

doi 10.18699/vjgb-25-21

Трехмерные модели культур клеток: способы получения и характеристика основных моделей

М.М. Абдурахманова ¹, А.А. Леонтьева ^{2, 1}, Н.С. Васильева ^{2, 1}, Е.В. Кулигина ¹, А.А. Нуштаева ^{2, 1} ¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия² Научно-технологический университет «Сириус», федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия nushtaeva.anna@gmail.com

Аннотация. В течение многих лет золотым стандартом в исследованиях злокачественных новообразований являлись культуры опухолевых клеток *in vitro*, ксенотрансплантаты *in vivo* или генетически модифицированные модели животных. К настоящему времени арсенал инструментов современных медико-биологических исследований пополнился трехмерными клеточными моделями (3D-культуры). 3D-культуры воспроизводят тканеспецифичные характеристики топологии ткани, что делает их релевантными тканевыми моделями с точки зрения клеточной дифференцировки, метаболизма и развития лекарственной устойчивости. Благодаря своему потенциалу такие модели уже применяются многими исследовательскими группами как для фундаментальных, так и для трансляционных исследований, и их использование позволяет значительно сократить количество экспериментов на животных, например, в области онкологии. В литературе 3D-культуры классифицируют по технике формирования (с каркасом/без каркаса), условиям культивирования (статические/динамические), а также по клеточной организации и функциям. По клеточной организации 3D-культуры разделяют на «сфероидные модели», «органойды», «органы-на-чипе» и «микроткани». При этом каждая из моделей имеет свои характерные особенности, которые необходимо учитывать при использовании модели в эксперименте. Наиболее простые 3D-культуры – это «сфероидные модели», представляющие собой плавающие сферические агрегаты клеток. Более сложной 3D-моделью является «органойд» – самоорганизующаяся трехмерная структура, сформированная из стволовых клеток, способных к самообновлению и дифференцировке в составе модели. Микрофлюидные системы «орган-на-чипе» – это чипы, имитирующие *in vitro* основные физические и биологические процессы в органах и тканях в динамике. «Сфероиды» и «органойды» за счет объединения различных типов клеток в единую структуру могут быть основой для формирования «микроткани» – гибридной 3D-модели, воспроизводящей специфический тканевый фенотип и содержащей тканеспецифичные компоненты внеклеточного матрикса. В данном обзоре представлена краткая история развития метода культивирования клеток *in vitro* в 3D-формате, описаны основные характеристики и перспективы применения «сфероидных моделей», «органойдов», «органов-на-чипе» и «микротканей» для исследований в области иммуноонкологии солидных опухолей.


Ключевые слова: агрегация клеток; 3D-культуры клеток; сфероиды; органойды; орган-на-чипе; микроткань; культивирование клеточных 3D-моделей

Для цитирования: Абдурахманова М.М., Леонтьева А.А., Васильева Н.С., Кулигина Е.В., Нуштаева А.А. Трехмерные модели культур клеток: способы получения и характеристика основных моделей. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(2):175-188. doi 10.18699/vjgb-25-21

Финансирование. Написание разделов Введение, Особенности 3D-культур опухолевых клеток: «сфероидная модель», «органойд», «орган-на-чипе» и «микроткань» и Заключение (авторы: А.А. Леонтьева, Н.С. Васильева, А.А. Нуштаева) выполнено 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); написание разделов Сохранение тканеспецифичной характеристики клеток *in vitro* и Культивирование клеток в 3D-моделях (авторы М.М. Абдурахманова и Е.В. Кулигина), а также Лицензированный доступ в BioRender для подготовки рисунков выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-00390, <http://rscf.ru/project/24-14-00390/>.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Владимиру Александровичу Рихтеру (заведующему лабораторией биотехнологии ИХБФМ СО РАН). Все рисунки были созданы на сайте BioRender.com.

3D cell culture models: how to obtain and characterize the main models

М.М. Abdurakhmanova ¹, А.А. Leonteva ^{2, 1}, N.S. Vasilieva ^{2, 1}, E.V. Kuligina ¹, А.А. Nushtaeva ^{2, 1} ¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia² Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russia nushtaeva.anna@gmail.com

Abstract. For many years, the gold standard in the study of malignant tumors has been the *in vitro* culture of tumor cells, *in vivo* xenografts or genetically modified animal models. Meanwhile, three-dimensional cell models (3D cultures) have been added to the arsenal of modern biomedical research. 3D cultures reproduce tissue-specific features of tissue topology. This makes them relevant tissue models in terms of cell differentiation, metabolism and the development of drug resistance. Such models are already being used by many research groups for both basic and translational research, and may substantially reduce the number of animal studies, for example in the field of oncological research. In the current literature, 3D cultures are classified according to the technique of their formation (with or without a scaffold), cultivation conditions (static or dynamic), as well as their cellular organization and function. In terms of cellular organization, 3D cultures are divided into “spheroid models”, “organoids”, “organ-on-a-chip” and “microtissues”. Each of these models has its own unique features, which should be taken into account when using a particular model in an experiment. The simplest 3D cultures are spheroid models which are floating spherical cell aggregates. An organoid is a more complex 3D model, in which a self-organizing 3D structure is formed from stem cells (SCs) capable of self-renewal and differentiation within the model. Organ-on-a-chip models are chips of microfluidic systems that simulate dynamic physical and biological processes found in organs and tissues *in vitro*. By combining different cell types into a single structure, spheroids and organoids can act as a basis for the formation of a microtissue – a hybrid 3D model imitating a specific tissue phenotype and containing tissue-specific extracellular matrix (ECM) components. This review presents a brief history of 3D cell culture. It describes the main characteristics and perspectives of the use of “spheroid models”, “organoids”, “organ-on-a-chip” models and “microtissues” in immune oncology research of solid tumors.

Key words: cell aggregation; 3D cell cultures; spheroids; organoids; organ-on-a-chip; microtissue; 3D cell model culturing

For citation: Abdurakhmanova M.M., Leonteva A.A., Vasilieva N.S., Kuligina E.V., Nushtaeva A.A. 3D cell culture models: how to obtain and characterize the main models. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(2):175-188. doi 10.18699/vjgb-25-21

Введение

В середине XX в. были сформированы основные принципы культивирования клеток растений и животных *in vitro* и созданы диплоидные клеточные линии человека (Jedrzejczak-Silicka, 2017). В конце XX–начале XXI в. были разработаны методы 3D-культивирования клеток, позволяющие конструировать клеточные модели, которые более точно воспроизводят среду, в которой клетки находятся в тканях организма (Edmondson et al., 2014). В последние десятилетия методы 3D-культивирования опухолевых клеток активно развиваются. В сравнении с 2D-культурами современные клеточные 3D-модели максимально приближены к животным моделям и первичной опухоли *in vivo* по следующим характеристикам: апикально-базальная полярность клеток в составе 3D-модели; уровень экспрессии генов клеток, отвечающих за физиологическое функционирование клеток; гетерогенность клеточного состава; способность секретировать белки внеклеточного матрикса (ВКМ) и факторы роста; лекарственная устойчивость модели и др.

Исследователи классифицируют 3D-культуры клеток в соответствии с их пространственной структурой (Maliszewska-Olejniczak et al., 2019) и выделяют «сфероидные модели», «органойды», «органы-на-чипе» и «микроткани». В публикуемых работах термины «сфероид», «органойд» и «микроткань» могут ошибочно использоваться как синонимы (Simian, Bissell, 2017). Однако следует учитывать, что все перечисленные модели имеют разные или лишь частично совпадающие источники клеток, протоколы конструирования и области применения и не являются взаимозаменяемыми. Причины, по которым термины «сфероидная модель», «органойд» и «микроткань» необходимо разделять, описаны в данном обзоре. Также здесь представлена краткая история развития методов 3D-культивирования клеток *in vitro* с акцентом

на ключевые особенности клеточных 3D-моделей, обуславливающие применение наиболее физиологически релевантной модели для исследований иммунологии солидных опухолей.

Сохранение тканеспецифичной характеристики клеток *in vitro*

Первые попытки создать клеточную 3D-модель были предприняты в 1956 г.: Арон Артур Москона получил агрегаты клеток – 3D-структуры (Moscona, 1956). Москона показал, что гистологически различные типы диссоциированных клеток при совместном культивировании способны агрегировать между собой и формировать трехмерную структуру.

Радиобиолог Роберт Сазерленд с коллегами ввели термин «сфероид» для структур, описанных Аронем Москона. Они сконструировали многоклеточные сфероиды из клеток легкого китайского хомячка (линия V79). По строению сферические клеточные агрегаты напоминали узелки, наблюдаемые в карциномах животных и человека. Кривая роста агрегатов клеток *in vitro* была аналогична кривой роста трансплантатов у мышей. Морфологический анализ структур показал, что сфероиды имеют внешнюю зону, содержащую множество делящихся клеток, промежуточную зону, которая плохо насыщается кислородом и питательными веществами и содержит малое количество клеток в состоянии митоза, и зону некротизированных клеток. На основании этих результатов авторы сделали вывод, что многоклеточные сфероиды, полученные в ходе эксперимента, могут быть использованы в качестве модели *in vitro*, позволяющей оценить рост опухоли (Sutherland, 1988).

Термин «органойд» начали использовать в литературе в 1950-х годах, однако в то время структуры, обозначаемые этим термином, не имели ничего общего с 3D-культурами

клеток. Например, Уильям Дьюри и Жозефина Доэрти в своем исследовании 1954 г. «Ядерные и цитоплазматические органоиды в живой клетке» под органоидом подразумевали внутриклеточные структуры, а именно органеллы клетки (Duryee, Doherty, 1954). Также термин «органOID» употребляли для обозначения опухолей или аномальных клеточных разрастаний как синоним тератомы (Wolter, 1967). Развитие методов культивирования органоидов как клеточных 3D-структур берет начало с 1975 г. Джеймс Г. Рейнвальд и Говард Грин описали первую 3D-модель, включающую нормальные кератиноциты человека и фибробласты мышцы линии 3T3. В стратифицированном эпидермисе деление клеток ограничивалось базальным слоем растущих клонов, тогда как поверхностные слои состояли из терминально дифференцирующихся кератиноцитов, которые постепенно формировали ороговевающий слой. Дальнейшее культивирование данных структур позволило получить «листы эпидермиса», выращенные из небольшого количества первичных кератиноцитов (Rheinwald, Green, 1975). Хотя термин «органOID» не применялся в этом исследовании, Рейнвальд и Грин были первыми, кто восстановил 3D-структуру ткани *in vitro*, и уже с 1980 г. в исследованиях, посвященных 3D-культурам, возникает термин «органOID».

