

ПРИМЕНЕНИЕ ПОКРЫТИЯ ИЗ СИЛИКОНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ МЕТОДОМ ВИСЯЧЕЙ КАПЛИ

С.Ю. Филиппова* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>

А.О. Ситковская* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>

Л.Н. Ващенко* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2267-3460>

Э.Э. Кечеджиева* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3051-6628>

И.Р. Дашкова* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9688-9550>

Т.В. Аушева* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7073-9463>

Ю.В. Пржедецкий* ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3976-0210>

*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
(г. Ростов-на-Дону)

Большое значение в современной экспериментальной онкологии приобрели 3D-культуры клеток, т. к. они позволяют получить более релевантные результаты по сравнению с традиционными 2D-культурами. Проблема создания релевантных клеточных моделей остается актуальной и для исследований рака молочной железы. Метод висячей капли является одним из самых распространенных способов выращивания 3D-культуры. Исследователи постоянно разрабатывают модификации данного метода для уменьшения вариации в размерах и форме получаемых клеточных сфероидов. Одним из путей решения этой задачи является нанесение гидрофобного покрытия на поверхность культурального пластика. В качестве покрытия часто используют силиконы или лабораторную пленку парафильм (Parafilm®), тем самым добиваясь увеличения кривизны поверхности капли, которое приводит к ускоренной агрегации клеток в ее центре. **Целью** настоящего исследования было оценить возможность применения покрытия из силиконового эластомера СИЭЛ 159-330 (Россия) для модификации метода висячей капли. **Материалы и методы.** Изучались цитотоксические свойства и влияние на процесс формирования клеточных сфероидов в висячей капле покрытия из силиконового эластомера СИЭЛ 159-330, отвержденного при уменьшенной по сравнению с рекомендованной производителем температуре. Материалом для исследования послужили клетки культуры рака молочной железы ВТ-474. **Результаты.** Исследование установило, что тестируемый эластомер не оказывает влияния на жизнеспособность клеток. При этом покрытие из СИЭЛ 159-330 существенно сокращает, в сравнении с полистиролом, время формирования клеточных агрегатов в нижней части капли. Кроме того, клеточные сфероиды культуры рака молочной железы, полученные на покрытии из СИЭЛ 159-330,

Ответственный за переписку: Филиппова Светлана Юрьевна, адрес: 344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63; e-mail: filsv@yandex.ru

Для цитирования: Филиппова С.Ю., Ситковская А.О., Ващенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э., Дашкова И.Р., Аушева Т.В., Пржедецкий Ю.В. Применение покрытия из силикона для получения клеточных сфероидов методом висячей капли // Журн. мед.-биол. исследований. 2022. Т. 10, № 1. С. 44–51. DOI: 10.37482/2687-1491-Z089

обладают меньшей вариативностью по размерам и форме по сравнению со сфероидами, выращенными на полистироле и покрытии из парафильма.

Ключевые слова: метод висячей капли, культура клеток BT-474, рак молочной железы, клеточный сфероид, силиконовый эластомер.

Залогом получения релевантных результатов экспериментальных исследований, проводимых *in vitro* на клетках человека и животных, служит подбор адекватных методов культивирования. Метод двумерного культивирования клеток является традиционным и по-прежнему используется в большинстве исследований, в т. ч. и в экспериментальной онкологии. Известно, однако, что различия между характеристиками клеток в двумерной (2D) монослойной культуре рака молочной железы и клетками опухоли *in vivo* значительны. Так, между клетками, выращенными в виде 2D-монослоя *in vitro*, и клетками *in vivo* наблюдаются отличия в морфологии, экспрессии целого ряда генов [1], межклеточной сигнализации, а также во взаимодействиях с внеклеточным матриксом (ВКМ), что, в частности, отражается на устойчивости клеток опухоли к химиотерапии и ставит под вопрос релевантность исследований новых противоопухолевых препаратов [2, 3]. В связи с этим в экспериментальной онкологии все большее внимание привлекают 3-мерные (3D) клеточные модели, более полно отражающие характеристики клеток опухоли *in vivo* [4].

