УДК 57.085.23
DOI: 10.7868/S3034606126030079

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ВВЕДЕНИЕ ХИМИОПРЕПАРАТОВ ПРИ 2D- И 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИИ

С. А. Титова[1, *], И. А. Рахов[1, 3], М. В. Улитко[1], Х. Х. Турсунов[2], И. Г. Данилова[1, 3]

[1] *Уральский федеральный университет имени первого президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, 620002, Российская Федерация*

[2] *Андижанский государственный медицинский институт, Андижан, 170100, Узбекистан*

[3] *Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, 620049, Российская Федерация*

** E-mail: titova.svetlana@urfu.ru*

Аннотация. **Обоснование**. Для изучения патогенеза рака молочной железы и тестирования новых терапевтических подходов все шире применяются клеточные модели, среди которых особое значение имеют 2D- и 3D-культуры. Результаты, полученные на 2D- и 3D-моделях, могут существенно различаться, что требует обязательного сопоставления и анализа корреляции данных между этими системами для повышения достоверности выводов и прогнозирования результатов *in vivo*. **Цель работы** состояла в оценке эффективности влияния цитостатиков доксорубицина и камптотецина на клетки рака молочной железы в зависимости от используемой экспериментальной системы (2D- и 3D-культивирования). **Методика.** Использовали культуру клеток линии MCF-7. Оценивали жизнеспособность клеток по окрашиванию трипановым синим и МТТ-тесту, адгезивные свойств, а также динамику размера сфероидов. **Результаты.** Камптотецин значительно снижает жизнеспособность клеток в условиях 2D-культивирования, тогда как доксорубицин не меняет ее. В 3D-культуре оба препарата снижают жизнеспособность клеток и угнетают адгезивные свойства сфероидов. На третьи сутки культивирования в присутствии препаратов наблюдается полная деструкция сфероидов. **Выводы.** В условиях 2D- и 3D-культивирования чувствительность клеток к химиопрепаратам разная, что обусловлено характеристиками микроструктуры окружающей среды клеток. Это подчеркивает необходимость учета особенностей моделей при разработке тестов и выборе оптимальных условий скрининга потенциальных антираковых агентов.

Ключевые слова: рак молочной железы, карцинома, клетки MCF-7, сфероиды, 3D-культивирование, доксорубицин, камптотецин

Принятые сокращения: АО — акридиновый оранжевый**,** ДМСО — диметилсульфоксид; РМЖ — рак молочной железы.

Финансирование работы. Работа выполнена за счет средств бюджета Института естественных наук и математики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина (Екатеринбург, Россия). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Соблюдение этических стандартов. В работе отсутствуют эксперименты с участием человека или животных в качестве объектов исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ссылка для цитирования. Титова С. А., Рахов И. А., Улитко М. В., Турсунов Х. Х., Данилова И. Г**.** Особенности реакции клеток рака молочной железы на введение химиопрепаратов при 2D- и 3D-культивировании. Цитология / Cell and Tissue Biology. 2026. Т. 68. № 3. С. 308–321. doi: 10.7868/S3034606126030079

Поступила в редакцию: 03.12.2025
После доработки: 24.03.2026
Принята к публикации 01.04.2026

© Титова С. А., Рахов И. А., Улитко М. В., Турсунов Х. Х., Данилова И. Г**.**, 2026

ЦИТОЛОГИЯ / CELL AND TISSUE BIOLOGY, 2026, том 68, № 3, с. 308—321

DOI: 10.7868/S3034606126030079

Characterization of a Three-Dimensional Cell Model of Breast Cancer in Vitro

S. A. Titova[a, *], I. A. Rakhov[a, c], M. V. Ulitko[a], H. H. Tursunov[b], I. G. Danilova[a, c]

[a] *Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, 620062, Russian Federation*

[b] *Andijan State Medical Institute, Andijan, 170100, Uzbekistan*

[c] *Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*

** E-mail: titova.svetlana@urfu.ru*

Abstract. **Objective:** Cell models are increasingly being used to study the pathogenesis of breast cancer and test new therapeutic approaches, among which 2D and 3D cultures are of particular importance. Results obtained from 2D and 3D models can differ substantially, necessitating mandatory comparison and correlation analysis of data between these systems to enhance the reliability of conclusions and predict *in vivo* outcomes. **The aim** of this study was to evaluate the efficacy of the cytostatic drugs doxorubicin and camptothecin on breast cancer cells, depending on the experimental system used (2D and 3D culturing). **Methods:** MCF-7 cell line culture was used. Cell viability was assessed by trypan blue staining and MTT assay, adhesive properties, and spheroid size dynamics. **Results:** Camptothecin significantly reduced cell viability in 2D culture conditions, whereas doxorubicin did not alter it. In 3D culture, both drugs reduced cell viability and inhibited the adhesive properties of spheroids. On the third day of culturing in the presence of the drugs, complete spheroid destruction was observed. **Conclusions:** The sensitivity of cells to chemotherapeutic agents differs under 2D and 3D culturing conditions, which is attributed to the microstructural characteristics of the cellular environment. This highlights the necessity of considering model-specific features when developing assays and selecting optimal conditions for screening potential anticancer agents.

Keywords: breast cancer, carcinoma, MCF-7 cells, spheroids, 3D cell culture, doxorubicin, camptothecin

Funding: This work was supported by ongoing institutional funding (the First President of Russia Yeltsin Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia). No additional grants to carry out or direct this particular research were obtained.

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

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

For citation. Titova S. A., Rakhov I. A., Ulitko M. V., Tursunov H. H., Danilova I. G. Characterization of a three-dimensional cell model of breast cancer *in vitro.* Tsitologiya / Cell and Tissue Biology. 2026. V. 68. No. 3. P. 308—321. doi: 10.7868/S3034606126030079

Received December 03, 2025
Revised March 24, 2026
Accepted April 01, 2026

© Titova S. A., Rakhov I. A., Ulitko M. V., Tursunov H. H., Danilova I. G., 2026

По данным ВОЗ, в мире на 2022 год было зарегистрировано около 2.3 миллиона новых случаев заболевания раком молочной железы (РМЖ), что составило 23.8% от всех случаев рака среди женщин (Sung et al., 2021). По глобальным демографическим прогнозам эта заболеваемость будет увеличиваться (Bloom, Richardson,1957; Zhang et al., 2025).

В настоящее время созданные модели опухолей *in vitro* предоставляют платформу для изучения не только патогенеза самой опухоли, но и скрининга новых противоопухолевых лекарственных препаратов. Модели опухолей делятся на двумерные (2D) и трехмерные (3D). 2D-система клеточных культур *in vitro* — это традиционное культивирование клеток в монослое и в онкологических исследованиях используется в качестве инструмента для оценки биологической активности лекарственных веществ (Breslin, O'Driscoll, 2013). Широта использования данной модели связана с простотой получения культуры клеток, более легким измерением конкретных параметров клеток, сокращением времени проведения эксперимента. С другой стороны, этот тип культуры имеет множество ограничений, поскольку он не может отражать пространственное строение опухоли, а в условиях микроокружения в 2D-культурах может искусственно индуцироваться гипоксия и дефицит питательных веществ, влияющих на морфофункциональное строение клеток. (Imamura et al., 2015; Costa et al., 2016).

С увеличением срока культивирования исчезает характерная для раковых клеток гетерогенность. Характер взаимодействий между клетками в 2D-культуре отличается от такового в условиях *in vivo*, поскольку клетки адаптируются и плохо сохраняют свой исходный фенотип (Baker, Chen, 2012; Sia et al., 2015; Chen et al., 2022). Кроме того, пространственные и физические свойства 2D-культур влияют на передачу сигналов внутри и между клетками и, в конечном счете, на экспрессию генов и поведение клеток (Baker et al., 2012; Shu et al., 2024). Клетки, культивируемые в 2D, вынуждены изменять различные сложные биологические функции, такие как инвазия клеток, апоптоз, транскрипционная регуляция и экспрессия рецепторов, пролиферация клеток и антиапоптоз (Liu et al., 2015). Все вышеизложенное способствовало сдвигу парадигмы в моделировании рака от 2D- к 3D-системам культивирования раковых клеток, а 3D-сфероиды используются для тестирования лекарственных средств, заменяя тем самым дорогостоящие эксперименты с использованием лабораторных животных (Martin et al., 2008; Fong et al., 2016; Hong, Song, 2022; Zhang et al., 2023).