Кроме того, в 1980-х годах группа под руководством Мины Джахан Бисселл в своих работах показала важную роль ВКМ в развитии опухоли. Клетки первичной культуры молочной железы мыши культивировали на подложке из белков базальной мембраны (БМ), полученной из саркомы мышей Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). При таком культивировании клетки молочной железы формируют протоки и просветы, напоминающие секреторные альвеолы, и при этом в 90 % клеток детектируется экспрессия β-казеина (Li et al., 1987). Это исследование стимулировало развитие методов создания 3D-моделей с учетом ВКМ. Впервые сочетание слов «3D-модели культур клеток» применили Мэри Хелен Барселлос-Хофф с соавторами (Barcellos-Hoff et al., 1989) и Оле Петерсен с коллегами (Petersen et al., 1992) при анализе клеток молочной железы на подложке из БМ EHS. С использованием этой модели молочной железы человека группа под руководством Барселлос-Хофф исследовала альвеолярный морфогенез, а группа под руководством Петерсен смогла описать характер роста и дифференцировку нормальных и злокачественных эпителиальных клеток.

До 2005 г. термин «органOID» служил для обозначения небольших фрагментов органов, состоящих в основном из эпителиальных клеток, отделенных механически и/или ферментативно от стромальной ткани и выращенных в различных гелях (Fata et al., 2007). Однако в последнее десятилетие этим термином часто обозначают самые различные 3D-структуры (Nikonogova et al., 2023). В 2012 г. на консорциуме по стволовым клеткам желудочно-кишечного тракта для клеточных моделей толстого и тонкого кишечника была утверждена следующая номенклатура: «органOID» – 3D-культура, состоящая из нескольких типов клеток, например клеток эпителиального и мезенхимального происхождения; «сфероид» – сферическая 3D-культура, включающая клетки только одного типа (Guryanov, 2016).

Для внесения ясности в номенклатуру клеточных моделей для других тканей в октябре 2016 г. Европейской организацией молекулярной биологии была проведена встреча «Органоиды», где принято решение обозначать термином «органOID» разные структуры, в зависимости от системы органов (Simian, Bissell, 2017). Например, в области биологии молочных желез «органOID» – это первичный эксплантат эпителиальных протоков, помещенных в гели ВКМ. И наоборот, в исследованиях по биологии кишечника к органоидам могут относиться клональные производные первичных эпителиальных СК, выращенных без мезенхимы, либо эпителиально-мезенхимальные культуры, происходящие из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (Shamir, Ewald, 2014).

Таким образом, разработанные и описанные в XIX–XX веках методы культивирования фрагментов тканей заложили основу для развития технологии культивирования клеток вне организма. Сформулированные принципы культивирования клеток позволили сделать важные открытия в области регенеративной медицины, трансплантологии, биотехнологии и биофармацевтики (Simian, Bissell, 2017) (рис. 1).

Особенности 3D-культур опухолевых клеток: «сфероидная модель», «органOID», «орган-на-чипе» и «микроткань»

С развитием подходов 3D-культивирования появляются такие термины, как «агрегаты», «сфероиды», «сфера», «опухолесфера», «онкосфера», «органOID» или «органотипический сфероид». Нередко их ошибочно используют в качестве синонимов. Однако данные модели различаются по составу питательной среды, поверхности культивирования, плотности клеток, времени, необходимому для формирования, а также по типам клеток в составе модели (Rodrigues et al., 2024). При этом неточности в терминах могут вводить в заблуждение относительно объекта, на котором проводились исследования (Nikonogova et al., 2023). Например, Сейед Али Каримифард с коллегами применяют термины «органOID» и «маммосфера» в отношении клеточной 3D-структуры из опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7 (Karimifard et al., 2024). Согласно номенклатуре клеточных 3D-структур, «органOID» и «маммосферу» относят к разным 3D-моделям (Ponti et al., 2005; Gilazieva et al., 2020). Авторы данного исследования ссылаются на публикацию (Moradi-Mehr et al., 2023), в которой сконструированные «маммосферы» описываются как органоидная модель. Однако авторы последней работы не описывают полученную ими модель как «органOID», а употребляют термины «3D-культура клеток MCF-7» или «маммосфера».

Мы предполагаем, что путаница в терминологии связана с новизной и скоростью развития области 3D-культивирования клеток, а также со стремлением следовать научным тенденциям. Важность использования соответствующей терминологической номенклатуры обсуждалась также в научном обзоре (Nikonogova et al., 2023). Несмотря на многочисленные попытки введения номенклатуры, исследователи довольно непоследовательно оперируют терминологией, и поэтому необходимо вводить номен-

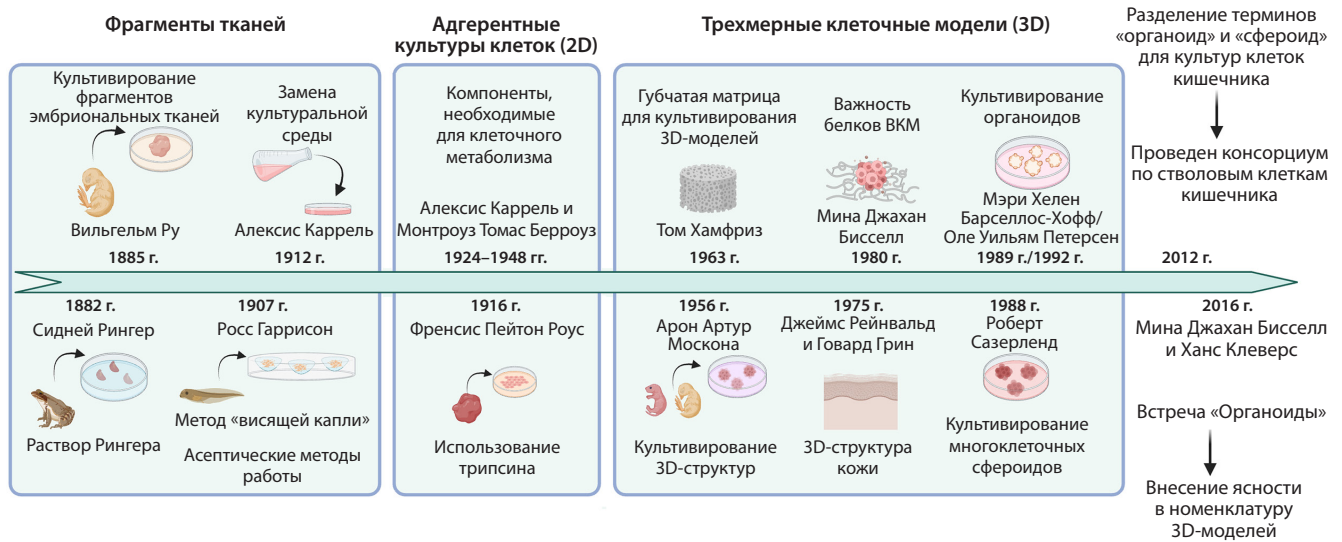


Рис. 1. Хронология ключевых событий в области культивирования клеток: от фрагментов тканей к 2D- и 3D-клеточным моделям.

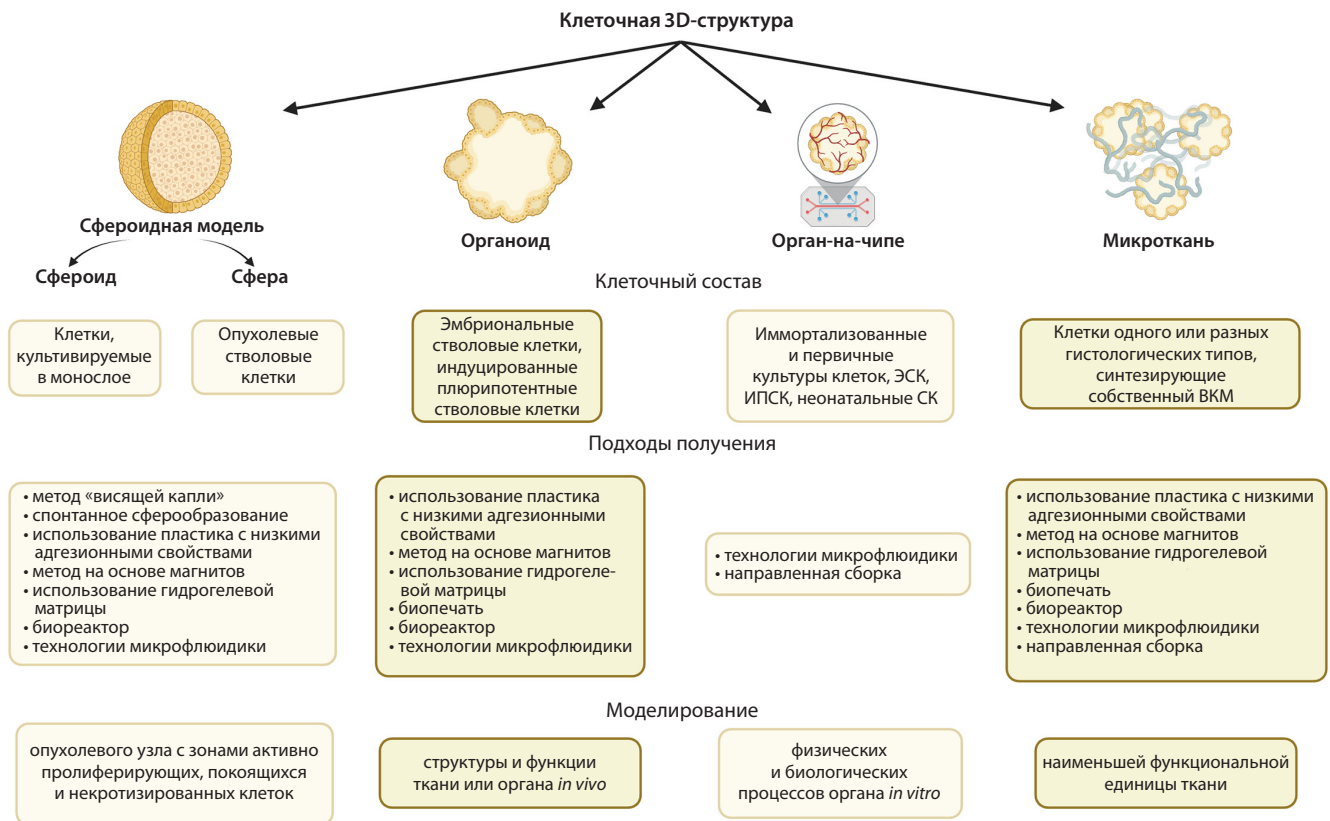


Рис. 2. Методы получения и характерные особенности клеточных 3D-структур: «сфероидной модели», «органойда», «органа-на-чипе» или «микроткани».

клатуру клеточных моделей в научном сообществе, в том числе и среди ученых РФ (Kang et al., 2021; Paşca et al., 2022) (рис. 2).