Основные способы получения 3D-культур можно разделить на две большие группы – заключение клеток в биогели, имитирующие ВКМ [5], и получение клеточных агрегатов, так называемых сфероидов. Преимуществом сфероидов является то, что клетки в них образуют непосредственные контакты друг с другом, в связи с чем сфероиды представляют собой более адекватные модели для изучения процессов, в которых значительную роль играет межклеточная сигнализация, опосредованная взаимодействием клеточных мембран, например процессов коллективной миграции опухолевых клеток, экставазации и др. [6].

Один из наиболее популярных способов получения клеточных сфероидов – метод висячей капли, впервые описанный J.M. Kelm et al. [7]: формирование клеточного сфероида происходит путем естественной агрегации клеток в нижней части висячей капли под действием силы тяжести. Преимуществами данного метода перед другими способами создания 3D-культур являются хорошая воспроизводимость и низкая стоимость, позволяющие достичь надежных результатов экспериментов при небольших вложениях. С тех пор как этот метод был впервые предложен, сообщалось о различных его модификациях, направленных на ускорение образования сфероида, уменьшение необходимого количества клеток для его формирования, упрощение и автоматизацию процессов замены среды и анализа роста клеток в сфероидах и др. [6].

Ключевым моментом для успешного формирования сфероида остается краевой угол смачивания, образуемый между поверхностью капли и основанием. Известно, что чем больше этот угол, тем больше кривизна поверхности капли и тем быстрее будет происходить агломерация клеток в ее нижней части. Увеличения краевого угла смачивания капли добиваются нанесением на лабораторную посуду гидрофобных покрытий, например лабораторной пленки парафильм (Parafilm®) [8, 9] или полидиметилсилоксана (ПДМС) [10]. ПДМС относится к силиконам – обширной группе соединений, обладающих самыми разнообразными свойствами в зависимости от модификаций их состава [11].

Силиконы находят широкое применение в различных областях человеческой деятельности, однако спектр силиконов, используемых в клеточных культурах, не так широк. Мы предположили, что биологически инертный

эластомер СИЭЛ 159-330, производимый для медицинских целей в АО «Государственный Орден Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений» (Москва) [12], может быть относительно недорогой отечественной альтернативой ПДМС для покрытия лабораторной посуды с целью получения гидрофобной поверхности. В ходе ранее проведенных исследований нами было обнаружено, что существенным ограничением для использования данного эластомера в лабораторной практике является довольно жесткий термический режим, необходимый для отверждения силикона: длительный нагрев до 80 °С приводит к деформации лабораторной посуды из полистирола, обычно применяемой для культивирования клеток. Вместе с тем более мягкий режим, а именно длительный нагрев до 60 °С, дает удовлетворительное по физическим свойствам покрытие, не деформируя при этом поверхности из полистирола. Однако не известно, какое влияние отвержденный в таких условиях силиконовый компаунд оказывает на жизнеспособность клеток, культивируемых на его поверхности. Также в литературе отсутствуют данные о динамике формирования сфероида в висячей капле на покрытии из СИЭЛ 159-330. Целью настоящего исследования было оценить возможность применения покрытия из силиконового эластомера СИЭЛ 159-330 для модификации метода висячей капли.

Материалы и методы. Тестируемый эластомер СИЭЛ 159-330 приготавливали согласно инструкции производителя. После нанесения полученной смеси на поверхность дна или крышек чашки Петри (Eppendorf, Германия) помещали в термостат и выдерживали 18 ч при 60 °С. После отверждения эластомера чашки Петри дважды отмывали в дистиллированной воде и стерилизовали парами перекиси водорода под давлением при температуре не выше 56 °С в стерилизаторе Sterrad 100NX (Johnson & Johnson, США).

