

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)

Лаборатория медицинской биотехнологии

ГБОУ Гимназия № 1543 им. Ю.В. Завельского

**Композит бактериальной целлюлозы для 3D-культивирования опухолевых
клеток**

Алтана Манджиева Бадмаевна 10Б класс

Анна Лукьянова Анатольевна 10Б класс

Научный руководитель:

м.н.с. Анастасия Николаевна Шишпарёнок

Научный консультант:

д. б. н., гл.н.с., доцент Дмитрий Дмитриевич Жданов

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление.....	2
Список сокращений.....	3
1. Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	6
2.1. 2D-культуры клеток и их применение.....	6
2.2. Перспективы использования 3D-культур клеток для изучения рака.....	8
2.3. Бактериальная целлюлоза и ее применение в биомедицине.....	10
3. Материалы и методы.....	12
3.1. Получение бактериальной целлюлозы.....	12
3.2. Получение композита.....	13
3.3. Оценка физико-химических характеристик композита.....	15
3.4. Выращивание клеток.....	16
3.5. Расчет значений цитотоксичности IC50.....	16
3.6. МТТ-тест.....	17
3.7. Статистический анализ.....	18
3.8. Флуоресцентная микроскопия.....	17
4. Результаты и обсуждение.....	18
4.1. Характеристика физико-химических свойств композита бц-пэг-пвс.....	18
4.2. Подбор оптимального количества клеток H1299 для выращивания в 2D-культуре.....	19
4.3. Подбор оптимальной концентрации клеток для выращивания в композите БЦ-ПЭГ-ПВС.....	20
4.4. Оценка действия цисплатина на 2D-культуру H1299.....	21
4.5. Оценка действия цисплатина на 3D-культуру клеток H1299... Error! Bookmark not defined.	
4.6. Перспективы практического применения.....	24
5. Выводы.....	24
Благодарности.....	25
Список литературы.....	26

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЦ – бактериальная целлюлоза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид

ПВС – поливиниловый спирт

ПЭГ – полиэтиленгликоль

2D – двумерный

3D – трехмерный

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) – минимальная необходимая среда

Игла, модифицированная Дульбекко

DMSO – диметилсульфоксид

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) – фосфатно-солевой буфер Дульбекко

FBS – (Fetal Bovine Serum) Фетальная бычья сыворотка

HS – Среда Хестрина-Шрамма

IC50 (Half Maximal Inhibitory Concentration) – полумаксимальная ингибирующая концентрация

In vitro – модель клеточные культуры

In vivo – животные модели

MEM (Minimal Essential Medium) – минимальная необходимая среда

PBS (Phosphate buffered Saline) – фосфатно-солевой буферный раствор

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) – додецилсульфат натрия

1. ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ в России за 2021 год смертность от рака легких, трахеи и бронхов занимает 4 место от числа всех случаев (62,46 человек из 10000). Поэтому проблема борьбы с раковыми заболеваниями актуальна.

Разработка лекарственных препаратов имеет множество этапов, среди которых есть длительные доклинические испытания, в рамках которых препараты тестируются на клеточных культурах (*in vitro*) и на живых организмах (*in vivo*) (Wang с соавторами, 2018). Множество препаратов, проявивших активность на клеточных культурах (т.е. 2D моделях), оказались не эффективными при исследованиях на животных и человеке (Duval с соавторами, 2017). Использование животных моделей *in vivo* лучше отражает опухолевые физиологические процессы, но требует больших финансовых и временных затрат. Поэтому разработка новых подходов тестирования противоопухолевых препаратов является **актуальной** задачей.

Одним из решений этой проблемы является создание моделей опухоли *in vitro*, имитирующих трехмерную структуру (3D) (Katt с соавторами, 2016). Они выступают в качестве промежуточного звена между цепочкой исследований *in vitro* и *in vivo* (Griffith and Swartz, 2006), так как клетки в 3D-культуре имитируют морфологию, биохимический и клеточный состав опухолей и их микросреду более точно (Huyn с соавторами, 2014).

Одним из перспективных материалов для 3D культивирования является БЦ (Curvello с соавторами, 2021). Она обладает высокой биосовместимостью (Fontana с соавторами, 2017), чистотой и отсутствием иммуногенности, а также простотой получения и модификации (Shishparenok с соавторами, 2024). Так как БЦ ранее была недостаточно рассмотрена для применения в культивировании клеток, то ее применение для 3D культивирования является новым.

Цель настоящей работы: создать композит на основе бактериальной целлюлозы для трехмерного (3D) культивирования опухолевых клеток. Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- получить композит на основе бактериальной целлюлозы для выращивания клеток в 3D-культуре;
- определить оптимальное количество опухолевых клеток H1299 (немелкоклеточный рак легкого) для выращивания в 2D и 3D-культурах для тестирования противоопухолевого вещества цисплатина;
- сравнить действие противоопухолевого вещества цисплатина на опухолевые клетки H1299 (немелкоклеточный рак легкого) в 2D- и 3D-культурах;

Предмет исследования: способность композита БЦ-ПВС-ПЭГ поддерживать жизнеспособность и пролиферацию опухолевых клеток H1299 (немелкоклеточный рак легкого), соответствующую моделям *in vivo*; оптимальное количество опухолевых клеток H1299 (немелкоклеточный рак легкого) для выращивания в композите БЦ-ПВС-ПЭГ; обеспечение композита БЦ-ПВС-ПЭГ действия цисплатина на опухолевые клетки H1299 (немелкоклеточный рак легкого), соответствующее моделям *in vivo*;

Объект исследования: *in vitro* 3D модель раковой опухоли на основе композита БЦ-ПВС-ПЭГ, заселенная опухолевыми клетками H1299 (немелкоклеточный рак легкого)

Гипотеза: *in vitro* 3D модель раковой опухоли на основе композита БЦ-ПВС-ПЭГ будет служить эффективным инструментом для тестирования лекарств

Вклад авторов: Авторы проводили часть экспериментальных исследований, писали части разделов «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», «Выводы».