Сфероидные модели

Среди сфероидных моделей наиболее распространены «сферы» и «сфероиды» (Maliszewska-Olejniczak et al., 2019). К сферам относят туморосферы и тканевые опухо-

левые «сферы». Туморосферы описывают как опухолевые клетки, образующие 3D-кластеры из суспензии клеток в неадгезивных условиях. Опухолевые стволовые клетки (ОСК), которые ассоциируют с инициацией опухоли, обладают потенциалом к самообновлению и пролиферации, а также способностью формировать 3D-структуры при культивировании *in vitro* (Weiswald et al., 2015). Поскольку сферообразующие клетки являются стволовыми,

они способны дифференцироваться во все субпопуляции нестволовых клеток, имеющиеся в исходной клеточной культуре. Таким образом, туморосфера – это смесь ОСК и дифференцированных клеток (Maliszewska-Olejniczak et al., 2019), в то время как тканевые опухолевые «сферы» получают из образца опухолевой ткани пациента. Образец ткани диссоциируют, что позволяет опухолевым клеткам мигрировать из фрагментов в виде скоплений клеток и/или отдельных клеток, образуя плотные, компактные скопления или агрегаты клеток. Однако эта сфероидная модель ограничена исследованием только в области ОСК, поскольку она не может воспроизвести множественность других типов клеток в опухоли, а также сама плохо воспроизводится, так как некоторые ОСК остаются недифференцированными (Valent et al., 2012).

Сфероиды – это агрегаты клеток сферической формы, образующиеся в суспензии одиночных клеток гомо- или гетерогенного клеточного типа. Формирование такой модели происходит за счет способности клеток к гомотипической межклеточной адгезии, дополненной отсутствием адгезии клеток к пластику культурального флакона (Sakalem et al., 2021). Такая 3D-модель может быть получена как из клеток одной линии, так и из клеток различных линий, культивируемых совместно, и позволяет оценить способность клеток к спонтанной самоорганизации, синтезу белков ВКМ и формированию специфического микроокружения (Verjans et al., 2018). Сфероид похож на неваккуляризованный опухолевый узел, имитирует центральную зону гипоксии, внутреннюю зону покоящихся клеток и внешнюю зону активно пролиферирующих клеток и удобен как модель при исследовании злокачественных новообразований.

Основная область применения: в биологических исследованиях в качестве модели опухоли *in vitro*; для тестирования лекарственных средств; как основа для тканевой инженерии (Daly et al., 2021; Hsu et al., 2021; Corgnac et al., 2022; George et al., 2022; Nushtaeva et al., 2022; Vasileva et al., 2022).

Преимущества и недостатки сфероидной модели

Одним из преимуществ сфероидных моделей является отсутствие потребности в экзогенном ВКМ (Nushtaeva et al., 2022). Такие модели воспроизводят биохимические реакции исходной родительской опухоли (George et al., 2022) и межклеточные взаимодействия (Corgnac et al., 2022). Кроме того, сфероидные модели могут быть использованы как строительные блоки для органов-на-чипе и микротканей (Corgnac et al., 2022).

Однако важно учитывать, что в зависимости от метода получения, длительности культивирования и размера сфероидов также может увеличиваться некротическая область, ограничивая исследователей, например, при тестировании лекарственных препаратов (Verjans et al., 2018). Не все линии клеток способны формировать сфероидные модели (Ivascu, Kubbies, 2007), и существует ограниченная доступность клеточных линий, полученных из нормальных или минимально трансформированных тканей (Gunti et al., 2021; Han et al., 2021). Кроме того, требуется детальный подбор факторов роста для формирования и поддержания сфероидной модели.

Перспективы применения сфероидных моделей для исследований иммунологических и онкологических заболеваний

За последнее десятилетие иммунотерапия стала перспективным инструментом в онкотерапии (Bandara et al., 2024). Несмотря на это, эффективность иммунотерапии часто зависит от гистогенеза опухоли и особенностей организма пациента. Это говорит о необходимости создания улучшенных моделей доклинического скрининга, которые более точно воспроизводят биологию опухолей *in vivo*.

Сфероидные модели можно либо выращивать только из опухолевых клеток, либо совместно культивировать с различными типами клеток, такими как фибробласты, эндотелиальные и иммунные клетки, чтобы имитировать перекрестные помехи между различными клеточными компартментами опухолей пациентов (Абдурахманова и др., 2022; Heinrich et al., 2024). Хотя сфероиды не имеют сосудистой сети и клеточной гетерогенности первичной опухоли, их профили экспрессии генов и формирование некротического ядра делают их похожими на опухоли пациентов (Heinrich et al., 2024). В настоящее время это востребованная модель для оценки иммунотерапевтических стратегий благодаря ее относительно низкой стоимости и высокой воспроизводимости (Boucherit et al., 2020).

Сфероидные модели могут быть использованы для тестирования подходов иммунотерапии, в частности для оценки эффективности терапевтических антител и скрининга лекарств для усиления инфильтрации иммунных клеток и противоопухолевых эффектов против солидных опухолей. Например, в исследовании Мелани Гротц (Grotz et al., 2024) гетеротипическая сфероидная модель рака молочной железы была выбрана для оценки влияния высокоаффинного лиганда белка активации фибробластов на поведение наивных Т-клеток. В результате показано, что нацеливание на белок активации фибробластов актуально для иммунотерапии и эффективной активации Т-клеток в микроокружении опухоли. Сфероидные модели подходят для проверки эффективности подхода терапии с помощью химерного антигенного рецептора (CAR). Протестировав CAR Т-клетки, нацеленные на нефункциональный пуринаргический рецептор P2X7, Вероника Бандара с коллегами обнаружили, что такой подход усиливает противоопухолевый ответ в сфероидной модели рака яичника (Bandara et al., 2024). Известно применение сфероидных моделей для оценки роли и функций наноразмерных биомолекул. Так, Лилите Садовска и ее коллеги разработали клеточную 3D-модель рака предстательной железы для изучения воздействия внеклеточных везикул (ВВ) на иммунные клетки человека (Sadovska et al., 2018). В результате было показано, что большинство ВВ остаются связанными на поверхности В-клеток, а часть ВВ проникает в Т-клетки посредством макропиноцитоза.

Помимо генерации сфероидов, полученных из опухолевых клеток, существует другой подход, который заключается в разработке сфероидов, полученных из иммунных клеток. Макрофаги формируют сфероиды и могут сохранять жизнеспособность в течение как минимум 16 дней в 3D-культуре (Burchett et al., 2024). Танака с коллегами смогли продемонстрировать, что макрофаги имеют тенденцию к поляризации в сторону противоопухолевого

фенотипа M1, противопоставляя его проопухолевому фенотипу M2 в состоянии сфероиды (Tanaka et al., 2018).

Чтобы точно имитировать состав опухоли и исследовать функциональные свойства иммунных клеток, необходимо усовершенствовать существующие сфероидные модели. Например, вводить новые типы клеток в сфероид количественно точным образом. Кроме того, соотношения клеток в модели должны соответствовать тому, что демонстрирует опухоль. Это требует обширного изучения клеточного состава опухоли перед созданием модели. Наиболее полная гетеротипическая сфероидная модель была представлена в исследовании Марселя Генриха (Heinrich et al., 2024). Авторы подобрали количество и соотношение опухолевых клеток глиобластомы, микроглии и астроцитов для воссоздания реалистичной модели опухоли головного мозга. Включение как астроцитов, так и микроглии в гетеротипическую модель значительно увеличивало рост модели, а также продемонстрировало, что астроциты играют решающую роль в инвазии клеток глиобластомы. Помимо того, астроциты и микроглия способствуют созданию плотного физического барьера, защищающего модель опухоли от инфильтрации макромолекул или иммунных клеток.

Органоиды

Значительную часть клеточных 3D-культур называют органоидами, поскольку в условиях имитации 3D-среды организма *in vitro* клетки могут спонтанно самоорганизовываться, формируя сложные гистологические структуры, подобные структурам в органах, из которых они произошли. Например, клетки молочной железы, культивируемые в 3D-формате, способны образовать структуры, подобные разветвленным протокам (Lee et al., 2007). В настоящее время под термином «органOID» понимают искусственную 3D-структуру, полученную из СК и состоящую из органоспецифических клеток, способных к самоорганизации и отражающих структуру и функции органа *in vivo*. Такая модель может быть получена из ЭСК, ИПСК либо из неонатальных СК (Sakalem et al., 2021; George et al., 2022) и обеспечивает релевантные представления о функциональности и дифференцировке тканей. Обычно органоиды состоят из различных типов клеток, происходящих из разных зародышевых листков, и, как правило, имеют более высокий порядок самоорганизации по сравнению со сфероидными (Nikonogova et al., 2023).

При описании органоидов используют также термин «ассамблеиды» – объединяющиеся органоиды, сформированные из клеток разных органов или разных областей органа (Eke et al., 2022). Такая модель должна имитировать морфофункциональные единицы соответствующих тканей *in vivo*.

Основная область применения: медико-биологические исследования, тестирование лекарственных средств, тканевая инженерия и трансплантационная терапия (Kassis et al., 2019; Hofer, Lutolf, 2021; Mesci et al., 2022; Miao et al., 2022).

Преимущества и недостатки органоидов

Изменяя процедуру выделения клеток и комбинацию факторов роста при культивировании, ученые могут соз-

давать органоиды, состоящие как из нормальных, так и из онкотрансформированных клеток (Ivascu, Kubbies, 2007; Daly et al., 2021; Hsu et al., 2021; Cognac et al., 2022), что является мощным инструментом при скрининге противоопухолевых лекарственных средств. Клеточные модели органоидов можно культивировать в течение длительного времени, генетически модифицировать и криоконсервировать, сохраняя их фенотипические и функциональные характеристики. Однако необходимо учитывать, что формирование сложной структуры в модели органоида обычно занимает от двух до трех месяцев в зависимости от типа ткани и требует определенных факторов роста (Gunti et al., 2021).

Перспективы применения органоидов для исследований иммунологических и онкологических заболеваний

Использование органоидов, полученных от пациента, в персонализированной иммунотерапии рака показало большие перспективы. Такие органоиды сохраняют генетические и функциональные характеристики исходных опухолей, что позволяет адаптировать иммунотерапевтические стратегии к уникальному профилю онкологического заболевания каждого пациента (Noorintan et al., 2024).

В исследовании (Forsythe et al., 2021) с применением персонализированных органоидных моделей проводилось доклиническое изучение иммунотерапии при лечении рака аппендикса. Органоиды опухоли пациента были получены с использованием несортированных опухолевых клеток с обогащением и без обогащения иммунными клетками пациента, полученными из периферической крови, селезенки или лимфатических узлов, для терапии ингибиторами PD-1 (программируемый белок клеточной смерти 1) и активатором Т-клеток. Авторы показали цитотоксическую эффективность в подгруппе иммуноусиленных органоидов рака аппендикса из первичных опухолей как низкой, так и высокой степени злокачественности. Это исследование демонстрирует потенциал иммунотерапии при раке аппендикса и полезность иммунокомпетентных органоидов при отборе пациентов для клинических испытаний при редких видах рака.