Материалом для исследования послужили клетки культуры трижды негативного рака мо-

лочной железы BT-474, которые выращивали при температуре 37 °С и содержании CO₂ 5,5 % в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10 %-й эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Исследование цитотоксической активности СИЭЛ 159-330 проводили в чашках Петри диаметром 6 см, дно которых было обработано тестируемым эластомером. Так как, по предварительным данным, покрытие из СИЭЛ 159-330 не поддерживает клеточную адгезию, в качестве контроля в эксперименте использовали 3 %-ю агарозу, которая также не позволяет клеткам прикрепиться к субстрату. Опытные и контрольные пробы имели по 6 повторностей. В каждую чашку Петри вносили по 2·10⁶ клеток в 5 мл среды культивирования. На 1, 2 и 3-и сутки культивирования из образцов после тщательного перемешивания отбирали по 100 мкл клеточной суспензии и подсчитывали долю живых клеток на автоматическом счетчике Eve (NanoEntek Inc., Корея) с применением окрашивания 0,4 %-м трипановым синим. Доля живых клеток приведена в тексте как среднее значение и стандартное отклонение ($M \pm SD$) по результатам измерений в 6 экспериментальных повторах. Значимость отличий устанавливали при помощи критерия Манна–Уитни (критический уровень значимости – $p \leq 0,05$).

Динамику образования клеточного сфероида в висячей капле изучали на той же клеточной линии, полученной в аналогичных условиях культивирования. На крышку чашки Петри (диаметр – 6 см), покрытую СИЭЛ 159-330, или парафильмом PM-992 (Bemis, США), или не имеющую покрытия, наносили по 10⁴ клеток в 20 мкл среды культивирования – по 10 капель для каждого варианта опыта. После нанесения капель с клетками крышки аккуратно переворачивали и помещали на нижние камеры чашек, заполненные физиологическим раствором для предотвращения избыточного испарения. Образующиеся клеточные конгломераты фотографировали с применением инвертированного микроскопа DM IL LED (Leica, Германия), оснащенного цифровой камерой, через 4, 24, 48 и 72 ч культивирования. На основе полученных

изображений проводили качественный анализ образующихся клеточных конгломератов.

Результаты. Тест с витальным красителем 0,4 %-м трипановым синим показал, что покрытие из эластомера СИЭЛ 159-330 не оказывает влияния на жизнеспособность клеток культуры ВТ-474 (см. *таблицу*). Сравнение средних значений с применением *U*-критерия Манна–Уитни показало, что доля живых клеток в опытных образцах статистически значимо не отличалась

ности. Однако кривизна поверхности капли на покрытии из СИЭЛ 159-330, вероятно, не отличалась существенно от таковой для капель, нанесенных на полистирол, и была меньше, чем на парафильме. Хотя в исследовании не производилось измерение контактного угла, образуемого поверхностью капли с основанием, об увеличенной кривизне поверхности капли можно судить по ее уменьшенному диаметру на парафильме (3,66 мм) по сравнению с та-

**ПРОВЕРКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ ВТ-474,
ВЫРАЩЕННЫХ НА ПОКРЫТИИ СИЭЛ 159-330, $M \pm SD$**

**VIABILITY OF VT-474 CULTURE CELLS
OBTAINED ON THE SIEL 159-330 COATING, $M \pm SD$**

Образцы	Доля живых клеток, %, при длительности культивирования, ч		
	24	48	72
Опытные (СИЭЛ 159-330)	90±5,8	84±7,3	78±5,2
Контрольные (3 %-я агароза)	87±8,2	86±5,1	74±8,5

от контроля ($p > 0,05$) для всех протестированных временных промежутков. Таким образом, изменение температурного режима отверждения эластомера не сказалось на его биологических свойствах. Следовательно, данный силиконовый компаунд может применяться в клеточной культуре в сочетании с традиционным пластиком из полистирола, достаточно лишь уменьшить температуру полимеризации с 80 до 60 °С.