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. 2D-КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

На сегодняшний день рак является одной из ведущих причин смерти в мире: в 2020 году было зарегистрировано около 19,3 миллиона новых случаев рака и почти 10 миллионов смертей от него (Sung с соавторами, 2021). Поэтому изучение и создание противоопухолевых препаратов стали одними из самых актуальных задач современной биомедицины.

Раковая опухоль (злокачественное новообразование) – группа клеток, которые могут неограниченно делиться. В норме соматические клетки человека могут делиться лишь только ограниченное число раз. Это обеспечивается лимитирующими факторами: мутациями ДНК, перестройкой клеточного метаболизма, активацией процессов программированной клеточной гибели (апоптоза). Преодоление же клеткой данных ограничений способствует превращению обычной клетки в раковую. (Rodriguez-Brenes с соавторами, 2015).

Раковая опухоль трудно поддается полному лечению как хирургическим вмешательством, так и лекарственными препаратами, поэтому найти эффективный способ борьбы ней - одна из важнейших задач современной биомедицины.

Основа исследований рака - клеточные культуры: на них, в частности на раковых клеточных линиях, проводятся все первичные тесты противоопухолевых препаратов. Клеточная культура – это клетки, которые выращиваются вне их естественной среды (*in vitro*) в контролируемых условиях (температура, pH, питательная среда, уровни CO₂ и O₂).

Раковые клеточные линии – это группы клеток, выделенные из одного злокачественного образования и поддерживающиеся в культуре путем пересевов в размножающемся состоянии. При их использовании не требуется регулярное получение новых образцов (Mirabelli с соавторами, 2019). Так же они хорошо изучены, поэтому их легче использовать как объекты для тестирований, так как можно предсказать как поведет себя культура в тех или иных условиях. Обычно, образцы клеточных линий хранятся в виде двумерных культур, которые легче контролировать, изучать и поддерживать их жизнедеятельность.

Двухмерная (2D) культура клеток – способ культивирования клеток *in vitro*, при котором структура клеточной культуры - монослой (Рис. 1). 2D-культуры выращиваются в питательных средах, содержащих необходимые компоненты для поддержания жизнедеятельности клеток.

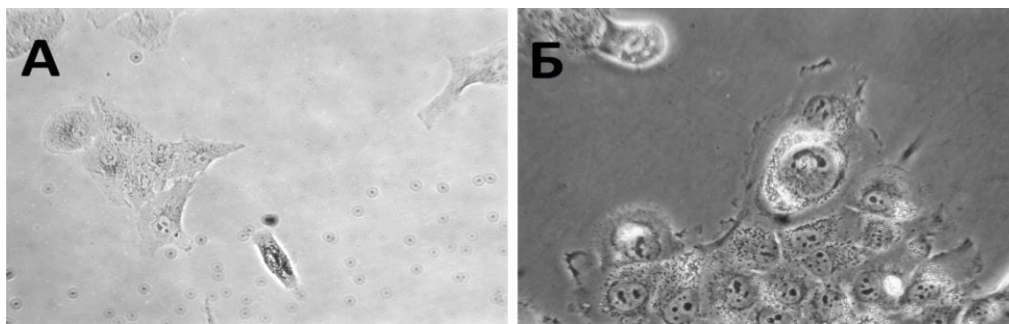


Рисунок 1. Пример монослойной культуры при увеличении $\times 20$. А - линия A549—аденокарциномные альвеолярные базальные эпителиальные клетки человека; Б - линия H1299—немелкоклеточный рак легкого человека.

Перед выходом на рынок все лекарственные препараты проходят многолетние испытания как *in vitro*, так и *in vivo* (доклинические исследования), которые включают ряд тестов, необходимых для допуска препарата в массовое производство и продажу: токсикологические тестирования, подбор оптимального состава, подбор оптимальной дозы препарата и др. Первые тесты нового противоопухолевого препарата проводятся исключительно на изолированных культурах клеток в контролируемых условиях, и только после их успеха препарат можно будет тестировать на объектах *in vivo*: сначала на иммунодефицитных мышах, потом на людях.

Несмотря на дешевизну и простоту использования 2D-культур, результаты токсикологических тестирований с использованием таких культур кардинально отличаются от результатов на объектах *in vivo* (животных и людях). Обусловлено это тем, что окружение 2D-культур слабо имитирует окружение настоящих опухолей (Рис. 2), а также тем, что все клетки в монослое слабо различаются между собой, в то время как состав полноценной опухоли гетерогенен: там могут присутствовать как раковые, так и здоровые клетки, и их свойства могут варьироваться от центра к периферии опухоли (Рис. 2). 2D-культуры слабо имитируют межклеточные взаимодействия и взаимодействия клеток с межклеточным матриксом, так как не подразумевают наличие клеток иммунной системы и других структур, которые могут повлиять как на структуру и свойства опухоли, так и на ее лечение (Jo с соавторами, 2018) (Рис. 2). Так же их среды не могут полностью имитировать естественный обмен веществ в тканях человека, так как некорректно воспроизводят химический состав окружения клеток в организме человека.