Включение 3D-моделей для прогнозирования клинических ответов на скрининговые препараты оказалось более эффективным, чем использование традиционных адгезивных культур, поскольку именно 3D-модели в большей степени воспроизводят особенности первичной опухоли. Чжоу с коллегами разработали стандартизированный протокол для создания системы опухоль–органOID–Т-клетки с органоидами опухоли молочной железы и первичными опухолеспецифическими CD8⁺ Т-клетками. Эта система облегчает высокопроизводительный скрининг лекарственных препаратов с использованием органоидов опухолей молочной железы мышей, а также позволяет проводить более точное прогнозирование терапевтических ответов на противораковые препараты (Zhou et al., 2021). Авторы показали, что современные эпигенетические ингибиторы повышают презентацию антигена, опосредованную главным комплексом гистосовместимости класса I (МНС I) на клетках опухоли молочной железы. Кроме того, лечение

ингибитором гистондеацетилазы BML-210 существенно сенсibiliзировало клетки опухоли молочной железы к ингибитору PD-1.

Разработка систем совместного культивирования первичного опухолевого эпителия, включающих дополнительные клеточные компоненты без искусственного добавления, является сложной задачей. Нил со своей группой успешно создали органоиды, полученные из опухолевого эпителия, сохраняющие собственные иммунные клетки, что отражает разнообразие микроокружения опухоли пациента (Neal et al., 2018). В персонализированных органоидах наблюдались популяции инфильтрирующих CD3+ Т-клеток, экспрессирующих PD-1; цитотоксических Т-клеток; Т-хелперов; В-клеток; NK-клеток и различное количество макрофагов. Этот метод получения персонализированных органоидов, сохраняющий иммунную структуру, имеет большие перспективы для моделирования персонализированной иммунотерапии *in vitro*.

Шнальцгер с коллегами разработали органоиды из клеток толстой кишки, полученных от пациента для изучения цитотоксичности CAR NK-клеток, направленных на антиген EpCAM (молекула клеточной адгезии) (Schnalzger et al., 2019). CAR NK-EpCAM эффективно лизировали опухолевые клетки в первые сутки совместного культивирования. Авторы утверждают, что полученные ими органоиды представляют собой чувствительную, персонализированную платформу *in vitro* для оценки эффективности иммунотерапии на основе CAR.

Тем не менее, насколько бы сложными ни были модели органоидов, они не обеспечивают физиологическое представление организации ткани *in vivo*. В этих моделях отсутствует сосудистая система, а следовательно, и диффузия лекарств, клеточных продуктов, и их проникновение внутрь органоида ограничены.

Орган-на-чипе

Технология «орган-на-чипе» произвела революцию в области биомедицинских исследований, предоставив передовые платформы для моделирования сложных систем органов в условиях *in vitro*. «Орган-на-чипе» – это технология культивирования клеток в потоке жидкости для имитации искусственного органа или их системы, что позволяет воспроизводить структурные и функциональные характеристики органов и их взаимодействие. Данная технология применима для изучения механизмов заболеваний, реакций систем организма на терапевтические агенты и профилей их токсичности (Doost, Srivastava, 2024).

Модель «орган-на-чипе» представляет собой небольшие микрофлюидные устройства в виде чипов, изготовленных из биосовместимых материалов, которые благодаря сети микрокамер, микроканалов и ламинарного потока позволяют культивировать клетки в условиях, подобных средам *in vivo* (Doost, Srivastava, 2024). Такая модель может быть получена из ЭСК, ИПСК или из неонатальных СК, а также иммортализованных и первичных культур клеток (Singh et al., 2022). Кроме того, микрофлюидные технологии можно объединить со сфероидной моделью и/или органоидами для формирования гибридной модели (Wei et al., 2023).

Основная область применения: медико-биологические исследования, тестирование лекарственных средств, тканевая инженерия (Azizgolshani et al., 2021; Lohasz et al., 2021).

Преимущества и недостатки модели «орган-на-чипе»

Органы-на-чипе позволяют полностью контролировать микрофлюидные системы и регулирование клеточных процессов в исследовании, имитируя динамические физиологические процессы человека, такие как дыхание, перистальтика и кровообращение (Alver et al., 2024).

Одно из ограничений технологии «орган-на-чипе» заключается в необходимости использовать материал, который не влияет на компоненты клеточной среды и поддерживает стабильную жидкостную связь. Поскольку объем ламинарной жидкости небольшой, то поверхностные эффекты доминируют над объемным эффектом. Кроме того, ламинарный поток присутствует на пересечении нескольких жидкостей, соответственно, жидкости могут не смешиваться должным образом (Danku et al., 2022).

Перспективы применения «органа-на-чипе» для исследований иммунологических и онкологических заболеваний

Кровяные и лимфатические сосуды играют важную роль в иммунологических процессах, перемещая иммунные клетки между органами, тканями и лимфатической системой. Технология применения микрофлюидных чипов воспроизводит ключевые сложные и динамические характеристики опухоли, такие как васкуляризация и экстравазация, улучшая доклинические модели в развитии иммунотерапии рака (Doost, Srivastava, 2024). Большинство моделей «органов-на-чипе» содержат параллельные каналы для включения опухолевых клеток в гидрогель и иммунные клетки, встроенные в гидрогель или перфузируемые из бокового канала. Выбор конструкции микрофлюидной модели обычно определяется исследуемым вопросом, поскольку пропускная способность, динамические характеристики (например, поток) и возможности молекулярного считывания сильно различаются между моделями (Chernyavska et al., 2023). Так, Шабнам Джейбоуэй с коллегами использовали в микрофлюидном чипе сфероиды, сформированные из клеток рака молочной железы, для оценки гетерогенности опухоли пациента и анализа миграционного и инвазивного потенциала (Jeibouei et al., 2024). В результате было установлено, что повышение уровня экспрессии HER2 и маркера макрофагов M2a, а также жесткость белков ВКМ являются важными факторами, влияющими на миграцию и инвазию опухолевых клеток. В другом исследовании была реконструирована гетеротипическая модель HER2+-опухоли молочной железы для оценки эффекта моноклональных антител (Nguyen M. et al., 2018). Авторы культивировали в многокамерном чипе опухолевые, эндотелиальные клетки, мононуклеары крови и опухоль-ассоциированные фибробласты. Эта модель позволила протестировать моноклональные антитела в сложной 3D-системе, которая допускает перфузию растворимых молекул, учитывая гетерогенность опухоли (Nguyen M. et al., 2018).

В отличие от адаптивных иммунных клеток, врожденным иммунным клеткам не нужны МНС для своей активации. Сложность значительно возрастает, когда адаптивные иммунные клетки должны использоваться в эксперименте, учитывая молекулы МНС, в присутствии других типов клеток с несоответствием МНС (Magenau et al., 2016). Поэтому крайне важно разрабатывать иммунокомпетентные модели «органов-на-чипе», чтобы лучше понять, как иммунные клетки взаимодействуют с органами в состоянии здоровья и болезни. В своем исследовании Ирина Вейт с коллегами создали персонализированные модели «органов-на-чипе» рака легкого с их аутологичными первичными опухолевыми, стромальными фибробластами и иммунными клетками, выделенными из образцов опухоли, и измерили реакцию на лечение анти-PD-1 (Veith et al., 2024). Микрофлюидная модель способна была воспроизводить зависящие от стромы механизмы устойчивости к иммунотерапии, и интеграция аутологичных иммуносупрессивных опухоль-ассоциированных клеток в модели ухудшила реакцию на анти-PD-1 терапию.

Хотя органы-на-чипе могут воспроизводить большинство характеристик отдельных органов и физиологических условий потока, они не способны улавливать динамические взаимодействия между несколькими органами (Kumar et al., 2024). Кроме того, органы-на-чипе по-прежнему включают не все органоспецифичные клетки. Модель требует дальнейшего усовершенствования, например с интеграцией в нее органоидов. Группа немецких ученых создала модель для инфузии, рекрутинга и инфильтрации CAR T-клеток в солидные опухоли, объединив подходы «органов-на-чипе» и «органоиды», полученные от пациента. Модель использовали для исследования различных схем лечения дазатинибом в качестве фармакологического переключателя безопасности для контроля CAR T-клеток во время терапии. Подход позволил провести *in vitro* оценку безопасности и эффективности с учетом особенностей пациента (Maulana et al., 2024).

Микроткань

«Микроткань» – гибридная клеточная 3D-модель, которая имеет специфический тканевый фенотип и содержит тканеспецифичные компоненты ВКМ. Микроткани формируются при агрегации суспензии клеток друг к другу и/или к окружающему их ВКМ и компактизации, увеличивающей плотность 3D-структуры (Euckmans, Chen, 2017). Сформировать микроткань возможно при получении модели «сфероидов» или «органоидов» как из одного типа клеток, так и из гистологически различных типов клеток (Eke et al., 2022), а также при интеграции в модель «орган-на-чипе». При таком подходе микроткани могут представлять собой сферические многоклеточные агрегаты, созданные для воспроизведения наименьшей функциональной единицы ткани или органа. Во время самоорганизации клетки синтезируют свой собственный ВКМ, восстанавливают клеточные контакты и, таким образом, воспроизводят специфические тканевые функции и интегрированные клеточные ответы на стимулы окружающей среды. Хотя в составе микроткани формируется среда, позволяющая определенным типам клеток максимально полно имитировать их нативное поведение *in vivo*, многие

ткани в организме испытывают значительную механическую нагрузку, которая изменяет структуру матрикса и функцию клеток, что сложно воспроизвести в 3D-модели (Euckmans, Chen, 2017).

Основная область применения: медико-биологические исследования, тестирование лекарственных средств, тканевая инженерия и трансплантационная терапия (Wang Y. et al., 2020; Zhang et al., 2022).

Преимущества и недостатки микроткани

Микроткани позволяют воссоздать сложную нативную архитектуру тканей *in vivo*, в том числе имитацию сосудистой сети, взаимодействия клетка-клетка и клетка-ВКМ (Eke et al., 2022). С использованием микроткани моделируются патологические процессы для персонализированного скрининга и разработки лекарственных средств. Однако следует учитывать низкую скорость сборки для имитации макромасштабных тканей, построение сценария клеточной эволюции в 3D-измерении, приводящей к появлению функции, а не формирование конечной функциональной структуры. Кроме того, источники исходных клеток могут оказывать влияние на достоверность и воспроизводимость модели (Eke et al., 2022; Schot et al., 2023; Wang O. et al., 2023).