Считается, что по сравнению с 2D-моделями, экспрессия генов, пролиферация, миграция и инвазия клеток, их морфология и гетерогенность в 3D-моделях ближе к ситуации *in vivo* (Zanoni et al., 2016; Shukla et al., 2024). Более того, такой новый тип культуры будет постепенно развиваться и использоваться для лучшей оценки биологических и молекулярных путей во время злокачественной трансформации (Habanjar et al., 2021) Благодаря своей трёхмерной организации сфероиды могут имитировать опухолевые области, содержащие как пролиферирующие, так и некротические клетки (Froehlich et al., 2016). Сфероиды легко воспроизводятся, состоят из одного типа клеток, что максимально упрощает процесс тестирования. Кроме того, в настоящее время используются сфероиды, состоящие из различных типов клеток, воспроизводящих микроокружение опухоли. Они перспективны для изучения нескольких аспектов клеточной биологии клеток опухоли: метаболизма, апоптоза, некроза, пролиферации, дифференцировки, ангиогенеза и метастазирования (Zhu et al., 2021).

Сфероиды раковых клеток демонстрируют профиль лекарственной устойчивости, аналогичный профилю, обнаруженному в солидных опухолях, а клетки в сфероидах более устойчивы к воздействию химиотерапевтических препаратов, чем клетки в составе монослоя (Han et al., 2010; Frankel et al., 2000; Brajša et al., 2016). Сфероиды могут быть получены из большинства типов опухолей, что позволяет проводить подбор препарата и необходимую его дозу для конкретного пациента наиболее эффективно, способствуя персонифицированному подходу терапии онкологических заболеваний (Kim et al., 2004).

Цель настоящего исследования — оценить токсическое действие химиотерапевтических препаратов доксорубицина и камптотецина на клетки опухоли молочной железы при их 2D- и 3D-культивировании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Используемые клеточные линии. Использовали культуру клеток гормон-зависимой аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, предоставленную ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий». Все операции, связанные с приготовлением растворов, культивированием и обработкой клеток, проводили в стерильных условиях в ламинарном боксе БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 LORICA (Lamsystems, Россия).

Культивирование клеток MCF-7 осуществляли в стерильных флаконах 75 см² («БиолоТ», Россия) с обработанной поверхностью для монослойных культур, в CO_2-инкубаторе Sanyo MCO-18AC (Panasonic, Япония) при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO_2 и 95% влажности с использованием питательной среды Игла DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% амфотерицина B, 0.1% гентамицина (все от «БиолоТ», Россия) до образования монослоя. Смену культуральной среды проводили каждые 2—4 сут. Микроскопический контроль за состоянием культуры осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

При достижении культурой 80—90%-ной конфлюэнтности производили пассирование 1 раз в 3 сут дезинтеграцией монослоя 8-минутной экспозицией в растворе трипсина и версена в соотношении 1:1 («БиолоТ», Россия).

Получение 3D-клеточной модели. Для получения 3D-моделей клеток линии MCF-7 использовали метод автоагрегации клеток на дне лунок из неадгезивного

агарозного геля. Этот метод прост в реализации, позволяет длительное время работать со сфероидами, а также не требует больших финансовых затрат. В качестве неадгезивной поверхности применяли гель на основе агарозы («БиолоТ», Россия), так как она имеет ряд свойств, необходимых для создания 3D-культур. К ним относят, во-первых, большие поры (средний размер 100—300 нм), что позволяет осуществлять замену питательной среды (Moreno Valtierra et al., 2024; Liu et al., 2025), а также обеспечивает доступ для газов и малых молекул. Во-вторых, агароза является оптически прозрачным материалом, поэтому она удобна для микроскопической визуализации сфероидов (Liu et al., 2025, Lan et al., 2025). В-третьих, агарозный гель застывает при комнатной температуре, что позволяет работать в стерильных условиях без существенных затруднений (Согомонян и др., 2022; Le et al., 2024).

Для получения геля брали навеску агара микробиологического («БиолоТ», Россия) 200 мг, переносили в пробирку, затем доводили до 10 мл средой Игла DMEM и разогревали на водяной бане до температуры 80—90 °С до изменения окраски и приобретения однородной маловязкой консистенции, перемешавшая 1 раз в 3—4 мин. Далее в чашки Петри диаметром 35 мм равномерно заливали 5 мл неостывшего геля и плотно накрывая штампом. После полного остывания геля и приобретения им плотной структуры в течение 15 мин аккуратно доставали штамп и накрывали чашку Петри крышкой до добавления клеточной суспензии.

Использующиеся штампы из пластика разработаны и получены в ИИФ УрО РАН средствами программного обеспечения FreeCAD и Chitubox с помощью технологии трехмерной печати. Выбранные штампы создавали в гели цилиндрические лунки диаметром 500 мкм и имели четыре поля по 10 × 10 лунок, общее число лунок на одной матрице — 400. Для работы использовали штампы с цилиндрической формой лунок, так как сфероиды в них прочно удерживались и не перемещались (рис. 1). Штампы стерилизовали помещением в 70%-ный спиртовой раствор на 12 ч с последующим облучением ультрафиолетовым светом в течение 1.5 ч.

Перед посадкой клеток на гель, монослой дезинтегрировали 8-минутной экспозицией в растворе трипсина-версена в соотношении 1:1. Затем считали клетки с оценкой их жизнеспособности с помощью счетчика TC-20 (Bio Rad, Германия). Далее при необходимости разводили полученную суспензию до получения необходимой концентрации клеток на 1 мл. Допустимой считали концентрацию (10^6—1.25) × 10^6 кл./мл. Затем пересаживали клетки на готовую охлаждённую до комнатной температуры агарозную матрицу, предварительно размешивая суспензию пипетированием, и добавляли 1 мл полной питательной среды, закрывали чашку Петри крышкой. Полученную трёхмерную клеточную культуру культивировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO_2 и 95% влажности. В лунках в отсутствие адгезивных поверхностей в течение 3—4 сут клетки формировали

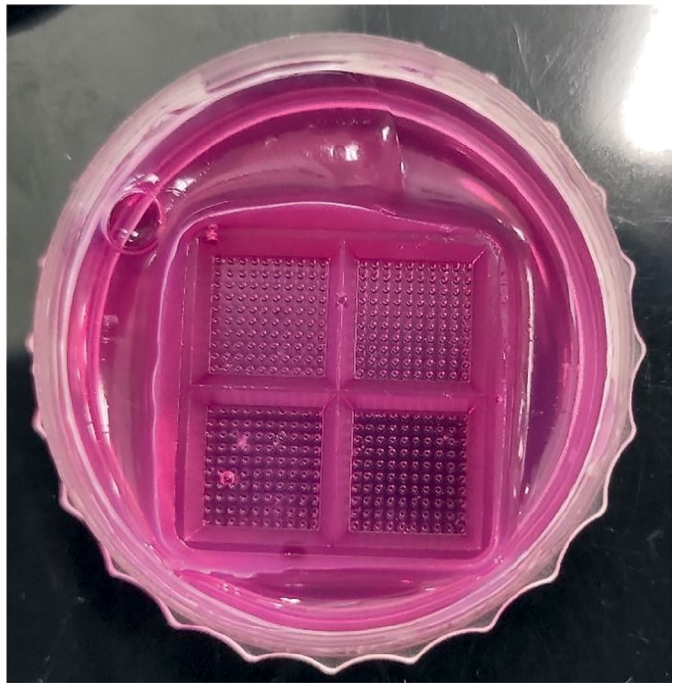


Рис 1. Отпечаток штампа с цилиндрическими лунками в чашке Петри

сфероиды, что согласуется с данными из литературы (Pulze et al., 2020; Chen et al., 2022). Каждые 2 сут удаляли половину среды и добавляли новую.

После культивирования и формирования сфероидов проводили оценку их морфофункционального состояния. Часть сфероидов оставляли в агарозном геле для дальнейшего изучения, другую часть при помощи пипетки Пастера переносили в чашки Петри без агарозного геля для оценки адгезивных свойств.

Оценка жизнеспособности клеток MCF-7 в 2D-культуре. Использовали метод окрашивания клеток трипановым синим. Клетки открепляли от поверхности культуральных флаконов раствором трипсина-версена в соотношении 1:1. По окончании трипсинизации отбирали 100 мкл среды с клетками, добавляли 100 мкл трипанового синего («Биолот», Россия). Далее с помощью счетчика клеток TC-20 (Bio Rad, Германия) считали клетки и оценивали их жизнеспособность (в процентах) по доле окрашенных клеток.