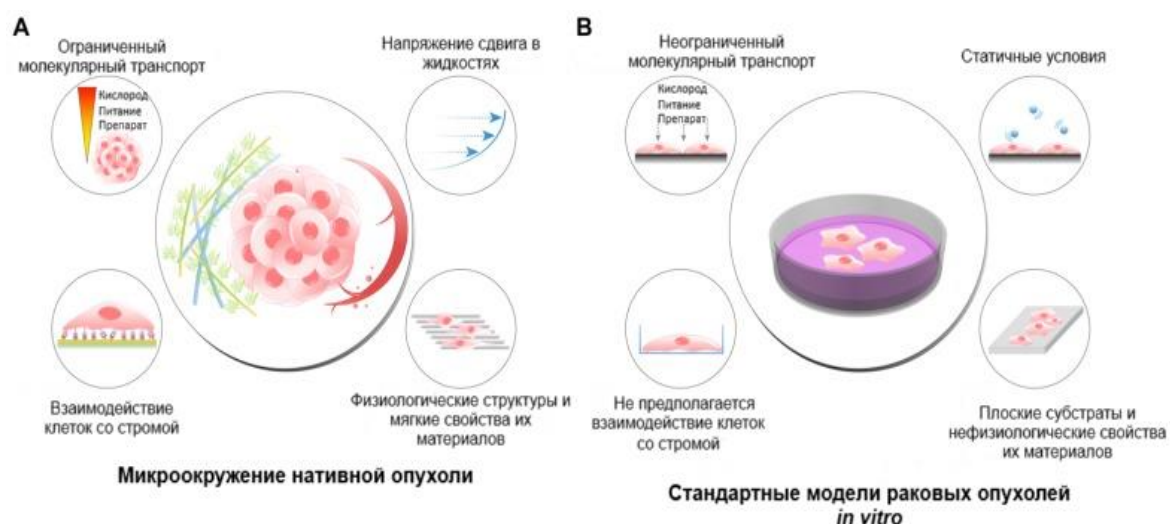


Рисунок 2. Сравнение 2D монослойной культуры и естественной раковой опухоли (Jo с соавторами, 2018).

2.2. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ 3D-КУЛЬТУР КЛЕТОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАКА

Воссоздание всей сложности рака человека в культурах клеток и мышах для доклинических испытаний – крайне трудная задача, в направлении которой уже достигнуты значительные успехи. В числе которых – создание 3D-культур раковых клеток, которые заполняют пробел между традиционными 2D-культурами и моделями мышей, так как такая технология может позволить создавать модели полноценных опухолей и их окружения в лабораторных условиях, что может исключить ошибки в тестированиях, вызванные недостатками 2D-культур (HogenEsch and Nikitin, 2012).

3D-модель клеточной культуры - модели клеточной культуры, в которой внеклеточный матрикс искусственно формируется вне тела, что позволяет клеткам расти во всех измерениях и взаимодействовать с окружающей средой. Поскольку клетки в 3D-культуре растут в среде, имитирующую внеклеточный матрикс, они обладают схожими характеристиками с клетками и органами человеческого тела, в том числе и экспрессией генов и морфологией. Еще одним ключевым преимуществом является то, что клетки имеют ограниченный доступ (градиент диффузии) к кислороду, питательным веществам, метаболитам и сигнальным молекулам, создавая экологические ниши и микросреды, тогда как в 2D клетки имеют неограниченный доступ к ним и в равных количествах. В отличие от 2D-культуры клеток, взаимодействия клеток в 3D-культуре между собой и 3D-каркасом (внеклеточным матриксом) аналогичны взаимодействиям в среде *in vivo* (Рис. 3) (Lee с соавторами, 2023).

2D культура клеток



3D культура клеток



Рисунок 3. Сравнение 3D и 2D клеточной культуры

Наибольший интерес к 3D-культивированию клеток существует в области онкологии в том в прогнозировании противоопухолевых методов лечения, таких как химиотерапия, радиотерапия и так далее. Так как, во-первых, опухолевые ткани обладают значительной гетерогенностью, которую сложно или невозможно воспроизвести в классических 2D-культурах, а во-вторых, опухолевым клеткам свойственно формировать специфическое микроокружение, сильно влияющее как на сами опухолевые, так и на нормальные ткани (Poornima, с соавторами. 2022).

3D-культивирование широко применяется для тестирования лекарств и наноматериалов в доклинических испытаниях (Griffith and Swartz, 2006). Так, токсикологические исследования показали, что 3D-культуры клеток почти не уступают исследованиям *in vivo* с целью проверки токсичности лекарственных соединений.

Методы получения 3D культуры клеток множество, но особое внимание следует уделить скаффолд-методу, в котором клетки вводятся или диспергируются в пористой структуре матрикса. Так как такой каркас является своеобразной имитацией внеклеточного матрикса, то химический состав и форма каркаса будут влиять на свойства как опухолевых, так и иммунных клеток, а также на передачу молекулярных сигналов между ними. Обычно матриксы представляют собой гидрогелевые каркасы, состоящие из гидрофильных полимерных сеток, удерживающих воду и обладающие мягкой эластичной консистенцией, низким поверхностным натяжением. Методы работы с гидрогелями заключается в высевании клеточной суспензии на поверхность после полимеризации и смешивании клеток с жидким гидрогелем с последующим затвердеванием.