Перспективы применения микроткани для исследований иммунологических и онкологических заболеваний

Микроткань представляет собой биомиметическую модель *in vitro*, сформированную из сфероидов и/или органоидов в качестве биологических строительных блоков для разработки тканей и органов с помощью как простых подходов 3D-культивирования, так и инновационных инженерных систем (Burdis et al., 2022). Преимущество модели заключается в том, что организация ткани может быть полностью спроектирована, а сборка модели регулируется химически или механически для получения желаемой структуры ткани.

Клаудия Мартинс и коллеги разработали гетеротипическую модель микроткани глиобластомы на основе сфероидной модели для оценки противоопухолевых нанопрепаратов (Martins et al., 2023). Полученная модель имитировала организацию опухоли, продукцию внеклеточного матрикса и демонстрировала цитокиновую сигнатуру. Макрофаги в составе микроткани поляризовались в фенотип M1/M2 в соответствии с нанотерапией доцетакселом. В исследовании Казуаки Ниномия и Тацухико Таниучи с использованием био-3D-принтера со сфероидной укладкой на Кензан (микроигльчатая матрица) была собрана микроткань путем точного укладывания сфероидов из нормальных и раковых клеток. Данная модель впервые позволила неинвазивно наблюдать динамическое поведение инвазии раковых клеток (Ninomiya, Taniuchi, 2024). Инья Вальдхауэр с коллегами разработали гетеротипические 3D-модели микротканей для изучения активности новых противоопухолевых иммуноотерапевтических препаратов на основе ИЛ-2 (Waldhauer et al., 2013). Модель микроткани на основе клеток опухоли/фибробластов/лимфоцитов позволяет контролировать проникновение антител и их нацеливание на компоненты опухоли и стромы, изучать

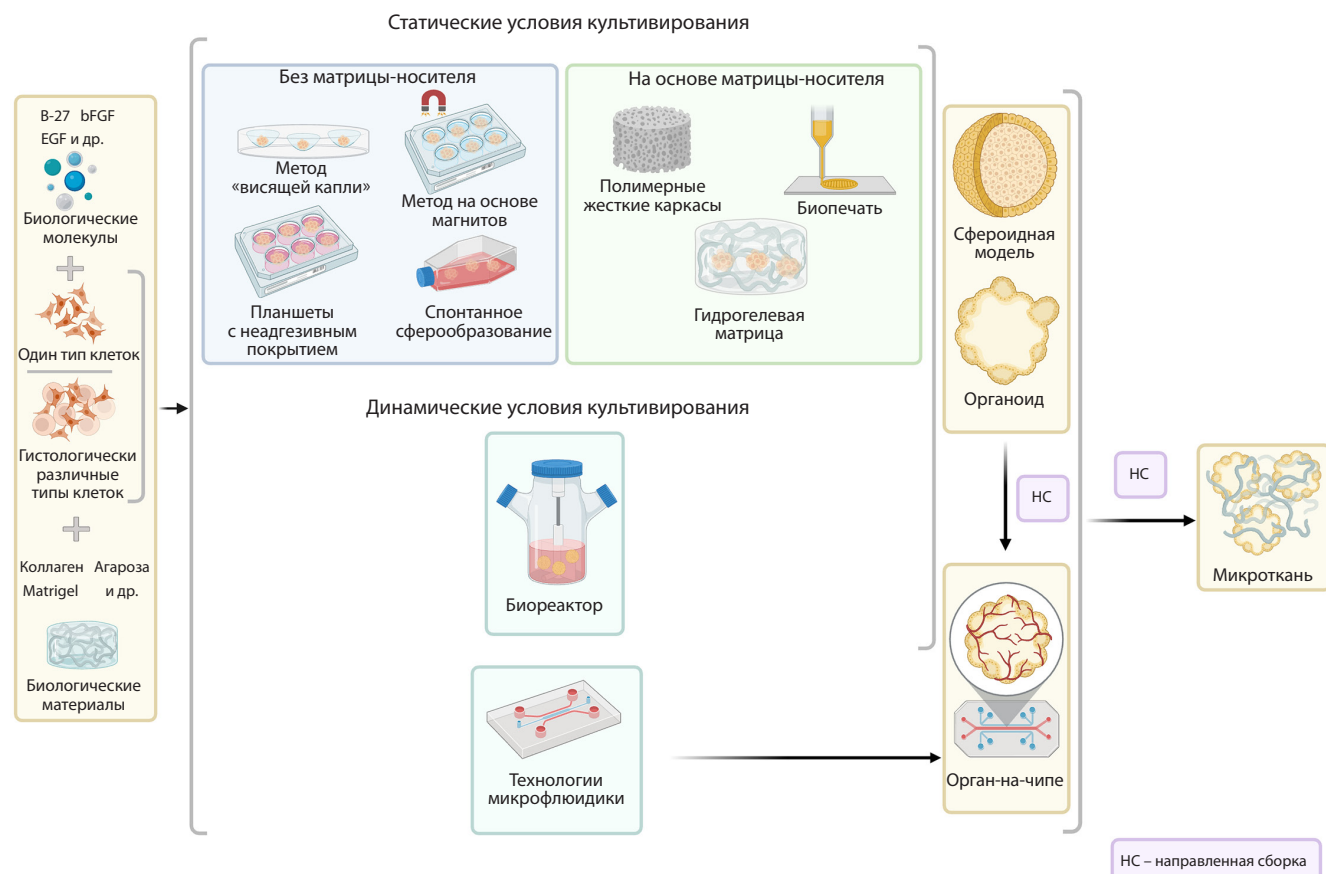


Рис. 3. Методы получения 3D-структур.

взаимодействие опухолевых клеток с иммунными клетками в системе, которая больше напоминает микросреду опухоли *in vivo*. Гьюсик Хонг с коллегами, используя системы биопечати и микрожидкостной эмульгации, сконструировали микротканную сфероидную модель с дольчатой структурой и реализацией функций печени (Hong et al., 2021). Структурированные микротканые сфероиды с выраженной васкуляризацией показали улучшенную секрецию альбумина и мочевины.

Таким образом, использование подхода микроткани предполагает комбинацию уже существующих 3D-моделей для расширения воспроизведения реалистичных особенностей ткани в области иммунологии опухолей и остается многообещающей моделью при разработке стратегий иммунотерапии.

Культивирование клеток в 3D-моделях

Условия культивирования в трехмерных системах должны обеспечивать клетки всеми физическими и химическими условиями, необходимыми для имитации среды *in vivo*. В настоящее время существует множество методов культивирования клеток в составе 3D-структур (рис. 3). При выборе способа получения 3D-клеточной структуры необходимо учитывать следующие критерии:

1) клеточный состав: моно- (Troitskaya et al., 2021) или гетерогенная клеточная модель (Arora et al., 2022; Nushataeva et al., 2022);

2) способ формирования 3D-модели: с использованием специальных матриц-носителей (Sulaiman et al., 2020) или без их использования (Nushataeva et al., 2022);

3) условия культивирования: статические (Arora et al., 2022) или динамические (Coluccio et al., 2019).

Некоторые преимущества и недостатки методов получения основных 3D-моделей приведены в таблице.

Заключение

По сравнению с клетками адгезивных культур, клетки в 3D-структурах моделируют межклеточные взаимодействия, организованные в пространстве, и клеточную гетерогенность, что в совокупности более полно отражает организацию тканей *in vivo* (Eke et al., 2022). В данном обзоре рассмотрены нюансы терминологии в области 3D-клеточного моделирования, основные подходы к получению моделей, а также перспективы их использования в биомедицинских исследованиях.

Трехмерные «сфероидные модели» и «органониды» дают возможность приблизиться к архитектуре и функциональности ткани, из которой они происходят. Однако, несмотря на преимущества этих моделей, которые позволяют учитывать часть микросреды, такой как стромальные и иммунные клетки, им все еще не хватает динамики среды, свойственной условиям *in vivo*. Микрофлюидные технологии «органов-на-чипе» в области онкологии объединяют преимущества трехмерной культуры в контролируемой и

Преимущества и недостатки способов культивирования основных 3D-моделей

Название подхода	3D-модель	Суть метода	Преимущества	Недостатки	Литературный источник
Метод «висящей капли»	Сфероидная модель, микроткань	Капля суспензии клеток помещается на крышку культурального планшета, крышка переворачивается, в результате чего клетки скапливаются на границе раздела воздух-жидкость и формируют 3D-структуру	<ul style="list-style-type: none"> • Возможность работать с небольшим количеством клеток без использования дорогостоящих реагентов • Получение большого количества 3D-культур • Возможен контроль размера модели 	<ul style="list-style-type: none"> • Объем капли ограничен необходимостью сохранения поверхностного натяжения • Гетерогенность размеров получаемых сфероидов • Не подходит для длительного культивирования • Дорого при использовании специализированных планшетов 	Higgins et al., 2010; Nguyen O.P. et al., 2021
Спонтанное сферообразование	Сфероидная модель	Спонтанное сферообразование стволовоподобных клеток при культивировании клеток в 2D-формате	<ul style="list-style-type: none"> • Получение 3D-модели без специального оборудования, материалов и факторов роста • Селективное культивирование СК • Недорогой метод 	<ul style="list-style-type: none"> • Гетерогенность размеров 3D-моделей • Отсутствие возможности получения одиночных 3D-моделей • Отсутствие возможности контроля размера модели 	Chen et al., 2021; Troitskaya et al., 2021
Использование пластика с низкими адгезионными свойствами	Сфероидная модель, органоид, микроткань	Вынужденная агрегация клеток в 3D-модель при культивировании в планшетах, дно лунок которых покрыто биополимерами, предотвращающими адгезию клеток к поверхности пластика	<ul style="list-style-type: none"> • Возможность получения одиночных моделей • Возможно сокультивирование различных типов клеток • Возможен контроль размера модели • Недорогой метод 	<ul style="list-style-type: none"> • Дорого при использовании специализированных планшетов • Невозможно контролировать однородность модели 	Jeong et al., 2020; Chen et al., 2021
Методы на основе магнитов	Сфероидная модель, органоид, микроткань	Монослой клеток инкубируют с суспензией магнитных наночастиц. Агрегация клеток с дальнейшим формированием 3D-модели происходит под действием магнитной силы	<ul style="list-style-type: none"> • Быстрая агрегация клеток • Возможен контроль размера модели • Возможно сокультивирование различных типов клеток 	<ul style="list-style-type: none"> • Гетерогенность клеточных агрегатов по форме и размерам • Дорогостоящий метод 	Caleffi et al., 2021; Gaitán-Salvatella et al., 2021
Использование гидрогелевой матрицы	Сфероидная модель, органоид, микроткань	Гидрогель используют как подложку, предотвращающую адгезию клеток к поверхности, или клетки смешивают с гидрогелем	<ul style="list-style-type: none"> • Нетоксичность субстрата • Простота манипуляций • Возможность длительного культивирования • Возможен контроль размера модели 	<ul style="list-style-type: none"> • Неоднородность состава и размеров 3D-моделей • непригоден для клеток с высоким инвазивным потенциалом • Низкая стабильность и возможная иммуногенность гидрогелевой матрицы 	Ravi et al., 2016; Badea et al., 2019
Биопечать	Микроткань	Пространственная организация клеток, имитирующая архитектуру ткани или органа, формируется при послойном нанесении материала, используемого для биопечати. Способы клеточной печати: экструзионный, струйный, лазерный, биопечать под давлением	<ul style="list-style-type: none"> • Процесс может быть автоматизирован • Возможность контроля размера модели 	<ul style="list-style-type: none"> • Дорогостоящий и технологически сложный метод 	Sun et al., 2021; Eke et al., 2022
Биореактор	Сфероидная модель, органоид	Суспензия клеток, помещенная в специальную камеру, подвергается непрерывному перемешиванию для предотвращения адгезии клеток к поверхности. Внутри биореактора происходит постоянная циркуляция питательных веществ и удаление продуктов метаболизма клеток	<ul style="list-style-type: none"> • Получение большого количества 3D-моделей на промышленном уровне 	<ul style="list-style-type: none"> • Дорогостоящий метод • Невозможно контролировать однородность модели • Скорость вращения сосуда может повлиять на физиологические реакции клеток • Отсутствие возможности контроля размера модели 	Di Buduo et al., 2021; Khan et al., 2021