Оценка метаболической активности клеток MCF-7 в 2D-культуре в присутствии доксорубицина и камптотецина. К 2D-культурам MCF-7 добавляли противоопухолевые препараты антибиотик доксорубицин и ингибитор топоизомеразы камптотецин и оценивали их влияние на клетки. Клетки высаживали в 96-луночный планшет (100 мкл клеточной суспензии на 1 лунку) и культивировали в течение 1 сут. Затем в лунки добавляли 50 мкл доксорубицина (в концентраци 1 мкМ) или 10 мкл камптотецина (в концентраци 5 мкМ) и культивировали в течение 72 ч. Для оценки метаболической активности

клеток проводили колориметрический МТТ-тест при длине волны 540 нм. С помощью планшетного ридера определяли оптическую плотность клеток в каждой лунке.

Морфометрия сфероидов MCF-7. Для морфометрии полученных сфероидов проводили замеры их диаметра средствами программного обеспечения ToupView (https://touptekphotonics.com/download/), используя инструмент многоугольник. При этом величину диаметра оценивали через площадь сфероида по формуле:

$$d = 2 \cdot \sqrt{\frac{S}{\pi}}, \quad (1)$$

где d — диаметр, мкм; S — площадь, мкм^2. Степень сферичности, показывающую насколько границы сфероида близки по форме к идеальной окружности, вычисляли по формуле:

$$Sph = \frac{\sqrt{4S\pi}}{P}, \quad (2)$$

где Sph — сферичность; S — площадь сфероида, мкм^2; P — периметр, мкм. Показатель Sph принимает значения от 0 до 1, где 1 — идеальная окружность. Плотными (при микроскопировании) считали сфероиды со значением Sph более 0.8 с темным центром относительно периферии.

Оценка жизнеспособности сфероидов. Сфероиды извлекали из 3D-культуры 10 плотных клеточных агрегатов и переносили в пробирку типа Эппендорф, куда добавляли 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) для отмывания сфероидов от среды. Затем переносили в пробирку с раствором трипсина и проводили их дезинтеграцию в течение 5 мин до разрушения межклеточных связей и образования свободно плавающих клеток. При необходимости разрушали крупные остаточные агрегаты пипетированием автоматической пипеткой. Далее оценивали жизнеспособность клеток с помощью счетчика клеток и трипанового синего.

Характеристика адгезивных свойств сфероидов MCF-7. Для исследования влияния противоопухолевых препаратов на клетки в 3D-культуре оценивали параметр адгезивности. Для этого отбирали 5—7 сфероидов на одну чашку Петри 35 мл в диаметре из лунок агарозной матрицы 3D-культуры в асептических условиях пипеткой Пастера, визуально контролируя процесс с помощью бинокуляра и избегая разрушения сфероидов. Затем пересаживали их в чашку Петри, отбирая неповреждённые, и инкубировали при стандартных условиях.

Начальные этапы адгезии сфероидов определяли микроскопически по прекращению их свободной флуктуации в растворе при действии низкочастотных механических колебаний (проводили тест с легкой перкуссией столешницы, на которой установлен инвертированный микроскоп), а также по появлению первых признаков распластывания (спрединга) клеточного слоя вокруг сфероида (рис. 2). После переноса сфероидов в чашки Петри срок их прикрепления зафиксирован на вторые сутки наблюдения.

После определения времени прикрепления степень дальнейшего распластывания оценивали измерением площади клеточного слоя средствами программного обеспечения ToupView, используя инструмент многоугольник, вычитая из общей площади спрединга площадь сфероида.

Культивирование сфероидов MCF-7 в присутствии доксорубицина или камптотецина. После формирования сфероидов (на 5-е сутки) для оценки влияния противоопухолевых препаратов отбирали 10 сфероидов на одну чашку Петри 35 мл пипеткой Пастера в асептических условиях. Часть сфероидов культивировали в среде Игла DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % амфотерицина В, 0.1 % гентамицина. К другой части чашек добавляли противоопухолевые препараты: 1 мл доксорубицина (10 мкМ) или 200 мкл камптотецина (50 мкМ) на чашку. Конечная концентрация обоих препаратов в чашке Петри составляла 5 мкМ. После прикрепления сфероидов оценивали адгезивные характеристики (время прикрепления и скорость их роста на чашках). Все измерения проводили с помощью программного обеспечения ToupView, предназначенного для работы с цифровыми камерами.

Гистологический анализ. Гистологический анализ проводили на сфероидах через 9 сут культивирования. Необходимые сфероиды забирали стерильной пластиковой пипеткой с агарозной матрицы и помещали в чашку Петри 35 мм, где их дважды отмывали от среды в 1 % растворе формалина (Sigma-Aldrich, Germany). Все дальнейшие манипуляции проводили вне ламинарного бокса в нестерильных условиях. Наиболее округлые сфероиды без повреждений переносили в пластиковую пробирку 5 мл с коническим дном и фиксировали в растворе формалина минимум 48 ч. Выбор конического дна позволяет сфероидам осесть в единой нижней точке, что важно в дальнейших этапах приготовления препарата.

После завершения фиксации сфероиды 3 раза по 15 мин промывали водопроводной водой. Далее для улучшения их визуализации в парафиновом блоке при микротомировании к 5 мл водопроводной воды добавляли 1 каплю (10 мкл) гематоксилина Майера на 15 с и два раза промывали водопроводной водой до исчезновения цвета раствора. После этого, уже в четвертый раз, 15 мин промывали водопроводной водой.

Далее сфероиды заключали в агарозу, откачивая автоматической пипеткой максимум жидкости без их повреждения, нанося на коническое дно со сфероидами жидкий 2 %-ный агарозный гель (0.06 г агарозы на 3 мл воды) и охлаждая 2 мин при 16 °С. Получившийся агарозный конус с заключёнными в нем сфероидами извлекали со дна конической пробирки железным шпателем, избегая его разрушения. От агарозного конуса лезвием отрезали границы, не содержащие сфероидов; при необходимости, если при нанесении жидкой агарозы сфероиды всплывали со дна, образовав несколько близкорасположенных