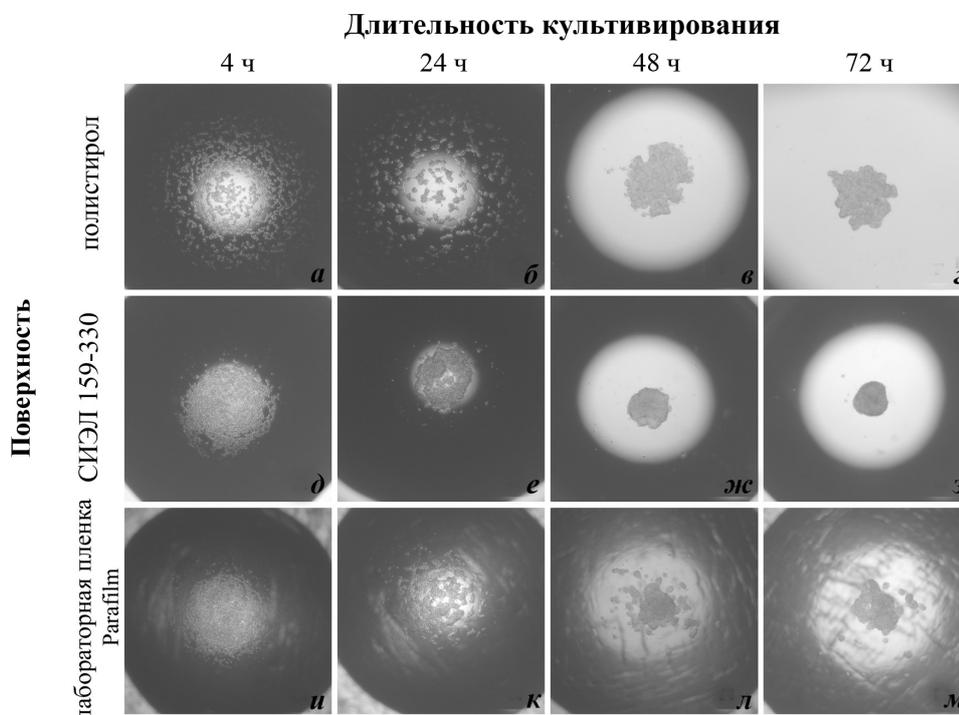
Тест на образование клеточных сфероидов в висячей капле продемонстрировал, что использование гидрофобного покрытия значительно ускорило формирование сфероидов по сравнению с полистиролом. В образцах как на СИЭЛ 159-330, так и на парафильме уже спустя 4 ч культивирования все клетки собрались в нижней части капли, в то время как на полистироле клетки более равномерно распределялись по большей площади поверхности капли (см. *рисунок, а, д, и*).

Мы ожидали, что ускоренная агрегация клеток обусловлена увеличенной кривизной поверхности капли на гидрофобной поверх-

ковом на полистироле (4,24 мм) и эластомере (4,16 мм). На формирование агрегата могло повлиять не только поверхностное натяжение, но и, например, заряд поверхности и другие факторы, которые не исследовались в данном эксперименте.

Несмотря на сходное поведение клеток в первые часы эксперимента, через 24 ч культивирования стала заметна разница между эластомером и парафильмом: на покрытии из СИЭЛ 159-330 клеточные конгломераты продолжили равномерно уплотняться с уменьшением общей площади образующихся сфероидов (см. *рисунок, е*). Одновременно с этим в каплях, нанесенных на парафильм, скопления клеток стали дробиться на отдельные фрагменты без уменьшения общей площади конгломератов (см. *рисунок, к*). В контрольных образцах через 24 ч также наблюдалось образование отдельных групп клеток без общего уменьшения площади скоплений (см. *рисунок, б*).

Через 48 ч культивирования во всех образцах на силиконовом эластомере образовались округлые сфероиды сходной геометрии с ров-



Вид образующихся клеточных агрегатов культуры ВТ-474 в висячей капле на различных поверхностях при разной длительности культивирования (увеличение объектива $\times 2$)

Cell aggregates of the ВТ-474 culture forming in a hanging drop on different surfaces at different cultivation durations ($\times 2$ magnification)

ными краями (см. рисунок, ж), в то время как на парафильме и полистироле скопления клеток имели неровные края и часто образовывали несколько групп клеток, лежащих рядом, но не объединяющихся в один сфероид (см. рисунок, в, л). По истечении 72 ч культивирования произошло дальнейшее уплотнение клеточных конгломератов во всех образцах без существенного изменения их формы (см. рисунок, з, м).