Окончание таблицы

Название подхода	3D-модель	Суть метода	Преимущества	Недостатки	Литературный источник
Технологии микрофлюидики	Органоид, сфероидная модель, орган-на-чипе, микроткань	Основа: чип с каналами, в которых поддерживается постоянное ламинарное течение, а перенос осуществляется за счет диффузии	<ul style="list-style-type: none"> Использование минимального количества клеток и реагентов Контроль размера 3D-модели Быстрое формирование модели за счет постоянной перфузии Клетки минимально подвержены гипоксии за счет используемых в чипе материалов, проницаемых для кислорода, и факторов роста 	<ul style="list-style-type: none"> Сложность сбора клеток для анализа Требуется дорогое оборудование 	Bircsak et al., 2021; Nair et al., 2021
Направленная сборка	Орган-на-чипе, микроткань	Формообразование модели в желаемую структуру происходит за счет химической связи, физических взаимодействий или биологической адгезии между клетками в сфероидах или органоидах	<ul style="list-style-type: none"> Контроль состава и размера модели Подходит для тканей, богатых матриксом (кости, хрящи) 	<ul style="list-style-type: none"> Низкая воспроизводимость Сложность восстановления полной архитектуры ткани 	Kim et al., 2018; Eke et al., 2022

динамической среде. Помимо этого, сфероиды и органоиды выступают в роли строительных блоков и формируют микроткань, которая воссоздает сложности нативной архитектуры ткани *in vivo* (Eke et al., 2022).

Трехмерные клеточные модели представляют собой информативный инструмент при исследовании механизмов развития и прогрессирования заболеваний, а также выявления новых биомаркеров, поскольку максимально приближены к первичной опухоли на клеточном и молекулярно-генетическом уровне. Кроме того, такие модели служат релевантной доклинической *in vitro* платформой для разработки лекарственных препаратов и реализации потенциала персонализированной медицины.

Список литературы / References

Абдурахманова М.М., Ермаков М.С., Рихтер В.А., Коваль О.А., Нуштаева А.А. Оптимизация подходов к формированию гетерогенных трехмерных моделей рака молочной железы. *Гены и клетки*. 2022;17(4):91-103. doi 10.23868/gc425244 [Abdurakhmanova M.M., Ermakov M.S., Richter V.A., Koval O.A., Nushtaeva A.A. The optimization of methods for the establishment of heterogeneous three-dimensional cellular models of breast cancer. *Genes and Cells*. 2022;17(4):91-103. doi 10.23868/gc425244 (in Russian)]

Alver C.G., Drabbe E., Agarwal A., Ishahak M. Roadblocks confronting widespread dissemination and deployment of Organs on Chips. *Nat Commun*. 2024;15:5118. doi 10.1038/s41467-024-48864-3

Arora L., Kalia M., Dasgupta S., Singh N., Verma A.K., Pal D. Development of a multicellular 3D tumor model to study cellular heterogeneity and plasticity in NSCLC tumor microenvironment. *Front Oncol*. 2022;12:881207. doi 10.3389/fonc.2022.881207

Azizgolshani H., Coppeta J.R., Vedula E.M., Marr E.E., Cain B.P., Luu R.J., Lech M.P., Kann S.H., Mulhern T.J., Tandon V., Tan K., Haroutunian N.J., Keegan P., Rogers M., Gard A.L., Baldwin K.B., de Souza J.C., Hoefler B.C., Bale S.S., Kratchman L.B., Zorn A., Patterson A., Kim E.S., Petrie T.A., Wiellette E.L., Williams C., Isenberg B.C., Charest J.L. High-throughput organ-on-chip platform

with integrated programmable fluid flow and real-time sensing for complex tissue models in drug development workflows. *Lab Chip*. 2021;21(8):1454-1474. doi 10.1039/d1lc00067e

Badea M.A., Balas M., Hermenean A., Ciceu A., Herman H., Ionita D., Dinischiotu A. Influence of matrigel on single- and multiple-spheroid cultures in breast cancer research. *SLAS Discov*. 2019;24(5):563-578. doi 10.1177/2472555219834698

Bandara V., Niktaras V.M., Willett V.J., Chapman H., Lokman N.A., Macpherson A.M., Napoli S., Gundsambuu B., Foeng J., Sadlon T.J., Coombs J., McColl S.R., Barry S.C., Oehler M.K., Ricciardelli C. Engineered CAR-T cells targeting the non-functional P2X purinoceptor 7 (P2X7) receptor as a novel treatment for ovarian cancer. *Clin Transl Immunol*. 2024;13(5):e1512. doi 10.1002/cti2.1512

Barcellos-Hoff M.H., Aggeler J., Ram T.G., Bissell M.J. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development*. 1989;105(2):223-235. doi 10.1242/dev.105.2.223

Bircsak K.M., DeBiasio R., Miedel M., Asebahi A., Reddinger R., Saleh A., Shun T., Verneti L.A., Gough A. A 3D microfluidic liver model for high throughput compound toxicity screening in the OrganoPlate®. *Toxicology*. 2021;450:152667. doi 10.1016/j.tox.2020.152667

Boucherit N., Gorvel L., Olive D. 3D tumor models and their use for the testing of immunotherapies. *Front Immunol*. 2020;11:603640. doi 10.3389/fimmu.2020.603640

Burchett A., Siri S., Li J., Lu X., Datta M. Novel 3-D macrophage spheroid model reveals reciprocal regulation of immunomechanical stress and mechano-immunological response. *Cell Mol Bioeng*. 2024;17(5):329-344. doi 10.1007/s12195-024-00824-z

Burdis R., Chariyev-Prinz F., Browe D.C., Freeman F.E., Nulty J., McDonnell E.E., Eichholz K.F., Wang B., Brama P., Kelly D.J. Spatial patterning of phenotypically distinct microtissues to engineer osteochondral grafts for biological joint resurfacing. *Biomaterials*. 2022;289:121750. doi 10.1016/j.biomaterials.2022.121750

Caleffi J.T., Aal M.C.E., Gallindo H.O.M., Caxali G.H., Crulhas B.P., Ribeiro A.O., Souza G.R., Delella F.K. Magnetic 3D cell culture: state of the art and current advances. *Life Sci*. 2021;1(286):120028. doi 10.1016/j.lfs.2021.120028

Chen Q., Cui L., Guan Y., Zhang Y. Diels-alder cross-linked, washing-free hydrogel films with ordered wrinkling patterns for multicellular