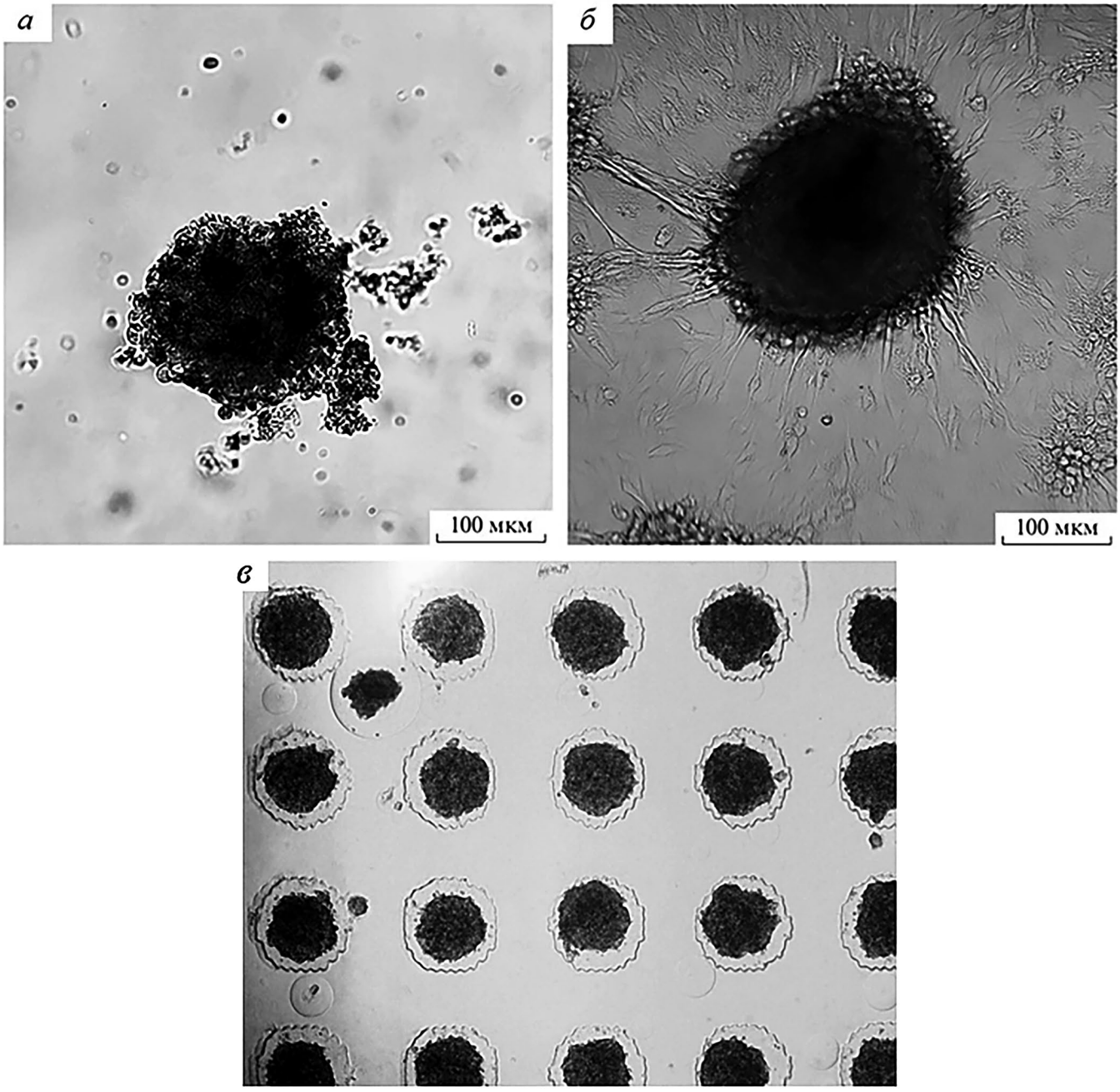


Рис. 2. Сфероид клеток MCF-7 карциномы молочной железы в чашке Петри в первые (*а*) и сфероиды на 5-е (*б*, *в*) сутки культивирования. Увел. об.: 50× (*а*, *б*) и 20× (*в*)

скоплений, их так же отделяли друг от друга лезвием и в дальнейшем из них можно было получить два парафиновых блока.

Блоки окрашивали гематоксилин-эозином (MLT, Россия). Депарафинизацию проводили в 5 этапов по 1 мин: 2 ванны ксилола, 3 ванны 96%-ного спирта. Далее срезы промывали в проточной водопроводной воде 1.5 мин, 7 мин окрашивали гематоксилином, вновь промывали, окрашивали 50 с эозином и вновь промывали. Просветление проводили аналогично депарафинизации: 3 ванны 96%-ного спирта по 1 мин и затем 2 ванны ксилола по 1 мин. Срезы изготавливали с помощью микротома Microm HM 450 (Thermo Fisher Scientific, США). Далее заключали их в канадским бальзам (CDH, Индия). Препараты изучали с помощью микроскопа Olympus CX (Olympus Corp., Япония).

Окрашивание сфероидов MCF-7 флуоресцентным красителем для выделения гипоксической зоны. Окрашивание флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым (АО «СоюзРеактив», СССР) проводили на 20-е сут культивирования сфероидов MCF-7. Предварительно готовили концентрированный (2 мкг/мл) раствор АО: навеску 0.1 г растворяли в 50 мл DMEM без антибиотиков и сыворотки. Стерильной пластиковой пипеткой необходимые сфероиды помещали в чашку Петри и дважды отмывали PBS от сыворотки. Далее концентрированный раствор акридинового оранжевого в 8—10 раз разбавляли DMEM до получения рабочей концентрации акридинового оранжевого 0.25 мкг/мл. Сфероиды окрашивали в этом растворе в темноте в инкубаторе 50 мин при 37 °C. Параллельно проводили инкубирование сфероидов при альтернативных концентрациях акридинового оранжевого (при разведениях в 4 и 16 раз, получая 0.5 и 0.125 мкг/мл соответственно) в течение 50 мин. После завершения окрашивания сфероиды переносили в чашку Петри с PBS и промывали минимум 3 раза до исчезновения оранжевого цвета и предупреждения фоновой флуоресценции. Визуализировали сфероиды с помощью микроскопа Olympus CX (Olympus Corp., Япония) при возбуждении светом ультрафиолетового диапазона длин волн.

Статистический анализ данных. Использовали компьютерную программу Microsoft Excel и Statistica 12. Результаты представлены как среднее значение и его ошибка среднего Для оценки значимости различий между группами использовали критерий Манна—Уитни. Различия между средними значениями считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфофункциональная характеристика сфероидов. В ходе эксперимента и отработки методики были получены сфероиды клеток MCF-7 (рис. 2). Клетки, используемые для получения сфероидов, имели жизнеспособность 95.80 ± 2.22%. Концентрация клеток при посеве на агарозную матрицу составляла 1.23×10^6 кл./мл. Рис. 3 показывает динамику роста сфероидов: в течение 5 сут наблюдается фаза уплотнения сфероида из-за синтеза межклеточного матрикса и образования межклеточных контактов, вследствие чего их диаметр уменьшается с 496.53 ± 2.99 до 365.22 ± 5.50 мкм со скоростью 32.83 ± 5.10 мкм/сут, далее начинается рост диаметра вследствие пролиферативных процессов до 408.18 ± 6.44 мкм на 9-е сут со скоростью 10.74 ± 1.93 мкм/сут, которая в 3 раза меньше скорости уплотнения сфероидов.

На рис. 4*а* показана динамика показателя сферичности MCF-7 сфероидов: в фазе уплотнения и частично фазе

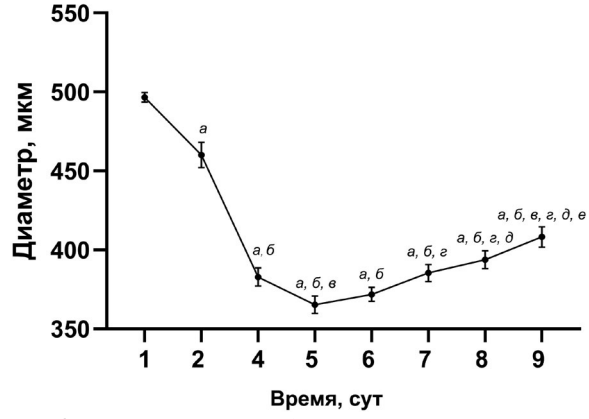


Рис. 3. Динамика роста сфероидов MCF-7. Показаны средние значения и их ошибки. Различия достоверны относительно 1 (*а*), 2 (*б*), 4 (*в*), 5 (*г*), 6 (*д*), 7 (*е*) сут. ($P < 0.05$, $n = 8$ в каждой группе, критерий Крускела–Уоллиса)

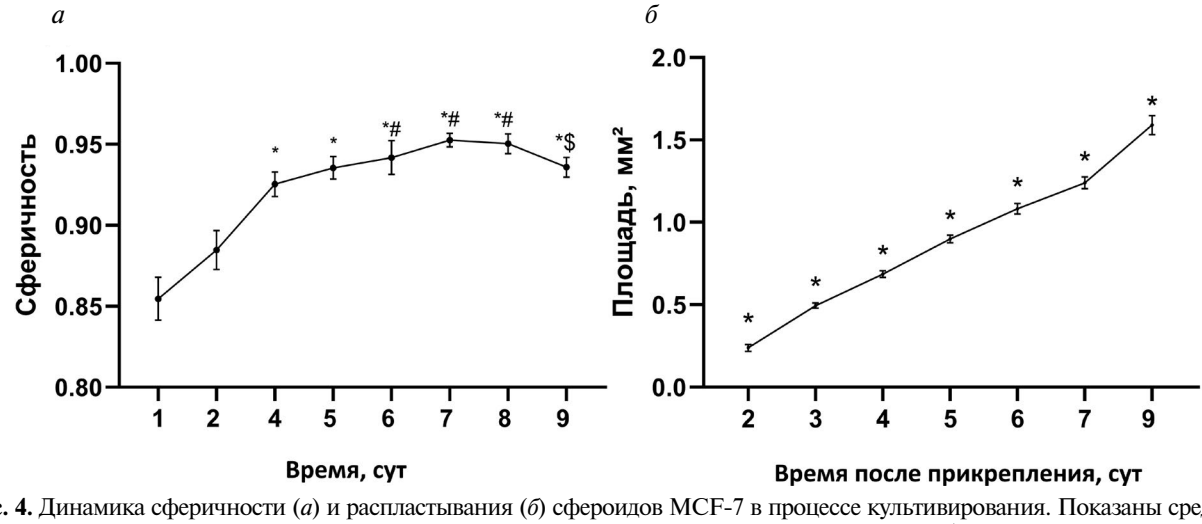


Рис. 4. Динамика сферичности (*а*) и распластывания (*б*) сфероидов MCF-7 в процессе культивирования. Показаны средние значения и их ошибки. *а* — Различия достоверны относительно: 1 и 2 сут (*), 4 (#) и 7 сут ($); *б* — различия достоверны относительно любого другого срока (*). $P < 0.05$, $n = 8$ (*а*) или $n = 7$—10 (*б*) в каждой группе, критерий Крускела–Уоллиса

роста до 7 сут наблюдали рост показателя от 0.855 ± 0.013 до 0.950 ± 0.004 (со скоростью 0.016 ± 0.004/в сут), после он уменьшался до 0.936 ± 0.0061. Критическое значение сферичности 0.8 было достигнуто в первые сутки. Фаза уплотнения сопровождалась образованием ядра сфероида с низкой световой проницаемостью и ухудшением видимости границ клеток, что свидетельствует о возникновении многослойности и трехмерности агрегата.