Таким образом, применение покрытия из СИЭЛ 159-330 значительно ускорило получение клеточного сфероида в висячей капле и способствовало образованию более равномерных по размеру и обладающих более правильной формой сфероидов по сравнению с образцами на парафильме и полистироле.

Обсуждение. Проведенное исследование установило, что покрытие из силиконо-

вого эластомера СИЭЛ 159-330, отвержденного при 60 °С в течение 18 ч, не оказывает негативного влияния на жизнеспособность клеток, поэтому его можно применять в различных приложениях клеточных технологий. Поскольку исследуемый эластомер не поддерживает адгезию клеток, то, помимо использования его для получения сфероидов методом висячей капли, он может служить, например, для создания покрытия при изучении свойств стволовых клеток вместо покрытия из агарозы [13]. Кроме того, СИЭЛ 159-330 представляет интерес как альтернатива ПДМС при создании органов-на-чипах – микрофлюидных систем, позволяющих проводить культивирование клеток и эксперименты над ними в условиях, приближенных к естественным [14]. Однако потребуются дальнейшие исследования для

уточнения условий совместного применения СИЭЛ 159-330 с молдингами из различных материалов.

Как показал эксперимент с образованием клеточного сфероидов в висячей капле, применение покрытия СИЭЛ 159-330 способствует ускоренной, по сравнению с полистиролом, агрегации клеток в нижней части капли с получением сфероидов, мало варьирующих по форме и размерам. Сокращение времени формирования сфероидов, по нашему мнению, может способствовать использованию более длительных экспозиций в исследованиях биологической активности новых противоопухолевых препаратов. Кроме того, образующиеся на покрытии из СИЭЛ 159-330 сфероиды обладают более компактной структурой, что говорит об их большей механической прочности. Увеличенная механическая прочность сфероидов делает его более устойчивым к манипуляциям по замене среды или переносу сфероидов, которые могут потребоваться для нужд эксперимента. Уменьшение вариативности в размерах и форме получае-

мых клеточных сфероидов имеет, в свою очередь, большое значение для масштабирования экспериментов, т. к. позволяет сократить количество экспериментальных образцов. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что покрытие из силиконового эластомера СИЭЛ 159-330 по своим характеристикам не уступает покрытию из ПДМС [10] и может быть использовано вместо него для ускоренного формирования клеточных сфероидов в висячей капле. По литературным данным, покрытие из ПДМС позволяет существенно сократить объем клеточного материала вплоть до 200 клеток на сфероид [10], что дает возможность для использования в 3D-культурах клеток редких и малочисленных клеточных популяций, например стволовых клеток опухоли или минорных субпопуляций лимфоцитов. Каков минимальный порог клеточности для образования сфероидов на покрытии из СИЭЛ 159-330, еще предстоит определить.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Kum O.I., Shatova Yu.S., Novikova I.A., Vladimirova L.Yu., Ulyanova E.P., Komova E.A., Kechedzheva E.E. Экспрессия P53 и VCL2 при различных подтипах рака молочной железы // *Фундам. исследования*. 2014. № 10-1. С. 85–88.
2. Souza A.G., Silva I.B.B., Campos-Fernandez E., Barcelos L.S., Souza J.B., Marangoni K., Goulart L.R., Alonso-Goulart V. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response // *Curr. Pharm. Des.* 2018. Vol. 24, № 15. P. 1689–1694. DOI: [10.2174/1381612824666180404152304](https://doi.org/10.2174/1381612824666180404152304)
3. Межевова И.В., Ситковская А.О., Кум О.И. Первичные культуры опухолевых клеток: современные методы получения и поддержания *in vitro* // *Юж.-рос. онкол. журн.* 2020. Т. 1, № 3. С. 36–49. DOI: [10.37748/2687-0533-2020-1-3-4](https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-3-4)
4. Costa E.C., Moreira A.F., de Melo-Diogo D., Gaspar V.M., Carvalho M.P., Correia I.J. 3D Tumor Spheroids: An Overview on the Tools and Techniques Used for Their Analysis // *Biotechnol. Adv.* 2016. Vol. 34, № 8. P. 1427–1441. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2016.11.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002)
5. Тимофеева С.В., Шамова Т.В., Ситковская А.О. 3D-биопринтинг микроокружения опухоли: последние достижения // *Журн. общей биологии*. 2021. Т. 82, № 5. С. 389–400. DOI: [10.31857/s0044459621050067](https://doi.org/10.31857/s0044459621050067)
6. Nunes A.S., Barros A.S., Costa E.C., Moreira A.F., Correia I.J. 3D Tumor Spheroids as *in vitro* Models to Mimic *in vivo* Human Solid Tumors Resistance to Therapeutic Drugs // *Biotechnol. Bioeng.* 2019. Vol. 116, № 1. P. 206–226. DOI: [10.1002/bit.26845](https://doi.org/10.1002/bit.26845)
7. Kelm J.M., Timmins N.E., Brown C.J., Fussenegger M., Nielsen L.K. Method for Generation of Homogeneous Multicellular Tumor Spheroids Applicable to a Wide Variety of Cell Types // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. Vol. 83, № 2. P. 173–180. DOI: [10.1002/bit.10655](https://doi.org/10.1002/bit.10655)