Анализ фенотипических и функциональных характеристик клеток в составе 3D-культур, как правило, проводится теми же привычными методами, что и для 2D-культур,

включая микроскопию, проточную цитометрию, методы оценки экспрессии генов и т. д. (Aroga с соавторами, 2022).

Особенность 3D-культур состоит в том, что они позволяют проводить оценку как отдельных клеток, так и клеточных агрегатов в целом (Nii с соавторами, 2020). Клеточные агрегаты можно зафиксировать и использовать для приготовления срезов, в которых может быть исследовано количество и расположение клеток, а также отдельных белков, входящих в состав культуры. Таким образом, использование 3D-моделей злокачественных опухолей позволяет изучать как рост и развитие опухоли в целом, так и функциональное состояние отдельных компонентов ее микроокружения.

2.3. БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В БИМЕДИЦИНЕ

Бактериальная целлюлоза (БЦ) — целлюлоза, синтезируемая внеклеточно несколькими видами бактерий в виде пленки (Rogova с соавторами, 2022).

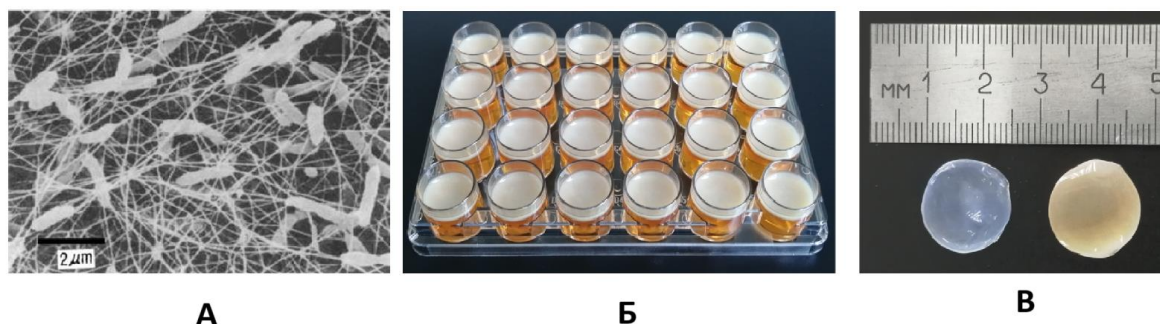


Рисунок 5. А) Микрофотография клеток бактерий рода *Komagataeibacter*, продуцирующих БЦ (Campano с соавторами. 2016); Б, В) Внешний вид пленок БЦ (Shishparenok с соавторами, 2024).

Род бактерий *Komagataeibacter* (Рис. 5 А) в настоящее время является наиболее изученным продуцентом БЦ. Это строго аэробные грамотрицательные бактерии, преобразовывающие основные источники углерода (глюкозу, глицерин, сахарозу, фруктозу, маннит) при температурах от 25 °С до 30 °С при pH 4-7. Обычно БЦ (Рис. 6) получают методами статического и перемешиваемого культивирования бактерий (Silva с соавторами, 2022).

Наиболее известной средой для выращивания бактерий, продуцирующих целлюлозу, является среда Хестрина–Шрамма (HS) (Hyun с соавторами, 2014).

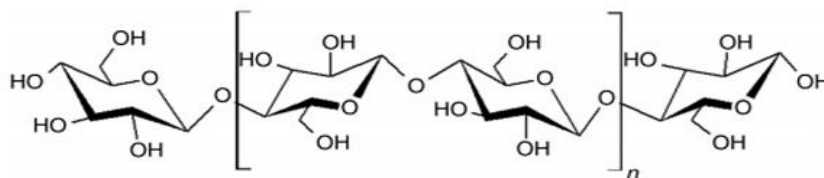


Рисунок 6. Химическая структура бактериальной целлюлозы (Fontana с соавторами, 2017).

Благодаря своей трехмерной структуре БЦ обладает рядом свойств, которые делают ее перспективным материалом для использования в различных направлениях биомедицины. В отличие от своего растительного аналога, БЦ не имеет в составе гемицеллюлозы и лигнина, что облегчает ее очистку. Степень полимеризации БЦ ниже, а микрофибриллы тоньше (70-80 нм) и более упорядочены (Thompson and Hamilton, 2001). Также БЦ обладает высокой пористостью, позволяет ей удерживать жидкость в 200 раз больше собственной массы. Также БЦ обладает высокой биосовместимостью, что делает такой материал совместимым с человеческими тканями (Fontana с соавторами, 2017)

В последнее время БЦ рассматривается как перспективный материал для создания композитов для культивирования клеток, в частности для 3D-культивирования опухолевых клеток (Curvello с соавторами, 2021). Ранее для 3D-культивирования были разработаны другие органические матрицы для 3D-культивирования – Matrigel™ и Geltrex™ (Lv с соавторами, 2017). Они хоть и основаны на натуральных компонентах, но имеют высокую стоимость и вариативны по составу от партии к партии. БЦ же обладает высокой чистотой, биосовместимостью, нетоксичностью и трехмерной фибриллярной структуре. Также БЦ легко поддается модификациям, образуя композитный материал. В то же время у матриц для 3D культивирования на основе БЦ существуют некоторые недостатки, такие, как сложности в изготовлении 3D-культур, снижение адгезии и пролиферации клеток (Shishparenok с соавторами, 2024). Для решения первой проблемы предлагается использовать методы 3D-печати бактериальных культур для получения более стандартизированных матриц. Для решения второй проблемы БЦ можно модифицировать с помощью различных порообразователей или биodeградируемых полимеров. На настоящий момент на основе БЦ и природных полимеров (желатин, хитозан, гиалуроновая кислота, пептиды) было описано несколько композитов для 3D-культивирования клеток (Shishparenok с соавторами, 2024).

