 (CCL2) предположительно рекрутирует преимущественно нейтрофилы и моноциты. Нейтрофилы, привлеченные лигандами хемокиновых рецепторов CXCR2 (GRO-α, IL-8), могут способствовать метастазированию и формированию преметастатической ниши (Wculek, Malanchi, 2015).

Высокий уровень MCP-1 у клеток BrC1f, сопровождаемый чрезмерной секрецией IL-8 и IL-6, указывает на способность к привлечению и поляризации опухоль-ассоциированных макрофагов, что является основной причиной иммуносупрессии и хронического воспаления в МОО (Qian, Pollard, 2010). Данный аналог цитокинового шторма создает условия для дезорганизованного, но неэффективного иммунного ответа, что способствует прогрессии опухоли.

Линии клеток BrC4f и BN120f представляют наиболее агрессивный фенотип, сочетающий инициаторы ангиогенеза (VEGF), инвазии (HGF), миелопоэза и нейтрофильного рекрутинга (G-CSF), а также хемотаксиса (MCP-1, MIP-1α). HGF, активируя путь c-Met в опухолевых клетках, является ключевым фактором эпителиально-мезенхимного перехода, инвазии и метастазирования (Nakamura, Mizuno, 2010). Особенно интересен профиль BN120f — фибробластов, изолированных из гистологически нормальной ткани молочной железы. Их высокая (>1000-кратная) секреция G-CSF, а также высокие уровни HGF и MIP-1α свидетельствуют о глубоком и, возможно, необратимом репрограммировании в проопухолевое состояние. Это согласуется с концепцией «обученного» или активированного микроокружения, где даже нормальные по происхождению стромальные клетки под воздействием системных или локальных сигналов опухоли приобретают свойства, способствующие онкогенезу на самых ранних этапах (McAllister, Weinberg, 2014; Alkasalias et al., 2018). G-CSF может системно менять миелоидный ландшафт, способствуя появлению иммуносупрессивных нейтрофилов и миелоидных супрессорных клеток (Moses, Brandau, 2016). С практической точки зрения это подчеркивает критическую важность тщательного выбора и валидации контрольных образцов в исследованиях ОАФ.

«Спящий» профиль Met-Tem по всей видимости отражает стратегию избегания «иммуного надзора», что способствует успешному формированию метастаза в отдаленном органе (Li et al. 2020). Низкие уровни классических провоспалительных цитокинов позволяют в таком случае избежать распознавания иммунными клетками и успешно сформировать метастаз (Gupta et al., 2023).

Секреторный профиль нормальных фибробластов кожи века NSK1 служит важным референсом. Их сбалансированная продукция IL-6, MCP-1 и SDF-1α отражает роль в поддержании тканевого гомеостаза, ответе на повреждение и иммунном надзоре (Kalluri, 2016). Резкий контраст между этим профилем и гиперсекреторным состоянием ОАФ наглядно демонстрирует масштаб патологического перепрограммирования клеток микроокружения.

Полученные результаты подтверждают, что ОАФ представляют собой совокупность функционально специализированных подтипов, паракринные особенности которых потенциально соответствуют различным стадиям опухолевой прогрессии или различным функциональным стромальным очагам внутри МОО. Выявление доминирующих паракринных медиаторов, характерных для

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

54. *Sahai E., Astsaturov I., Cukierman E., DeNardo D.G., Egeblad M., Evans R.M., Fearon D., Greten F.R., Hingorani S.R., Hunter T., Hynes R.O., Jain R.K., Janowitz T., Jorgensen C., Kimmelman A.C. et al.* 2020. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. Nat. Rev. Cancer. V. 20. P. 174. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1

55. *Saputra E., Vellarikkal S.K., Li L., Sun H., Nguyen K., Montano A., Natarajan S., Piccioni F., Tamburino A.M., Yu X., Olow A.K.* 2025. *In vitro* models of cancer-associated fibroblast heterogeneity uncover subtype-specific effects of CRISPR perturbations. Mol. Oncol. Art. ID: 70153. https://doi.org/10.1002/1878-0261.70153

56. *Schiefner A., Gebauer M., Skerra A.* 2012. Extra-domain B in oncofetal fibronectin structurally promotes fibrillar head-to-tail dimerization of extracellular matrix protein. J. Biol. Chem. V. 287. P. 17578. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303131

57. *Spada S., Tocci A., Di Modugno F., Nistico P.* 2021. Fibronectin as a multiregulatory molecule crucial in tumor matrisome: from structural and functional features to clinical practice in oncology. J. Exp. Clin. Cancer Res. V. 40. P. 102. https://doi.org/10.1186/s13046-021-01908-8

58. *Tian Y., Yang Y., He L., Yu X., Zhou H., Wang J.* 2025. Exploring the tumor microenvironment of breast cancer to develop a prognostic model and predict immunotherapy responses. Sci. Rep. V. 15. P. 12569. https://doi.org/10.1038/s41598-025-97784-9

59. *Vakhshiteh F., Bagheri Z., Soleimani M., Ahvaraki A., Pournemat P., Alavi S.E., Madjd Z.* 2023. Heterotypic tumor spheroids: a platform for nanomedicine evaluation. J. Nanobiotechnol. V. 21. P. 249. https://doi.org/10.1186/s12951-023-02021-y

60. *Wang L., Kwon S., Park S., Namkoong E., Kim J., Sim H.Y., Sharker S.M., Lee S.W.* 2025. Biomimetic salivary gland cancer spheroid platform for *in vitro* recapitulation of three-dimensional tumor-stromal interactions. Biomolecules. V. 15. Art. ID: 1634. https://doi.org/10.3390/biom15121634

61. *Wculek S.K., Malanchi I.* 2015. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. Nature. V. 528. P. 413. https://doi.org/10.1038/nature16140

62. *Wu J.S., Jiang J., Chen B.J., Wang K., Tang Y.L., Liang X.H.* 2021. Plasticity of cancer cell invasion: patterns and mechanisms. Transl. Oncol. V. 14. Art. ID: 100899. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100899

63. *Yang J., Xin B., Wang X., Wan Y.* 2025. Cancer-associated fibroblasts in breast cancer in the single-cell era: opportunities and challenges. Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer. V. 1880. Art. ID: 189291. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2025.189291

64. *Zhang C., Pan T., Zhang Y., Wu Y., Zuo A., Liu S., Ba Y., Liu B., Yang S., Chen Y., Xu H., Luo P., Cheng Q., Weng S., Liu L. et al.* 2025. Cancer-associated fibroblasts enhance colorectal cancer lymphatic metastasis via CLEC11A/LGR5-mediated WNT pathway activation. J. Clin. Invest. V. 135. Art. ID: e194243. https://doi.org/10.1172/JCI194243