8. Oliveira M.B., Neto A.I., Correia C.R., Rial-Hermida M.I., Alvarez-Lorenzo C., Mano J.F. Superhydrophobic Chips for Cell Spheroids High-Throughput Generation and Drug Screening // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014. № 6. P. 9488–9495. DOI: [10.1021/am5018607](https://doi.org/10.1021/am5018607)
9. Fu J.J., Lv X.H., Wang L.X., He X., Li Y., Yu L., Li C.M. Cutting and Bonding Parafilm® to Fast Prototyping Flexible Hanging Drop Chips for 3D Spheroid Cultures // *Cell. Mol. Bioeng.* 2021. Vol. 14. P. 187–199. DOI: [10.1007/s12195-020-00660-x](https://doi.org/10.1007/s12195-020-00660-x)
10. Kuo C.-T., Wang J.-Y., Lin Y.-F., Wo A.M., Chen B.P.C., Lee H. Three-Dimensional Spheroid Culture Targeting Versatile Tissue Bioassays Using a PDMS-Based Hanging Drop Array // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. Art. № 4363. DOI: [10.1038/s41598-017-04718-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-04718-1)
11. Краев И.Д., Попков О.В., Шульдебов Е.М., Сорокин А.Е., Юрков Г.Ю. Перспективы использования кремнийорганических полимеров при создании современных материалов и покрытий различных назначений // *Тр. ВИАМ*. 2017. № 12(60). С. 48–62. DOI: [10.18577/2307-6046-2017-0-12-5-5](https://doi.org/10.18577/2307-6046-2017-0-12-5-5)
12. Нанушьян С.Р. Кремнийорганические материалы ускоренной вулканизации: история создания и развития направления // *Хим. промышленность сегодня*. 2015. № 11. С. 21–26.
13. Guo X., Chen Y., Ji W., Chen X., Li C., Ge R. Enrichment of Cancer Stem Cells by Agarose Multi-Well Dishes and 3D Spheroid Culture // *Cell Tissue Res.* 2019. Vol. 375, № 2. P. 397–408. DOI: [10.1007/s00441-018-2920-0](https://doi.org/10.1007/s00441-018-2920-0)
14. Wan L., Neumann C.A., LeDuc P.R. Tumor-on-a-Chip for Integrating a 3D Tumor Microenvironment: Chemical and Mechanical Factors // *Lab. Chip*. 2020. № 5. P. 873–888. DOI: [10.1039/c9lc00550a](https://doi.org/10.1039/c9lc00550a)