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Для получения БЦ использовали штамм-продуцент *Komagataeibacter hansenii* (номер В-11239), который приобретен Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Для выращивания продуцента *Komagataeibacter hansenii* использовали модифицированную среду Хестрина-Шрамма (Нуун с соавторами, 2014).

Среда Хестрина-Шрамма (HS) имела следующий состав: 10 г/л глюкозы (Sigma, США), 5 г/л пептона мясного (Диа-М, Россия), 5 г/л дрожжевого экстракта (PanReas Applichem, Испания), 2,7 г/л Na₂HPO₄ (PanReas Applichem, Испания) и 1,15 г/л лимонной кислоты (Merck Millipore, Германия), pH среды был 4,5 (Нуун с соавторами, 2014).

Для получения посевного материала штамм *K. hansenii* размораживали и статично культивировали в стерилизованной жидкой модифицированной среде HS в течение 10 дней при температуре 27°C в термостате до образования толстых пленок (Рис. 7 А), (Рис. 8 А). После образования толстой пленки биологический материал продуцента использовали для выращивания пленок БЦ. Для этого приготовленную среду HS разливали в термостабильные колбы на 1000 мл и стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин при 120°C и 1 атм (Рис. 8 Б). Стерильную среду HS разливали в стерильные пробирки по 45 мл, куда добавляли биомассу 10-дневного штамма *K. hansenii* по 5 мл (Рис. 8 В). Потом осторожно перемешивали с помощью переворачивания. Далее среду с добавленным продуцентом стерильно рассеивали по 25 мл в стерильные чашки Петри (Nuova Aptaca SRL, Италия) диаметром 10 см (Рис. 8 Г) и помещали их в термостат (Рис. 8 Д). Пленки получали в условиях статического жидкофазного культивирования продуцента в течение 7 суток при температуре 27°C в CO₂-инкубатор (Рис. 8Е). Вырастив пленку БЦ, ее извлекали из среды и очищали от продуцента: пленки БЦ снимали с поверхности культуральной жидкости и помещали в раствор SDS (8,6 г/л NaCl, 10 г/л SDS (додецисульфат натрия), 1000 мл дистиллированная вода) и инкубировали 72 ч (Рис. 8 Ж), каждые 24 ч раствор меняя на свежий. После отмывания БЦ в буфере, промывали пленки БЦ дистиллированной водой для удаления остатков буфера и клеток (Рис. 8 З). Далее отмытые пленки БЦ помещали в термостабильные колбы на 250 мл с дистиллированной водой (Рис. 8 И) и перемещали в автоклав на 120°C на 60 минут для дальнейшей стерилизации (Рис. 8 К). Пленки БЦ хранились в холодильнике при температуре 4°C в течение трех месяцев.

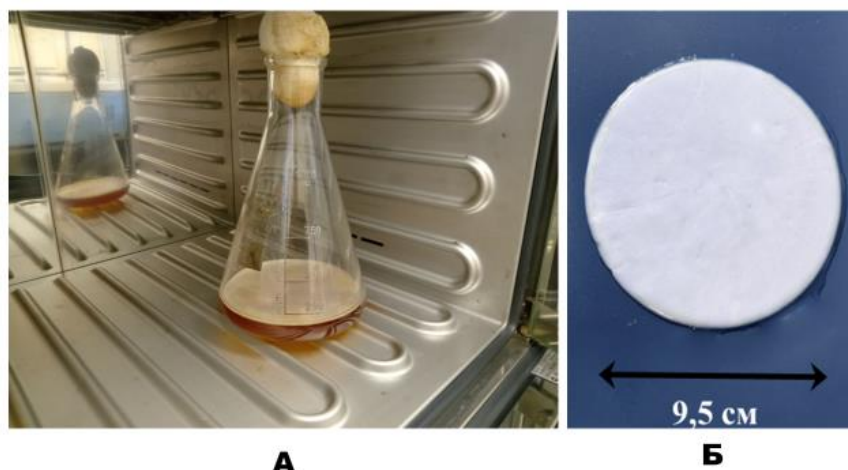


Рисунок 7. А - продуцент на 9-е сутки после посева; Б – пленка БЦ диаметром 9,5 см