Результаты проверки адгезивных свойств сфероидов MCF-7 (рис. 4*б*) показали прикрепление ко 2-м сут, скорость роста монослоя из клеток периферического слоя сфероида составила 0.193 ± 0.012 мм^2/сут.

Гистологический анализ сфероидов MCF-7. В ходе исследования были изготовлены постоянные гистологические препараты сфероидов MCF-7. Сфероиды MCF-7 фиксировались 6 сут, что не оказало значимого влияния на их диаметр (503.42 ± 10.84 мкм после фиксации; рис. 5*а*). Не обнаружено и влияния и на сферичность сфероидов (0.952 ± 0.006 после фиксации; рис. 5*б*). Срезы сфероидов, полученные после автоматического заключения образцов в агарозу, показаны на рис. 6*а*.

При измерении диаметра клеток в центре сфероидов MCF-7 и на их периферии (не более 4 слоев клеток от края) получены следующие значения: 64.92 ± 5.89 и 96.09 ± 5.85 мкм^2 соответственно (рис. 6*б*). Полученное различие может объясняться градиентом концентрации питательных веществ и кислорода, недостаточных для роста клеток в центре.

Флуоресценция окрашенных сфероидов MCF-7. Для окрашивания сфероидов MCF-7 использовали краситель АО в трех концентрациях (0.5, 0.25 и 0.125 мкг/мл) и длительность в 50 и 90 мин. При окрашивании 0.5 мкг/мл АО в течение 50 и 90 мин трех промываний недостаточно для устранения высокой фоновой флуоресценции, в то время как концентрации АО 0.25 и 0.125 мкг/мл позволяют окрасить сфероиды в течение 50 и 90 мин без высокой фоновой флуоресценции даже после двух промываний PBS. Качество окраски не зависит от времени

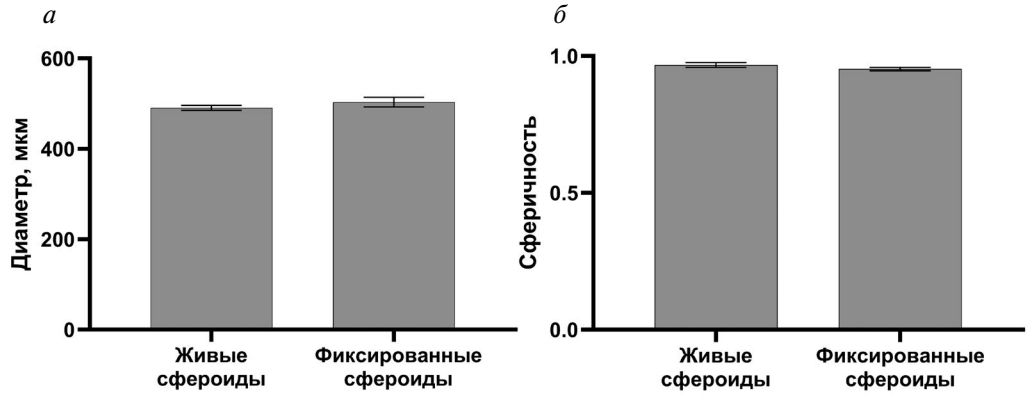


Рис. 5. Диаметр (*а*) и сферичность (*б*) живых и фиксированных сфероидов MCF-7 (n = 17 в каждой группе)

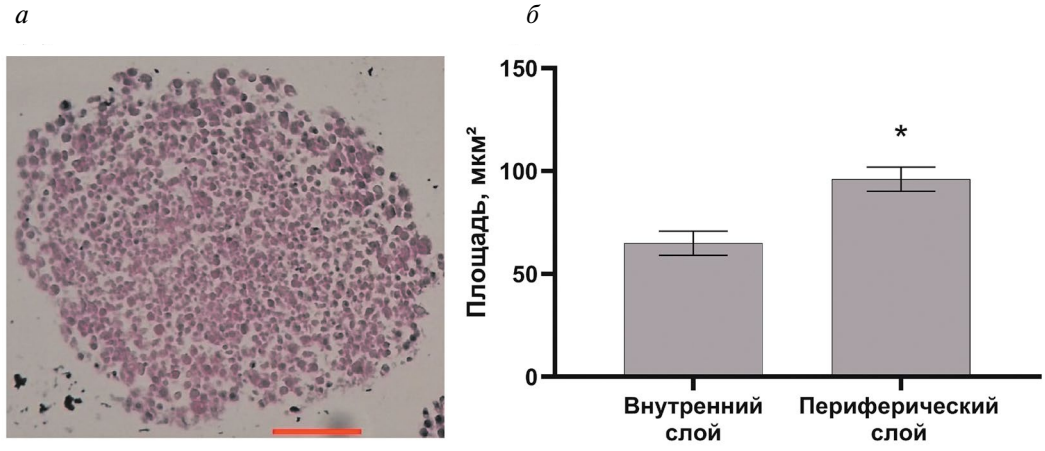


Рис. 6. Гистологические срезы сфероидов MCF-7 (*а*) и площадь, занимаемая клетками, на периферии и в центре сфероидов (*б*). *а*: Масштабная линейка 100 мкм; *б* — средние значения площади и их ошибки, (*) — различия достоверны при $P < 0.05$, n = 30 в каждой группе, критерий Манна–Уитни

окрашивания (50 или 90 мин). Окрашивание АО позволило разделить периферическую и центральную зоны сфероида по различной интенсивности и цвету флюоресценции. Внутренний слой сфероида имеет оранжевый цвет, в то время как периферический — красный. Так как АО связывается с нуклеиновыми кислотами, различная пролиферативная активность слоев может быть причиной дифференциальной окраски (рис. 7).

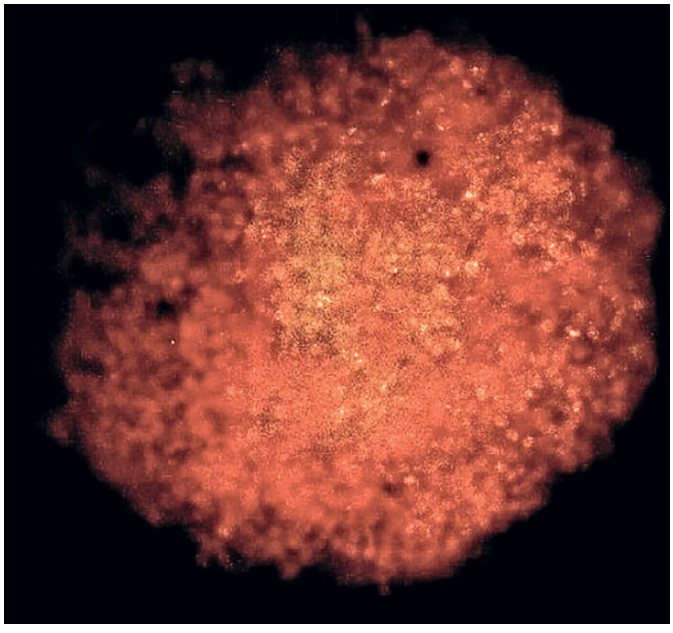


Рис. 7. Сфероиды MCF-7, окрашенные акридиновым оранжевым с гипоксическим ядром оранжевого цвета

Влияние доксорубицина и камптотецина на клетки в 2D-культуре. 2D- и 3D-культуру (сфероиды) клеток MCF-7 использовали в качестве сравнительных экспериментальных моделей для оценки влияния противоопухолевых препаратов доксорубицина и камптотецина. Оценивали воздействие препаратов на жизнеспособность клеток с помощью окрашивания трипановым синим. При культивировании клеток в присутствии камптотецина (в концентрации 5 мкМ) наблюдали статистически значимые различия показателя относительной жизнеспособности клеток по сравнению с контрольной группой (рис. 8). Так, жизнеспособность в контрольной группе составила 76.86 %, тогда как в среде с камптотецином она снизилась до 20.9 % ($P \leqslant 0.05$. Между группами контрольной и с доксорубицином (в концентрации 1 мкМ) статистически значимых различий показателей не обнаружено. Таким образом, камптотецин в отличие от доксорубицина оказывает цитотоксическое действие на клетки MCF-7 в 2D-культуре. Но клетки MCF-7 в 2D-культуре, по-видимому, не чувствительны к доксорубицину.