- spheroid generation. *Biomacromolecules*. 2021;22(8):3474-3485. doi 10.1021/acs.biomac.1c00570
- Chernyavska M., Masoudnia M., Valerius T., Verdurmen W.P.R. Organ-on-a-chip models for development of cancer immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(12):3971-3983. doi 10.1007/s00262-023-03572-7
- Coluccio M.L., Perozziello G., Malara N., Parrotta E., Zhang P., Gentile F., Limongi T., Raj P.M., Cuda G., Candeloro P., Di Fabrizio E. Microfluidic platforms for cell cultures and investigations. *Microelectron Eng*. 2019;208:14-28. doi 10.1016/j.mee.2019.01.004
- Corgnac S., Damei I., Gros G., Caidi A., Terry S., Chouaib S., Deloger M., Mami-Chouaib F. Cancer stem-like cells evade CD8⁺CD103⁺ tumor-resident memory T (T_{RM}) lymphocytes by initiating an epithelial-to-mesenchymal transition program in a human lung tumor model. *J Immunother Cancer*. 2022;10(4):e004527. doi 10.1136/jitc-2022-004527
- Daly A.C., Davidson M.D., Burdick J.A. 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nat Commun*. 2021;12(1):753. doi 10.1038/s41467-021-21029-2
- Danku A.E., Dulf E., Braicu C., Jurj A., Berindan-Neagoe I. Organ-on-a-chip: a survey of technical results and problems. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:840674. doi 10.3389/fbioe.2022.840674
- Di Buduo C.A., Laurent P.A., Zaninetti C., Lordier L., Soprano P.M., Ntai A., Barozzi S., La Spada A., Biunno I., Raslova H., Bussel J.B., Kaplan D.L., Balduini C.L., Pecci A., Balduini A. Miniaturized 3D bone marrow tissue model to assess response to Thrombopoietin-receptor agonists in patients. *eLife*. 2021;10:e58775. doi 10.7554/eLife.58775
- Doost N.F., Srivastava S.K. A comprehensive review of organ-on-a-chip technology and its applications. *Biosensors*. 2024;14(5):225. doi 10.3390/bios14050225
- Duryee W.R., Doherty J.K. Nuclear and cytoplasmic organoids in the living cell. *Ann NY Acad Sci*. 1954;58(7):1210-1231. doi 10.1111/j.1749-6632.1954.tb45904.x
- Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-218. doi 10.1089/adt.2014.573
- Eke G., Vaysse L., Yao X., Escudero M., Carri A., Trevisiol E., Vieu C., Dani C., Casteilla L., Malaquin L. Cell aggregate assembly through microengineering for functional tissue emergence. *Cells*. 2022;11(9):1394. doi 10.3390/cells11091394
- Eyckmans J., Chen C.S. 3D culture models of tissues under tension. *J Cell Sci*. 2017;130(1):63-70. doi 10.1242/jcs.198630
- Fata J.E., Mori H., Ewald A.J., Zhang H., Yao E., Werb Z., Bissell M.J. The MAPK^{ERK-1,2} pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGF α and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium. *Dev Biol*. 2007;306(1):193-207. doi 10.1016/j.ydbio.2007.03.013
- Forsythe S.D., Erali R.A., Sasikumar S., Laney P., Shelkey E., D'Agostino R., Jr., Miller L.D., Shen P., Levine E.A., Soker S., Votanopoulos K.I. Organoid platform in preclinical investigation of personalized immunotherapy efficacy in appendiceal cancer: feasibility study. *Clin Cancer Res*. 2021;27(18):5141-5150. doi 10.1158/1078-0432.CCR-21-0982
- Gaitán-Salvatella I., López-Villegas E.O., González-Alva P., Susate-Olmos F., Álvarez-Pérez M.A. Case report: formation of 3D osteoblast spheroid under magnetic levitation for bone tissue engineering. *Front Mol Biosci*. 2021;8:672518. doi 10.3389/fmolb.2021.672518
- George J., Chen Y., Abdelfattah N., Yamamoto K., Gallup T.D., Adamson S.I., Rybinski B., Srivastava A., Kumar P., Lee M.G., Baskin D.S., Jiang W., Choi J.M., Flavahan W., Chuang J.H., Kim B.Y.S., Xu J., Jung S.Y., Yun K. Cancer stem cells, not bulk tumor cells, determine mechanisms of resistance to SMO inhibitors. *Cancer Res Commun*. 2022;2(6):402-416. doi 10.1158/2767-9764.CRC-22-0124
- Gilazieva Z., Ponomarev A., Rutland C., Rizvanov A., Solovyeva V. Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):2727. doi 10.3390/cancers12102727
- Grotz M., van Gijzel L., Bitsch P., Carrara S.C., Kolmar H., Garg S. Mimicking the immunosuppressive impact of fibroblasts in a 3D multicellular spheroid model. *Front Drug Discov*. 2024;4:1427407. doi 10.3389/fddsv.2024.1427407
- Gunti S., Hoke A.T.K., Vu K.P., London N.R. Organoid and spheroid tumor models: techniques and applications. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):874. doi 10.3390/cancers13040874
- Guryanov M.I. Organized frequency structure of electrocardiogram during long-duration ventricular fibrillation under experimental conditions. *Sovremennye Tehnologii v Medicine = Modern Technologies in Medicine*. 2016;8(3):37-48. doi 10.17691/stm2016.8.3.04
- Han S.J., Kwon S., Kim K.S. Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase. *Cancer Cell Int*. 2021;21(1):152. doi 10.1186/s12935-021-01853-8
- Heinrich M.A., Huynh N.T., Heinrich L., Prakash J. Understanding glioblastoma stromal barriers against NK cell attack using tri-culture 3D spheroid model. *Heliyon*. 2024;10(3):e24808. doi 10.1016/j.heliyon.2024.e24808
- Higgins C.A., Richardson G.D., Ferdinando D., Westgate G.E., Jahoda C.A.B. Modelling the hair follicle dermal papilla using spheroid cell cultures. *Exp Dermatol*. 2010;19(6):546-548. doi 10.1111/j.1600-0625.2009.01007.x
- Hofer M., Lutolf M.P. Engineering organoids. *Nat Rev Mater*. 2021;6(5):402-420. doi 10.1038/s41578-021-00279-y
- Hong G., Kim J., Oh H., Yun S., Kim C.M., Jeong Y., Yun W., Shim J., Jang I., Kim C., Jin S. Production of multiple cell-laden microtissue spheroids with a biomimetic hepatic-lobule-like structure. *Adv Mater*. 2021;33(36):e2102624. doi 10.1002/adma.202102624
- Hsu T.W., Lu Y.J., Lin Y.J., Huang Y.T., Hsieh L.H., Wu B.H., Lin Y.C., Chen L.C., Wang H.W., Chuang J.C., Fang Y.Q., Huang C.C. Transplantation of 3D MSC/HUVEC spheroids with neuroprotective and proangiogenic potentials ameliorates ischemic stroke brain injury. *Biomaterials*. 2021;272:120765. doi 10.1016/j.biomaterials.2021.120765
- Ivascu A., Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol*. 2007;31(6):1403-1413. doi 10.3892/ijo.31.6.1403
- Jedrzejszak-Silicka M. History of cell culture. In: *New Insights into Cell Culture Technology*. InTech, 2017. doi 10.5772/66905
- Jeibouei S., Khazraie A., Hojat A., Reza A. Human-derived Tumor-On-Chip model to study the heterogeneity of breast cancer tissue. *Biomater Adv*. 2024;162:213915. doi 10.1016/j.bioadv.2024.213915
- Jeong H.S., Park C.Y., Kim J.H., Joo H.J., Choi S.C., Choi J.H., Lim I.R., Park J.H., Hong S.J., Lim D.S. Cardioprotective effects of genetically engineered cardiac stem cells by spheroid formation on ischemic cardiomyocytes. *Mol Med*. 2020;26(1):15. doi 10.1186/s10020-019-0128-8
- Kang S.M., Kim D., Lee J.H., Takayama S., Park J.Y. Engineered microsystems for spheroid and organoid studies. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(2):e2001284. doi 10.1002/adhm.202001284
- Karimifard S.A., Salehzadeh-Yazdi A., Taghizadeh-Tabarsi R., Akbari-Birgani S. Mechanical effects modulate drug resistance in MCF-7-derived organoids: insights into the wnt/ β -catenin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024;695:149420. doi 10.1016/j.bbrc.2023.149420
- Kassis T., Hernandez-Gordillo V., Langer R., Griffith L.G. OrgaQuant: human intestinal organoid localization and quantification using deep convolutional neural networks. *Sci Rep*. 2019;9(1):12479. doi 10.1038/s41598-019-48874-y
- Khan I., Prabhakar A., Delepine C., Tsang H., Pham V., Sur M. A low-cost 3D printed microfluidic bioreactor and imaging chamber for live-organoid imaging. *Biomicrofluidics*. 2021;15(2):024105. doi 10.1063/5.0041027

- Kim T.Y., Kofron C.M., King M.E., Markes A.R., Okundaye A.O., Qu Z., Mende U., Choi B.R. Directed fusion of cardiac spheroids into larger heterocellular microtissues enables investigation of cardiac action potential propagation via cardiac fibroblasts. *PLoS One*. 2018;13(5):e0196714. doi 10.1371/journal.pone.0196714
- Kumar S., Wei G., Aggarwal N. Organ-on-chip technology: opportunities and challenges. *Biotechnol Notes*. 2024;5:8-12. doi 10.1016/j.biotno.2024.01.001
- Lee G.Y., Kenny P.A., Lee E.H., Bissell M.J. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods*. 2007;4(4):359-365. doi 10.1038/nmeth1015
- Li M.L., Aggeler J., Farson D.A., Hatier C., Hassell J., Bissell M.J. Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(1):136-140. doi 10.1073/pnas.84.1.136
- Lohasz C., Loretan J., Sterker D., Görlach E., Renggli K., Argast P., Frey O., Wiesmann M., Wartmann M., Rausch M., Hierlemann A. A microphysiological cell-culturing system for pharmacokinetic drug exposure and high-resolution imaging of arrays of 3D microtissues. *Front Pharmacol*. 2021;12:785851. doi 10.3389/fphar.2021.785851
- Magenau J., Runaas L., Reddy P. Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2016;173(2):190-205. doi 10.1111/bjh.13959
- Maliszewska-Olejniczak K., Brodaczywska K.K., Bielecka Z.F., Solarek W., Kornakiewicz A., Szczylik C., Porta C., Czarnecka A.M. Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells. *Cytotechnology*. 2019;71(1):149-163. doi 10.1007/s10616-018-0273-x
- Martins C., Pacheco C., Moreira-Barbosa C., Marques-Magalhães Â., Dias S., Araújo M., Oliveira M.J., Sarmiento B. Glioblastoma immuno-endothelial multicellular microtissue as a 3D *in vitro* evaluation tool of anti-cancer nano-therapeutics. *J Control Release*. 2023;353:77-95. doi 10.1016/j.jconrel.2022.11.024
- Maulana T.I., Teufel C., Cipriano M., Roos J., Lazarevski L., van den Hil F.E., Scheller L., Orlova V., Koch A., Hudecek M., Alb M., Loskill P. Breast cancer-on-chip for patient-specific efficacy and safety testing of CAR-T cells. *Cell Stem Cell*. 2024;31(7):989-1002.e9. doi 10.1016/j.stem.2024.04.018. Epub 2024 May 15. PMID 38754430
- Mesci P., de Souza J.S., Martin-Sancho L., Macia A., Saleh A., Yin X., Snethlage C., Adams J.W., Avansini S.H., Herai R.H., Almenar-Queralt A., Pu Y., Szeto R.A., Goldberg G., Bruck P.T., Papes F., Chanda S.K., Muotri A.R. SARS-CoV-2 infects human brain organoids causing cell death and loss of synapses that can be rescued by treatment with Sofosbuvir. *PLoS Biol*. 2022;20(11):e3001845. doi 10.1371/journal.pbio.3001845
- Miao X., Wang C., Chai C., Tang H., Hu J., Zhao Z., Luo W., Zhang H., Zhu K., Zhou W., Xu H. Establishment of gastric cancer organoid and its application in individualized therapy. *Oncol Lett*. 2022;24(6):447. doi 10.3892/ol.2022.13567
- Moradi-Mehr S., Khademy M., Akbari-Birgani S., Kafian H., Lalenejad M., Abdollahpour D., Moghimi M. Comparative evaluation of the therapeutic strategies using a minimal model of luminal-A breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;666:107-114. doi 10.1016/j.bbrc.2023.05.028
- Moscona A. Development of heterotypic combinations of dissociated embryonic chick cells. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;92(2):410-416. doi 10.3181/00379727-92-22495
- Nair A.L., Mesch L., Schulz I., Becker H., Raible J., Kiessling H., Werner S., Rothbauer U., Schmees C., Busche M., Trennheuser S., Fricker G., Stelzle M. Parallelizable microfluidic platform to model and assess *in vitro* cellular barriers: technology and application to study the interaction of 3D tumor spheroids with cellular barriers. *Biosensors*. 2021;11(9):314. doi 10.3390/bios11090314
- Neal J.T., Li X., Zhu J., Giangarra V., Grzeskowiak C.L., Ju J., Liu I.H., Chiou S.H., Salahudeen A.A., Smith A.R., Deutsch B.C., Liao L., Zemek A.J., Zhao F., Karlsson K., Schultz L.M., Metzner T.J., Nadauld L.D., Tseng Y.Y., Alkhairi S., Oh C., Keskula P., Mendoza-Villanueva D., De La Vega F.M., Kunz P.L., Liao J.C., Leppert J.T., Sunwoo J.B., Sabatti C., Boehm J.S., Hahn W.C., Zheng G.X.Y., Davis M.M., Kuo C.J. Organoid modeling of the tumor immune resource organoid modeling of the tumor immune microenvironment. *Cell*. 2018;175(7):1972-1988.e16. doi 10.1016/j.cell.2018.11.021
- Nguyen M., De Ninno A., Mencattini A., Mermet-Meillon F., Fornabaio G., Evans S.S., Cossutta M., Khira Y., Han W., Sirven P., Pelon F., Di Giuseppe D., Bertani F.R., Gerardino A., Yamada A., Descroix S., Soumelis V., Mechta-Grigoriou F., Zalzman G., Camonis J., Martinelli E., Businaro L., Parrini M.C. Dissecting effects of anti-cancer drugs and cancer-associated fibroblasts by on-chip reconstitution of immunocompetent tumor microenvironments. *Cell Rep*. 2018;25(13):3884-3893. doi 10.1016/j.celrep.2018.12.015
- Nguyen O.P., Misun P.M., Lohasz C., Lee J., Wang W., Schroeder T., Hierlemann A. An immunocompetent microphysiological system to simultaneously investigate effects of anti-tumor natural killer cells on tumor and cardiac microtissues. *Front Immunol*. 2021;12:781337. doi 10.3389/fimmu.2021.781337
- Nikonorova V.G., Chrishtop V.V., Mironov V.A., Prilepskii A.Y. Advantages and potential benefits of using organoids in nanotoxicology. *Cells*. 2023;12(4):610. doi 10.3390/cells12040610
- Ninomiya K., Taniuchi T. Assembly of a tumor microtissue by stacking normal and cancer spheroids on Kenzan using a bio-3D printer to monitor dynamic cancer cell invasion in the microtissue. *Biochem Eng J*. 2024;212:109536. doi 10.1016/j.bej.2024.109536
- Noorintan S.T., Angelius C., Torizal F.G. Organoid models in cancer immunotherapy: bioengineering approach for personalized treatment. *Immuno*. 2024;4(4):312-324. doi 10.3390/immuno4040020
- Nushtaeva A.A., Savinkova M.M., Ermakov M.S., Varlamov M.E., Novak D.D., Richter V.A., Koval O.A. Breast cancer cells in 3D model alters their sensitivity to hormonal and growth factors. *Cell Tissue Biol*. 2022;16(6):555-567. doi 10.1134/S1990519X22060050
- Paşca S.P., Arlotta P., Bateup H.S., Camp J.G., Cappello S., Gage F.H., Knoblich J.A., Kriegstein A.R., Lancaster M.A., Ming G.L., Muotri A.R., Park I.H., Reiner O., Song H., Studer L., Temple S., Testa G., Treutlein B., Vaccarino F.M. A nomenclature consensus for nervous system organoids and assembloids. *Nature*. 2022;609(7929):907-910. doi 10.1038/s41586-022-05219-6
- Petersen O.W., Rønnow-Jessen L., Howlett A.R., Bissell M.J. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(19):9064-9068. doi 10.1073/pnas.89.19.9064
- Ponti D., Costa A., Zaffaroni N., Pratesi G., Petrangolini G., Coradini D., Pilotti S., Pierotti M.A., Daidone M.G. Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*. 2005;65(13):5506-5511. doi 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626
- Ravi M., Kaviya S.R., Paramesh V. Culture phases, cytotoxicity and protein expressions of agarose hydrogel induced Sp2/0, A549, MCF-7 cell line 3D cultures. *Cytotechnology*. 2016;68(3):429-441. doi 10.1007/s10616-014-9795-z
- Rheinwald J.G., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation keratinized colonies from single cell is. *Cell*. 1975;6(3):331-343. doi 10.1016/S0092-8674(75)80001-8
- Rodrigues D.B., Reis R.L., Pirraco R.P. Modelling the complex nature of the tumor microenvironment: 3D tumor spheroids as an evolving tool. *J Biomed Sci*. 2024;31(1):13. doi 10.1186/s12929-024-00997-9
- Sadovska L., Zandberga E., Sagini K., Jekabsons K., Riekstina U., Kalniņa Z., Llorente A., Linē A. A novel 3D heterotypic spheroid model for studying extracellular vesicle-mediated tumour and immune cell communication. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(2):1930-1935. doi 10.1016/j.bbrc.2017.12.072
- Sakalem M.E., De Sibio M.T., da Costa F.A.D.S., de Oliveira M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. *Biotechnol J*. 2021;16(5):e2000463. doi 10.1002/biot.202000463