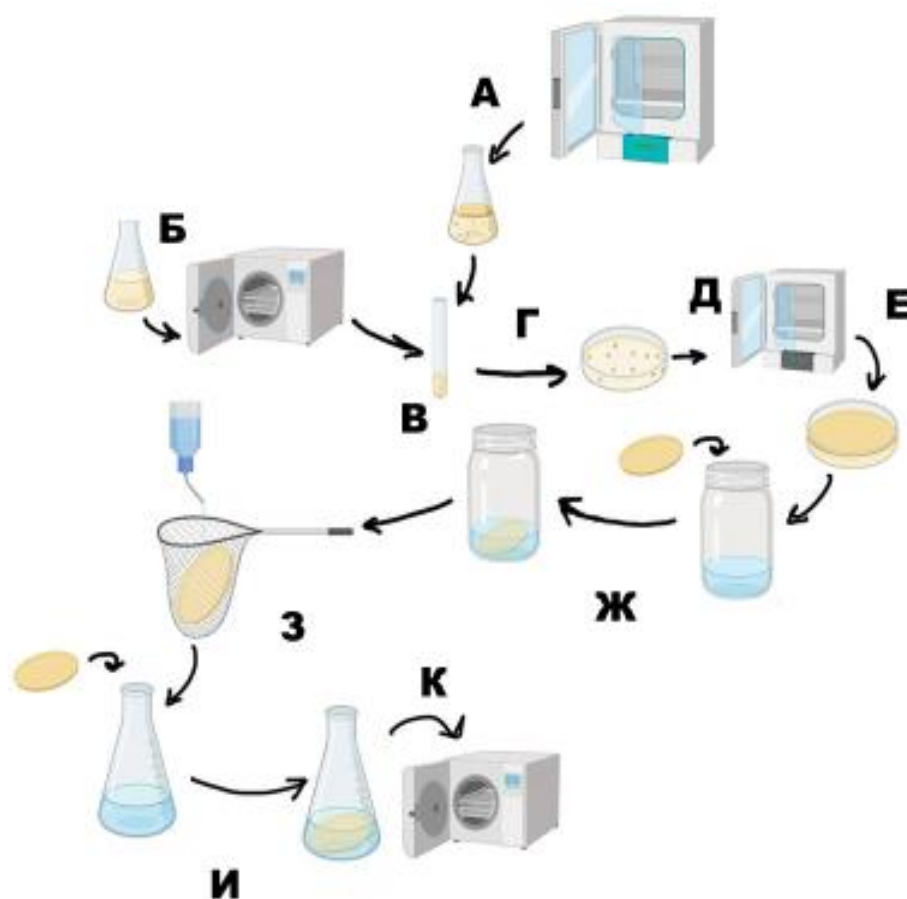


Рисунок 8. Получение бактериальной целлюлозы. А) Получение штамма *K. hansenii* с толстой пленкой БЦ. Б) Стерилизация среды HS. В) Добавление *K. hansenii* в среду HS. Г) Пересаживание *K. hansenii* из колб в чашки Петри. Д) Перемещение чашки Петри с *K. hansenii* в среде HS в CO₂-инкубатор. Е) Получение пленки БЦ. Ж) Снятие пленки БЦ с чашки Петри и помещение в раствор NaCl+SDS. З) Промывка пленок БЦ дистиллированной водой. И) Перенос пленок БЦ в колбы с дистиллированной водой. К) Автоклавирование.

3.2. ПОЛУЧЕНИЕ КОМПОЗИТА

Сначала БЦ размалывали на блендере Gorizz GHB-2305, при скорости 20000 об/мин, в течение 20 минут (Рис. 10 А). Далее размолотую БЦ пропускали через фильтр с порами 75 мкм (Рис. 10 Б). Контроль размера частиц осуществляли с помощью анализатора BeVision S1 (Bettersize, Китай). Молекулярную массу БЦ не определяли.

Затем растворяли 5г ПВС (поливиниловый спирт, марка 11/2, ГОСТ 10779-78, ChemExpress, Россия; молекулярная масса 28600 - 30000) в 40 мл воды и инкубировали при +80°C 1 ч.

Для получения композита раствор ПВС добавляли к 35 мл размолотой БЦ с размером частиц <75 мкм (Рис. 10 В) и инкубировали 3 ч при +80°C при постоянном перемешивании. Далее растворяли 7,5 г полиэтиленгликоля (ПЭГ, молекулярная масса 6000, Loba Chemie, Индия) в 25 мл воды, грели отдельно и добавляли к раствору ПВС и БЦ, инкубировали 1 ч при +80°C. Получившуюся смесь центрифугировали в течение 5 мин при 2000 об/мин, далее удаляли половину надосадка и замещали его в 70% растворе этанола. Полученный гель разливали по 500 мкл в 24 луночный планшет и замораживали при -20°C (Рис. 10 Г). На следующий день размораживали в течение 2 ч при комнатной температуре и снова замораживали с целью получения физической сшивки между молекулами БЦ, ПВС и ПЭГ (Zhong с соавторами, 2024). Стерилизовали путем обработки ультрафиолетовым излучением.