References

1. Kit O.I., Shatova Yu.S., Novikova I.A., Vladimirova L.Yu., Ul'yanova E.P., Komova E.A., Kechedzhieva E.E. Ekspressiya P53 i BCL2 pri razlichnykh podtipakh raka molochnoy zhelezy [P53 and BCL2 Expression in Different Breast Cancer Subtypes]. *Fundamental'nye issledovaniya*, 2014, no. 10-1, pp. 85–88.
2. Souza A.G., Silva I.B.B., Campos-Fernandez E., Barcelos L.S., Souza J.B., Marangoni K., Goulart L.R., Alonso-Goulart V. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. *Curr. Pharm. Des.*, 2018, vol. 24, no.15, pp. 1689–1694. DOI: [10.2174/1381612824666180404152304](https://doi.org/10.2174/1381612824666180404152304)
3. Mezhevova I.V., Sitkovskaya A.O., Kit O.I. Primary Tumor Cell Cultures: Current Methods of Obtaining and Subcultivation. *South Russ. J. Cancer*, 2020, vol. 1, no. 3, pp. 36–49. DOI: [10.37748/2687-0533-2020-1-3-4](https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-3-4)
4. Costa E.C., Moreira A.F., de Melo-Diogo D., Gaspar V.M., Carvalho M.P., Correia I.J. 3D Tumor Spheroids: An Overview on the Tools and Techniques Used for Their Analysis. *Biotechnol. Adv.*, 2016, vol. 34, no. 8, pp. 1427–1441. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2016.11.002](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.002)
5. Timofeeva S.V., Shamova T.V., Sitkovskaya A.O. 3D-bioprinting mikrookruzeniya opukholi: poslednie dostizheniya [3D Bioprinting of Tumor Microenvironment: Recent Achievements]. *Zhurnal obshchey biologii*, 2021, vol. 82, no. 5, pp. 389–400. DOI: [10.31857/s0044459621050067](https://doi.org/10.31857/s0044459621050067)
6. Nunes A.S., Barros A.S., Costa E.C., Moreira A.F., Correia I.J. 3D Tumor Spheroids as *in vitro* Models to Mimic *in vivo* Human Solid Tumors Resistance to Therapeutic Drugs. *Biotechnol. Bioeng.*, 2019, vol. 116, no. 1, pp. 206–226. DOI: [10.1002/bit.26845](https://doi.org/10.1002/bit.26845)
7. Kelm J.M., Timmins N.E., Brown C.J., Fussenegger M., Nielsen L.K. Method for Generation of Homogeneous Multicellular Tumor Spheroids Applicable to a Wide Variety of Cell Types. *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, vol. 83, no. 2, pp. 173–180. DOI: [10.1002/bit.10655](https://doi.org/10.1002/bit.10655)
8. Oliveira M.B., Neto A.I., Correia C.R., Rial-Hermida M.I., Alvarez-Lorenzo C., Mano J.F. Superhydrophobic Chips for Cell Spheroids High-Throughput Generation and Drug Screening. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2014, vol. 6, no. 12, pp. 9488–9495. DOI: [10.1021/am5018607](https://doi.org/10.1021/am5018607)
9. Fu J.J., Lv X.H., Wang L.X., He X., Li Y., Yu L., Li C.M. Cutting and Bonding Parafilm® to Fast Prototyping Flexible Hanging Drop Chips for 3D Spheroid Cultures. *Cell. Mol. Bioeng.*, 2021, vol. 14, pp. 187–199. DOI: [10.1007/s12195-020-00660-x](https://doi.org/10.1007/s12195-020-00660-x)
10. Kuo C.-T., Wang J.-Y., Lin Y.-F., Wo A.M., Chen B.P.C., Lee H. Three-Dimensional Spheroid Culture Targeting Versatile Tissue Bioassays Using a PDMS-Based Hanging Drop Array. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7. Art. no. 4363. DOI: [10.1038/s41598-017-04718-1](https://doi.org/10.1038/s41598-017-04718-1)
11. Краев И.Д., Попков О.В., Шульдебов Е.М., Сорокин А.Е., Юрков Г.Ю. Перспективы использования кремнийорганических полимеров при создании современных материалов и покрытий различных назначений [Prospects for the Use of Organosilicon Elastomers in the Development of Modern Polymer Materials and Coatings for Various Purposes]. *Trudy VIAM*, 2017, no. 12, pp. 48–62. DOI: [10.18577/2307-6046-2017-0-12-5-5](https://doi.org/10.18577/2307-6046-2017-0-12-5-5)

12. Nanush'yan S.R. Kremniyorganicheskie materialy uskorennoy vulkanizatsii: istoriya sozdaniya i razvitiya napravleniya [Fast-Curing Organosilicon Materials: History of Creation and Development]. *Khimicheskaya promyshlennost' segodnya*, 2015, no. 11, pp. 21–26.