Влияния доксорубицина и камптотецина на клетки в 3D-культуре. Получены следующие показатели жизнеспособности клеток MCF-7, образующих сфероид: 77.10 ± 2.22 (в контроле), 61.54 ± 3.09 и 68.56 ± 0.98 % в присутствии доксорубицина (10 мкМ) и камптотецина (50 мкМ) соответственно. Отличие действия обоих препаратов от контроля достоверно при $P < 0.05$. Таким образом, добавление противоопухолевых препаратов в полную питательную среду сфероидов приводило к значимому снижению жизнеспособности клеток: на 15.56 % для доксорубицина и на 8.54 % для камптотецина. Более выраженное действие доксорубицина по сравнению с камптотецином может объясняться разными механизмами

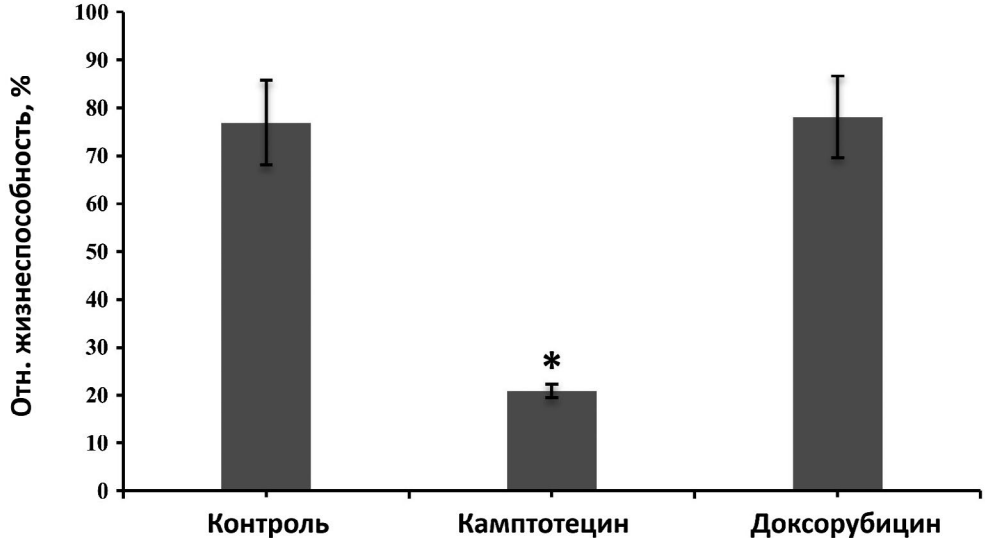


Рис. 8. Относительная жизнеспособность клеток MCF-7 в 2D-модели в присутствии камптотецина (50 мкМ) или доксорубицина (10 мкМ). Показаны средние значения и их ошибки, различие с контролем (*) достоверно при $P < 0.05$, $n = 30$ в каждой группе, критерий Манна–Уитни

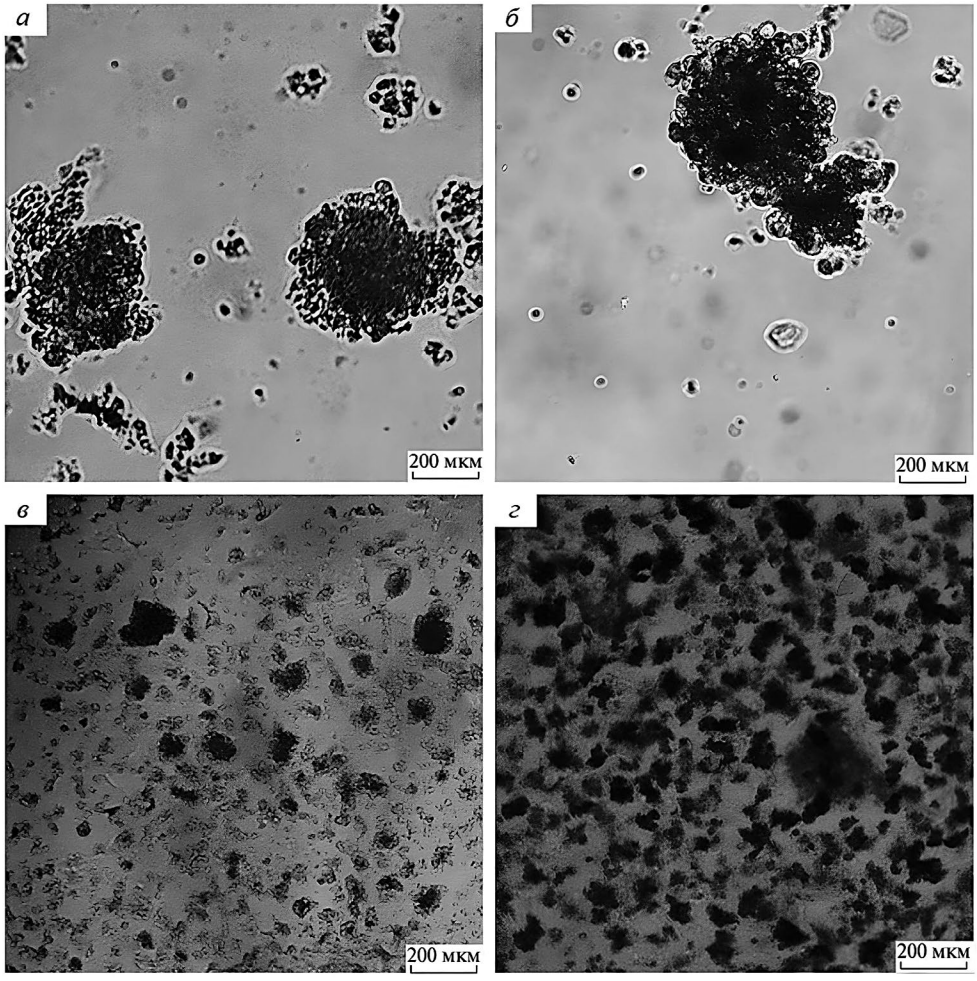


Рис. 9. Клеточные сфероиды клеток MCF-7 при культивировании в присутствии камптотецина или доксорубицина в концентрации 5 мкМ в течение 1 (*а*, *б*) и 3 (*в*, *г*) сут. *а*, *в* — Камптотецин, *б*, *г* — доксорубицин

действия препаратов, а также устойчивостью клеточной линии MCF-7 к последнему) (Fujimori et al., 1996; Sharma et al., 2015; Hong, Song, 2022).

При культивировании сфероидов в присутствии противоопухолевых препаратов (рис. 9*а*, *б*) наблюдали их свободную флуктуацию в растворе при действии низкочастотных механических колебаний (тест с легкой перкуссией столешницы с инвертированным микроскопом). Отмечали частичную деструкцию сфероида: клетки располагались в виде мелких кластеров с потерей шаровидной структуры сфероида. На третьи сутки культивирования в присутствии препаратов наблюдали полную деструкцию сфероидов: клетки располагались рыхло (дискогезивно) в виде мелких кластеров (рис. 9*в*, *г*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на существенный прогресс в онкобиологии, механизмы и детерминанты роста и лекарственной чувствительности опухолевых клеток остаются неполностью понятными. В этой связи применение 2D- и 3D-моделей для изучения патогенеза и оценки действия противоопухолевых препаратов является методологически оправданным и клинически значимым (Asghar et al., 2015; Lovitt et al., 2015; Falkenberg et al., 2016; Russo et al., 2022).

Разница между моделями заключается в характере взаимоотношений между клетками и микросредой (Pinto et al., 2020). В 2D-культуре клетки растут монослоем на твердом субстрате и полностью омываются культуральной средой; каждая клетка находится в непрерывном контакте с растворенными веществами и диффузионные ограничения минимальны. Вместе с тем 2D-система не отражает тканеспецифичную архитектуру опухоли, полярность клеток и их сигнальные взаимодействия, поэтому она отличается по морфологии и профилям экспрессии генов при сравнении с опухолевой тканью *in vivo* (Han et al., 2010; Edmondson et al., 2014; Lovitt et al., 2015; Guan, Huang, 2022; Urzì et al., 2023).