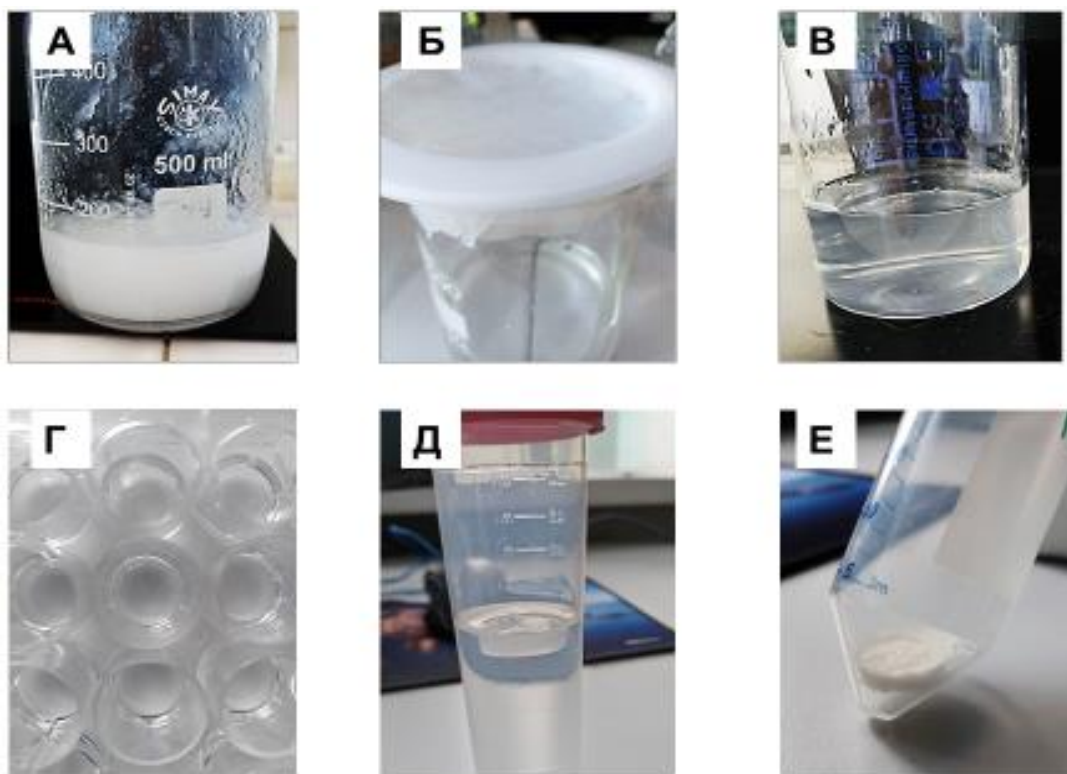


Рисунок 10. Получение композита БЦ-ПВС-ПЭГ. А) Размолотая после блендера БЦ; Б) процесс фильтрации размолотой БЦ через фильтр с порами 75 мкм; В) размолотая БЦ,

пропущенная через фильтр с порами 75 мкм; Г) раствор композита БЦ-ПЭГ-ПВС, залитый в 12-луночный планшет; Д) композит БЦ-ПЭГ-ПВС, помещенный в PBS; Е) композит БЦ-ПЭГ-ПВС после лиофилизации.

3.3. ОЦЕНКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КОМПОЗИТА

Определили степень набухания композита. Композит предварительно высушивали в вакуумной печи при 50°C в течение 24 часов для определения их сухого веса (m_d). Затем высушенные образцы погружали в дистиллированную воду при 25°C и извлекали через определенные промежутки времени. Избыток воды с поверхности удаляли фильтровальной бумагой и сразу взвешивали (m_t). Процедуру повторяли три раза для получения среднего значения. Степень набухания (SR, Swelling Ratio) рассчитывалась по уравнению:

$$SR = \frac{m_t - m_d}{m_d} \times 100\%$$

Определили содержание воды в композите. Композит сначала замораживали в жидком азоте при -196°C и лиофилизировали (удаляли воду путем возгонки под вакуумом) в течение 24 ч при температуре -50°C и давлении 0,07 мбар в сублимационной сушилке Alpha 2-4 LD типа 101042 Lab (Christ, Германия) (Рис. 10 Е). Влажность пленок рассчитывали измерением массы композитов до лиофильного высушивания и после по уравнению:

$$W = \frac{m_{\text{влаж}} - m_{\text{сух}}}{m_{\text{влаж}}} \times 100\%$$

Определили пористость композита, оценивая по отношению количества воды в образцах к разнице между массой влажных пленок и массой влажных пленок после лиофилизации (Рис. 10 Е) по уравнению:

$$P = \frac{m_{\text{влаж}} - m_{\text{сух}}}{m_{\text{влаж}} - m_{\text{лиоф.влаж.}}} \times 100\%$$

Адсорбционную ёмкость композита измеряли погружением лиофилизированной пленки (Рис. 10 Е) в раствор PBS (Рис. 10 Д) (фосфатно-солевой буфер) (0,05 мМ, состав: 8 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 1,44 г/л Na₂HPO₄, 0,24 г/л KH₂PO₄, pH=7,4) на сутки по уравнению:

$$A = \frac{m_{\text{лиоф.влаж.}} - m_{\text{лиоф.}}}{m_{\text{лиоф.}}} \times 100\%$$

3.4. ВЫРАЩИВАНИЕ КЛЕТОК

Работу проводили с использованием опухолевых клеток линии H1299 (немелкоклеточный рак легкого), которые были взяты из клеточного банка лаборатории «Медицинской Биотехнологии» ИБМХ им. В.Н. Ореховича. В качестве среды для роста клеток использовали среду DMEM (Панэко, Россия) с добавлением L-глутамина (Панэко, Россия), 10% FBS (FBS - Fetal Bovine Serum, Сыворотка эмбриональная телячья; Capricorn Scientific, Германия), 1% пирувата натрия (энергетический субстрат для роста клеток, Панэко, Россия) в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Хранился при + 4°C в течение 1 месяца.