13. Guo X., Chen Y., Ji W., Chen X., Li C., Ge R. Enrichment of Cancer Stem Cells by Agarose Multi-Well Dishes and 3D Spheroid Culture. *Cell Tissue Res.*, 2019, vol. 375, no. 2, pp. 397–408. DOI: [10.1007/s00441-018-2920-0](https://doi.org/10.1007/s00441-018-2920-0)

14. Wan L., Neumann C.A., LeDuc P.R. Tumor-on-a-Chip for Integrating a 3D Tumor Microenvironment: Chemical and Mechanical Factors. *Lab. Chip*, 2020, vol. 20, no. 5, pp. 873–888. DOI: [10.1039/c9lc00550a](https://doi.org/10.1039/c9lc00550a)

DOI: 10.37482/2687-1491-Z089

*Svetlana Yu. Filippova** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>

*Anastasiya O. Sitkovskaya** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>

*Larisa N. Vashchenko** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2267-3460>

*Emma E. Kechedzhieva** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3051-6628>

*Irina R. Dashkova** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9688-9550>

*Tat'ana V. Ausheva** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7073-9463>

*Yuriy V. Przhedetskiy** ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3976-0210>

*National Medical Research Centre for Oncology
(Rostov-on-Don, Russian Federation)

APPLICATION OF SILICONE COATING FOR OBTAINING CELL SPHEROIDS USING THE HANGING DROP METHOD

In modern experimental oncology, 3D cell cultures have become particularly important, as they provide more relevant results compared to traditional 2D cultures. The problem of obtaining relevant cell models remains urgent for the study of breast cancer. One of the most common techniques for obtaining a 3D culture is the hanging drop method. Researchers are constantly developing its modifications to reduce variations in the shape and size of the resulting cell spheroids. One of the ways to solve this problem is to apply a hydrophobic coating to the surface of cell culture plastics. Silicones or Parafilm® laboratory films are often used for this purpose. As a result, the curvature of the drop surface increases, which leads to accelerated aggregation of cells in the centre of the drop. The **purpose** of this research was to evaluate the possibility of applying a coating made of the silicone elastomer SIEL 159-330 (Russia) to modify the hanging drop method. **Materials and methods.** We used the SIEL 159-330 coating cured at a temperature lower than that recommended by the manufacturer and investigated its cytotoxic properties as well as its effect on the formation of cell spheroids in a hanging drop. The material for the study was the BT-474 breast cancer cell line. **Results.** The research found that the tested elastomer has no effect on cell viability. At the same time, SIEL 159-330, compared to polystyrene, significantly reduces the time of cell aggregate formation in the lower part of the drop. In addition, cell spheroids of the breast cancer culture obtained on the SIEL 159-330 coating vary less in shape and size than spheroids obtained on the polystyrene or Parafilm coating.

Keywords: hanging drop method, BT-474 cell line, breast cancer, cell spheroid, silicone elastomer.

Поступила 28.08.2021

Принята 10.01.2022

Received 28 August 2021

Accepted 10 January 2022

Corresponding author: Svetlana Filippova, address: ul. 14-ya liniya 63, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation; e-mail: filsv@yandex.ru

For citation: Filippova S.Yu., Sitkovskaya A.O., Vashchenko L.N., Kechedzhieva E.E., Dashkova I.R., Ausheva T.V., Przhedetskiy Yu.V. Application of Silicone Coating for Obtaining Cell Spheroids Using the Hanging Drop Method. *Journal of Medical and Biological Research*, 2022, vol. 10, no. 1, pp. 44–51. DOI: 10.37482/2687-1491-Z089