- Schnalzger T.E., De Groot M.H.P., Zhang C., Mosa M.H., Michels B.E., Röder J., Darvishi T., Wels W.S. 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids. *EMBO J.* 2019;38(12):e100928. doi 10.15252/embj.2018100928
- Schot M., Araújo-Gomes N., Van Loo B., Kamperman T., Leijten J. Scalable fabrication, compartmentalization and applications of living microtissues. *Bioact Mater.* 2023;19:392-405. doi 10.1016/j.bioactmat.2022.04.005
- Shamir E.R., Ewald A.J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(10):647-664. doi 10.1038/nrm3873
- Simian M., Bissell M.J. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol.* 2017;216(1):31-40. doi 10.1083/jcb.201610056
- Singh D., Mathur A., Arora S., Roy S., Mahindroo N. Applied surface science advances journey of organ on a chip technology and its role in future healthcare scenario. *Appl Surf Sci Adv.* 2022;9:100246. doi 10.1016/j.apsadv.2022.100246
- Sulaiman S., Chowdhury S.R., Fauzi M.B., Rani R.A., Mohamadyahaya N.H., Tabata Y., Hiraoka Y., Idrus R.B.H., Hwei N.M. 3D culture of MSCs on a gelatin microsphere in a dynamic culture system enhances chondrogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):2688. doi 10.3390/ijms21082688
- Sun M., Liu A., Yang X., Gong J., Yu M., Yao X., Wang H., He Y. 3D cell culture – can it be as popular as 2D cell culture? *Adv Nano-Biomed Res.* 2021;1(5):2000066. doi 10.1002/anbr.202000066
- Sutherland R.M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science.* 1988;240(4849):177-184. doi 10.1126/science.2451290
- Tanaka Y., Nishikawa M., Mizukami Y., Kusamori K., Ogino Y., Nishimura S., Shimizu K., Konishi S., Takahashi Y., Takakura Y. Control of polarization and tumoricidal activity of macrophages by multicellular spheroid formation. *J Control Release.* 2018;270:177-183. doi 10.1016/j.jconrel.2017.12.006
- Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. EGFR transgene stimulates spontaneous formation of MCF7 breast cancer cells spheroids with partly loss of HER3 receptor. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12937. doi 10.3390/ijms222312937
- Valent P., Bonnet D., De Maria R., Lapidot T., Copland M., Melo J.V., Chomienne C., Ishikawa F., Schuringa J.J., Stassi G., Huntly B., Herrmann H., Soulier J., Roesch A., Schuurhuis G.J., Wöhrer S., Arock M., Zuber J., Cerny-Reiterer S., Johnsen H.E., Andreeff M., Eaves C. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(11):767-775. doi 10.1038/nrc3368
- Vasileva N.S., Kuligina E.V., Dymova M.A., Savinovskaya Y.I., Zinchenko N.D., Ageenko A.B., Mishinov S.V., Dome A.S., Stepanov G.A., Richter V.A., Semenov D.V. Transcriptome changes in glioma cells cultivated under conditions of neurosphere formation. *Cells.* 2022;11(19):3106. doi 10.3390/cells11193106
- Veith I., Nurmik M., Mencattini A., Damei I., Lansche C., Brosseau S., Gropplero G., Corgnac S., Filippi J., Poté N., Guenzi E., Chassac A., Mordant P., Tosello J., Sedlik C., Piaggio E., Girard N., Camonis J., Shirvani H., Mami-Chouaib F., Mehta-Grigoriou F., Descroix S., Martinelli E., Zalcman G., Parrini M.C. Assessing personalized responses to anti-PD-1 treatment using patient-derived lung tumor-on-chip. *Cell Rep Med.* 2024;5(5):101549. doi 10.1016/j.xcrm.2024.101549
- Verjans E.T., Doijen J., Luyten W., Landuyt B., Schoofs L. Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: worth the effort? *J Cell Physiol.* 2018;233(4):2993-3003. doi 10.1002/jcp.26052
- Waldhauer I., Morra L., Lehmann S., Agarkova I., Zumstein P., Kelm J.M., Umana P., Klein C., Bacac M. Abstract LB-264: development of 3D microtissue models to study the activity of novel tumor-targeted immunotherapeutics. *Cancer Res.* 2013;73(8_Supplement):LB-264. doi 10.1158/1538-7445.AM2013-LB-264
- Wang O., Han L., Lin H., Tian M., Zhang S., Duan B., Chung S., Zhang C., Lian X., Wang Y., Lei Y. Fabricating 3-dimensional human brown adipose microtissues for transplantation studies. *Bioact Mater.* 2023;22:518-534. doi 10.1016/j.bioactmat.2022.10.022
- Wang Y., Kankala R.K., Zhang J., Hao L., Zhu K., Wang S., Zhang Y.S., Chen A. Modeling endothelialized hepatic tumor microtissues for drug screening. *Adv Sci.* 2020;7(21):2002002. doi 10.1002/adv.202002002
- Wei W., Cardes F., Hierlemann A., Modena M.M. 3D *in vitro* blood-brain-barrier model for investigating barrier insults. *Adv Sci.* 2023;10(11):e2205752. doi 10.1002/adv.202205752
- Weiswald L.B., Bellet D., Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia.* 2015;17(1):1-15. doi 10.1016/j.neo.2014.12.004
- Wolter J.R. Proliferating pigment epithelium: producing a simple organoid structure in the subretinal space of a human eye. *Arch Ophthalmol.* 1967;77(5):651-654. doi 10.1001/archophth.1967.00980020653016
- Zhang J., Li C., Meng F., Guan Y., Zhang T., Yang B., Ren Z., Liu X., Li D., Zhao J., Zhao J., Wang Y., Peng J. Functional tissue-engineered microtissue formed by self-aggregation of cells for peripheral nerve regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):3. doi 10.1186/s13287-021-02676-0
- Zhou Z., Van der Jeught K., Fang Y., Yu T., Li Y., Ao Z., Liu S., Zhang L., Yang Y., Eyvani H., Cox M.L., Wang X., He X., Ji G., Schneider B.P., Guo F., Wan J., Zhang X., Lu X. An organoid-based screen for epigenetic inhibitors that stimulate antigen presentation and potentiate T-cell-mediated cytotoxicity. *Nat Biomed Eng.* 2021;5(11):1320-1335. doi 10.1038/s41551-021-00805-x

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 02.11.2024. После доработки 28.11.2024. Принята к публикации 28.11.2024.