3D-сфероиды представляют собой самоорганизующиеся агломераты, в которых воспроизводятся ключевые признаки опухолевой микросреды: градиенты кислорода, глюкозы и величины pH, зонирование по пролиферативной активности (внешние пролиферирующие слои и внутренние зоны с гипоксией), отложение внеклеточного матрикса и плотные межклеточные контакты. Эти факторы формируют физический и диффузионный барьер для проникновения лекарств и модифицируют фармакодинамические ответы (Minchinton, Tannock, 2006; Friedrich et al., 2007; Hirschhaeuser et al., 2010; Edmondson et al., 2014; Zanoni et al., 2016). В результате многие препараты демонстрируют меньшую активность в сфероидах по сравнению с монослоем (Asghar et al., 2015; Guan, Huang, 2022; Nayak et al., 2023).

Так, обработка клеток рака яичников паклитакселом снижала выживаемость и пролиферацию примерно на 40% в 3D-сфероидах, тогда как в 2D-монослое тот же препарат снижал жизнеспособность на ~80% (Loessner et al., 2010). Сравнение 3D-сфероидов и 2D-монослоя клеток линии HCT-116 при действии стандартных (мелфалан, 5-FU, оксалиплатин, иринотекан) и исследуемых (акрифлавин, VLX50) противоопухолевых средств показало высокую активность всех препаратов в 2D-культуре и существенно меньшую — в 3D, причем более зрелые (6-суточные) сфероиды были устойчивее, чем 3-суточные (Karlsson et al., 2012). Это согласуется с вкладом динамических межклеточных взаимодействий в формирование лекарственной толерантности (Hirschhaeuser et al., 2010; Edmondson et al., 2014; Guan, Huang, 2022; Nayak et al., 2023).

Однако повышенная устойчивость сфероидов не является универсальным правилом и зависит от механизма действия препарата и микросреды. Например, для тирапазамина — гипоксия-активируемого цитотоксического агента — клетки в 3D-моделях оказывались более чувствительными, чем в 2D, что отражает влияние гипоксических градиентов на фармакологический эффект (Tung et al., 2011; Nayak et al., 2023). Значимы также такие факторы, как скорость накопления и вымывания препарата, режим дозирования и длительность воздействия, которые по-разному влияют и на 2D-, и на 3D-системы (Minchinton, Tannock, 2006; Friedrich et al., 2007; Salinas-Vera et al., 2022).

Мы получили сфероиды клеток рака молочной железы, динамика и рост которых соответствовали двум фазам: 1—5 сут — фаза уплотнения, связанная с синтезом межклеточного матрикса и образованием межклеточных контактов, а далее фаза роста, сопровождающаяся увеличением диаметра сфероида вследствие пролиферативных процессов. Адгезивные свойства сфероиды MCF-7 проявляют ко вторым суткам, скорость роста монослоя из клеток периферического слоя сфероида составлет 0.193 ± 0.012 мм^2/сут. Окрашивание АО подтвердило неоднородность структуры сфероида и позволило выделить в нем периферическую и центральную зоны с различными интенсивностью и цветом флюоресценции.

2D- и 3D-модели MCF-7 показали разную чувствительность к противоопухолевым препаратам камптотецину и доксорубицину. Оба препарата широко применяются в химиотерапии опухолей. Однако механизм их действия на опухолевую клетку различен. Камптотецин — это природный алкалоид, являющийся ингибитором топоизомеразы, тогда как цитостатическое действие доксорубицина проявляется в образовании свободных радикалов и прямом взаимодействии с ДНК. В наших экспериментах камптотецин проявляет цитотоксическое действие как в случае 2D-модели (о чем свидетельствует снижение относительной жизнеспособности клеток), так и в случае 3D-модели, что подтверждается снижением адгезивных свойств сфероидов и их распадом на мелкие агрегаты клеток. Доксорубицин не продемонстрировал цитотоксического эффекта в случае 2D-модели, но в случае сфероидов также снижал адгезивные свойства и вызывал распад сфероидов на мелкие агрегаты клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенной работы можно сделать вывод о том, что 2D- и 3D-модели демонстрируют как однозначную чувствительность к противоопухолевым препаратам, так и противоположную. Различия в чувствительности 2D- и 3D-моделей могут объясняться как особенностями влияния на клетки и их взаимодействия в каждой из систем, так и зависимостью от механизма действия препарата. Различия лекарственной чувствительности у 2D- и 3D-моделей имеют определенные биофизические и биологические причины, учет которых при использовании культур клеток в качестве тест-систем повышает прогностическую ценность скрининга противоопухолевых препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Согомонян А. С., Шипунова В. О., Соловьев В. Д., Ларионов В. И., Котельникова П. А., Деев С. М.* 2022. Метод получения трехмерных клеточных сфероидов: универсальный инструмент для изучения цитотоксических свойств противоопухолевых соединений in vitro. Acta Naturae. Т. 14. № 1. С. 92. (*Sogomonyan A. S., Shipunova V. O., Soloviev V. D., Larionov V. I., Kotelnikova P. A., Deyev S. M.* 2022. 3D models of cellular spheroids as a universal tool for studying the cytotoxic properties of anticancer compounds in vitro. Acta Naturae. V. 14. P. 92.) https://doi.org/10 10.32607/actanaturae.11603
2. *Asghar W., El Assal R., Shafiee H., Pitteri S., Paulmurugan R., Demirci U.* 2015. Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. Mater Today (Kidlington). V. 18. P. 539—553.

3. *Baker B. M., Chen C. S.* 2012. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. J. Cell Sci. V. 125. P. 3015.
4. *Bloom H. J., Richardson W. W.* 1957. Histological grading and prognosis in breast cancer. Br. J. Cancer. V.11. P. 359.
5. *Brajša K., Trzun M., Zlatar I., Jelić D.* 2016. Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. Period. Boil. V. 118. P. 59.
6. *Breslin S., O'Driscoll L.* 2013.Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. Drug Discov. V. 18. P. 240.
7. *Edmondson R., Broglie J. J., Adcock A. F., Yang L.* 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. Assay Drug. Dev. Technol. V. 12. P. 207.
8. *Chen G., Liu W., Yan B.* 2022. Breast cancer MCF-7 cell spheroid culture for drug discovery and development. J. Cancer Ther. V. 13. P. 117.
9. *Costa E. C., Moreira A. F., de Melo-Diogo D., Gaspar V. M., Carvalho M. P., Correia I. J.* 2016. 2016. 3D Tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. Biotechnol. Adv. V. 34. P. 1427.
10. *Falkenberg N., Höfig I., Rosemann M., Szumielewski J., Richter S., Schorpp K., Hadian K., Aubele M., Atkinson M. J., Anastasov N.* 2016. Three-dimensional microtissues essentially contribute to preclinical validations of therapeutic targets in breast cancer. Cancer Med. V. 5. P. 703.
11. *Fong E. L., Harrington D. A., Farach-Carson M. C., Yu H.* 2016. Heralding a new paradigm in 3D tumor modeling. Biomaterials. V. 108. P. 197.
12. *Frankel A., Man S., Elliott P., Adams J., Kerbel R. S.* 2000. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. Clin. Cancer Res. V. 6. P. 3719.
13. *Friedrich J., Ebner R., Kunz-Schughart L. A.* 2007. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids — old hat or new challenge?. Int. J. Radiat. Biol. V. 83. P. 849.
https://doi.org/10.1080/09553000701727531
14. *Froehlich K., Haeger J. D., Heger J., Pastuschek J., Photini S. M., Yan Y., Lupp A., Pfarrer C., Mrowka R., Schleußner E., Markert U. R., Schmidt A.* 2016. Generation of multicellular breast cancer tumor spheroids: comparison of different protocols. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. V. 21. P. 89.
15. *Fujimori A., Gupta M., Hoki Y., Pommier Y.* 1996. Acquired camptothecin resistance of human breast cancer MCF-7/C4 cells with normal topoisomerase I and elevated DNA repair. Mol. Pharmacol. V. 50. P. 1472.
16. *Guan X., Huang S.* 2022. Advances in the application of 3D tumor models in precision oncology and drug screening. Front. Bioeng. Biotechnol. V. 10. Art. ID: 1021966.
https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1021966
17. *Habanjar O., Diab-Assaf M., Caldefie-Chezet F., Delort L.* 2021. 3D Cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. Int. J. Mol. Sci. V. 22. Art. ID: 12200.
https://doi.org/10.3390/ijms222212200
18. *Han J., Chang H., Giricz O., Lee G. Y., Baehner F. L., Gray J. W., Bissell M. J., Kenny P. A., Parvin B.* 2010. Molecular predictors of 3D morphogenesis by breast cancer cell lines in 3D culture. PLoS Comput. Biol. V. 6. Art. ID: e1000684.
19. *Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C., West J., Mueller-Klieser W., Kunz-Schughart L. A.* 2010. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. J. Biotechnol. V. 148. P. 3.
https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012
20. *Hong S., Song J.* M. 2022. 3D bioprinted drug-resistant breast cancer spheroids for quantitative in situ evaluation of drug resistance. Acta Biomater. V.138. P. 228.
https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.10.031
21. *Imamura Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., Kiyota N., Takao S., Kono S., Nakatsura T., Minami H.* 2015. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. Oncol. Rep. V. 33. P. 1837.
22. *Karlsson H., Fryknäs M., Larsson R., Nygren P.* 2012. Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. Exper. Cell Res. V. 318. P. 1577.
23. *Kim J. B., Stein R., O'Hare M. J.* 2004. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer a review. Breast Cancer Res. Treat. V. 85. P. 281.
24. *Lan S., Ma L., Tang C.* 2025. A clinically translatable 2.5D lung adenocarcinoma organoid platform derived from malignant pleural effusions for precision drug screening and tumor-immune-stromal modeling. Biomed. Pharmacother. V. 193. Art. ID: 118712.

25. *Le B. A. M., Nguyen L. B. L., Lam D. T. P., Lam C. T., Nguyen N. T., Nguyen V. T., Bui H. T.* 2024. Agarose-based 3D culture improved the developmental competence of oocyte-granulosa complex isolated from porcine preantral follicle. Theriogenology. V. 223. P. 11.
https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.04.010

26. *Liu C., Liu Y., Xu X., Wu H., Xie H., Chen L., Lu T., Yang L., Guo X., Sun G.* 2015. Potential Effect of Matrix Stiffness on the Enrichment of Tumor Initiating Cells under Three-Dimensional Culture Conditions. Exp. Cell Res. V. 330. P. 123—134.

27. *Liu Y., Johnson J., Zhang H., Huang P., Li L.* 2025. Direct transfer of multicellular tumor spheroids grown in agarose microarrays for high-throughput mass spectrometry imaging analysis. Anal Bioanal Chem. V. 417. P. 3021.
https://doi.org/10.1007/s00216-025-05843-x

28. *Loessner D., Stok K. S., Lutolf M. P., Hutmacher D. W., Clements J. A., Rizzi S. C.* 2010. Bioengineered 3D platform to explore cell–ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. Biomaterials. V. 31. Art. ID: 8494.
https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.064

29. *Lovitt C. J., Shelper T. B., Avery V. M.* 2015. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. J. Cancer Res. Clin. Oncol. V. 141. P. 951.
https://doi.org/10.1007/s00432-015-1950-1

30. *Martin K. J., Patrick D. R., Bissel M. J., Fournier M. V.* 2008. Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. PloS one. V. 3. Art. ID: e2994.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002994

31. *Minchinton A., Tannock I.* 2006. Drug penetration in solid tumours. Nat. Rev. Cancer. V. 6. P. 583.
https://doi.org/10.1038/nrc1893

32. *Moreno Valtierra M., Urue Corral A., Jiménez-Avalos J.A.* 2024. Patterned PVA hydrogels with 3D Petri dish® micro-molds of varying topography for spheroid formation of HeLa cancer cells: *in vitro* assessment. Gels. V. 10. P. 518.
https://doi.org/10.3390/gels10080518

33. *Nayak P., Bentivoglio V., Varani M., Signore A.* 2023. Three-dimensional in vitro tumor spheroid models for evaluation of anticancer therapy: recent updates. Cancers (Basel). V. 15. Art. ID: 4846.
https://doi.org/10.3390/cancers15194846

34. *Pawlik T. M., Souba W. W., Sweeney T. J., Bode B. P.* 2000. Amino acid uptake and regulation in multicellular hepatoma spheroids. J. Surg. Res. V. 91. P. 15.

35. *Pinto B., Henriques A. C., Silva P., Bousbaa H.* 2020. Three-dimensional spheroids as *in vitro* preclinical models for cancer research. Pharmaceutics. V. 12. Art. ID: 1186.
https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121186

36. *Russo M., Cejas C. M., Pitingolo G.* 2022. Advances in microfluidic 3D cell culture for preclinical drug development. Progress Mol. Biol. Translat. Sci. V. 187. P. 163.
https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.07.022

37. *Pulze L., Congiu T., Brevini T., Grimaldi A., Tettamanti G., D'Antona P., Baranzini N., Acquati F., Ferraro F., Eguileor M.* 2020. MCF7 Spheroid development: new insight about spatio/temporal arrangements of TNTs, amyloid fibrils, cell connections, and cellular bridges. Int. J. Mol. Sci. V. 21. Art. ID: 155400.
https://doi.org/10.3390/ijms21155400

38. *Salinas-Vera Y. M., Valdés J., Pérez-Navarro Y., Mandujano-Lazaro G., Marchat L. A., Ramos-Payán R., Nuñez-Olvera S. I., Pérez-Plascencia C., López-Camarillo C.* 2022. Three-dimensional 3D culture models in gynecological and breast cancer research. Frontiers in oncology. V.12. Art. ID: 826113.
https://doi.org/10.3389/fonc.2022.826113

39. *Sia D., Moeini A., Labgaa I., Villanueva A.* 2015. The future of patient-derived tumor xenografts in cancer treatment. Pharmacogenomics. V. 16. P 1671.
https://doi.org/10.2217/pgs.15.102

40. *Sharma N. K., Kumar A., Kumari A., Tokar E. J., Waalkes M. P., Bortner C. D., Williams J., Ehrenshaft M., Mason R. P., Sinha B. K.* 2015. Nitric oxide down-regulates topoisomerase i and induces camptothecin resistance in human breast MCF-7 tumor cells. PloS one. V. 10. Art. ID: 0141897
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141897

41. *Shu Y., Li B., Ma H.* 2024. Three-dimensional breast cancer tumor models based on natural hydrogels: a review. J. Zhejiang Univ. Sci. B. V. 25. P. 736.
https://doi.org/10.1631/jzus.b2300840

42. *Shukla P., Bera A. K., Yeleswarapu S., Pati F.* 2024. High throughput bioprinting using decellularized adipose tissue-based hydrogels for 3D breast cancer modeling. Macromol. Biosci. V. 24. Art. ID: 00035. https://doi.org/10.1002/mabi.202400035

43. *Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A.* 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin. V. 71. P. 209.

44. *Tung Y. C., Hsiao A. Y., Allen S. G., Torisawa Y. S., Ho M., Takayama S.* 2011. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384-hanging drop array. Analyst. V. 136. P. 473.

45. *Urzì O., Gasparro R., Costanzo E., De Luca A., Giavaresi G., Fontana S., Alessandro R.* 2023. Three-dimensional cell cultures: the bridge between in vitro and in vivo models. J. Mol. Sci. V. 24. Art. ID: 12046. https://doi.org/10.3390/ijms241512046

46. *Zanoni M., Piccinini F., Arienti C., Zamagni A., Santi S.., Polico R., Bevilacqua A., Tesei A.* 2016. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. Sci. Rep. V. 6. P. 19103.

47. *Zhang C. R., Qiu X. Q., Dai Y.* 2023. The prospects for bioprinting tumor models: recent advances in their applications. Bio-Des Manuf. V. 6. P. 661.

48. *Zhang Y., Ji Y., Liu S., Li J., Wu J., Jin Q., Liu X., Duan H., Feng Z., Liu Y., Zhang Y., Lyu Z., Song F., Song F., Yang L., Liu H., Huang Y.* 2025. Global burden of female breast cancer: new estimates in 2022, temporal trend and future projections up to 2050 based on the latest release from GLOBOCAN. J. Natl. Cancer Cent. V. 5. P. 287.

49. *Zhu J., Zheng S., Liu H., Wang Y., Jiao Z., Nie Y., Wang H., Liu T., Song K.* 2021. Evaluation of anti-tumor effects of crocin on a novel 3D tissue-engineered tumor model based on sodium alginate/gelatin microbead. Int. J. Biol. Macromol. V. 174. P. 339. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.181