Сливали старую среду. Промывали клетки H1299 3 раза от оставшейся среды раствором PBS (3 мл) и вылили. Добавляли к клеткам H1299 раствор трипсин-ЭДТА (0,25 %, «Thermo Fisher Scientific») (1 мл), полностью покрывая дно флакона 25 см². Инкубировали в CO₂-инкубаторе 3-10 мин, плавно покачивая. Когда клетки полностью откреплялись от субстрата, добавляли во флакон 25 см² питательную среду (1-2 мл) и разделяли клетки H1299 механическими движениями дозатора. Отмывали от трипсина раствор клеток с помощью центрифугирования, подсчет клеток делали в камере Горяева. Оставляли во флаконе 25 см² 1/8-1/3 клеточной суспензии, доливали питательной среды до ее необходимого объема (3-5 мл).

Флакон 25 см² доставали из CO₂-инкубатора и удаляли питательную среду. Далее клетки (85% от объема флакона после обработки трипсином-ЭДТА) переносили в 15 мл стерильную пробирку и центрифугировали 3 мин при 500 об/мин, после чего удаляли надосадочную жидкость. Осадок ресуспендировали в 2 мл питательной среды. Отбирали клетки для подсчета, путем закапывания в камеру Горяева и подсчитывали клетки. Во флакон 25 см² в это время перемещали оставшуюся часть клеток и доливали среду.

Готовили суспензию клеток: ~1 млн клеток в 10,5 мл питательной среды. Клетки сажали в 96-луночный планшет в количестве 100 мкл клеточной суспензии на лунку (5000-10000 клеток в каждой лунке), потом помещали в CO₂-инкубатор.

Стерилизованный полученный композит инкубировали при 5% CO₂/95% увлажненной атмосфере и температуре 37°C в PBS (2 мл) в течение 12 ч в 12-луночном планшете. После 12 ч отмывали композит в PBS 10 раз путем обновления среды. Далее 100 мкл раствора с открепленными клетками линии H1299 высаживали в композит и инкубировали при 37°C в течение 2 ч, после чего добавили среду. Далее каждые 72 часа меняли 50% среды.

3.5. РАСЧЕТ ЗНАЧЕНИЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ IC50

Для расчета значений IC₅₀ (Half Maximal Inhibitory Concentration – концентрация вещества, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование жизнеспособности клеток) мы посадили 20000 клеток.

После 24 ч инкубации к культуре клеток H1299 добавляли методом раститровки различные концентрации цисплатина (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 и 1,56 мкМ). До добавления к клеткам цисплатин растворяли в ДМСО в концентрации 10⁻⁸ М. Через 72 ч определяли жизнеспособности клеток для каждой концентрации цисплатина выполняли в трех повторах по следующему уравнению:

$$IC_{50} = \frac{n_{\text{кл}} \times n_{\text{кв}} \times 1111}{n_{\text{мл}}}$$

3.6. МТТ-ТЕСТ

200 мг МТТ растворяли в 40 мл теплого PBS (5мг/мл). Оставили для растворения на сутки, затем профильтровали. Хранить раствор МТТ при +4°C в защищенном от света месте. Раствор стабилен не меньше месяца в таких условиях. После 72 ч инкубации клеточной линии H1299 96-луночном в планшете вносили в каждую лунку по 20 мкл рабочего раствора МТТ. Инкубировали еще 2 часа в CO₂-инкубаторе, чтобы МТТ проник в живые клетки. Через 2 ч заменили в каждой лунке среду на ДМСО и помещали планшет на шейкер на 150 об/мин на 10 мин до растворения кристаллов формазана. С помощью планшетного ридера SuPerMax3100 (Flash Spectrum, Китай) определяли оптическую плотность каждой лунки с клетками при 540 нм, тем самым оценивая жизнеспособность клеток: чем выше значение, тем больше живых клеток. В метаболически активных (живых) клетках ферменты восстанавливают поглощенный МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (Serva, UK)) до фиолетового нерастворимого кристаллического продукта – формазана. Соответственно, количество формазана пропорционально числу жизнеспособных клеток.

3.7. ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Микрофотографии клеточной линии H1299 выполняли с помощью инвертированного микроскопа МИБ-2-ФЛ (ООО"ЛОМО-МА", г. Санкт-Петербург) (Рис. 15) с камерой MC USB 2.0 C-mount (разрешение 1920x1080 пикселей), при увеличении x20 (объектив LPlan PH20x), светофильтр UV1 (EX375/28, EM 460/50 нм). Детекция флуоресцентных опухолевых клеток проводилась в светлом поле и флуоресцентном режиме на 3, 5, 7, 12 и 15-е сутки.

3.8. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Для построения графиков и таблиц использовали программу Microsoft Excel 2016. Статистический анализ результатов осуществляли с помощью критерия Стьюдента при помощи программы Microsoft Excel 2016 (приложение XLSTAT). Результаты представляли в виде средних значений $\pm$ стандартного отклонения. Значения считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОМПОЗИТА БЦ-ПЭГ-ПВС

Для полученного композита были исследованы морфология и основные физические свойства: масса во влажном и высушенном состоянии, содержание воды, набухание, пористость и адсорбционная ёмкость. Данные параметры влияют на рост клеток и возможность длительного 3D-культивирования.

Приготовленный не отмытый композит БЦ-ПЭГ-ПВС обладал губчатой желеобразной структурой и имел цилиндрическую форму с диаметром около 1 см и высотой 0,15 см (Рис. 11 Б справа).

После высушивания при -50°C , композит принимал вид белого губчатого твердого диска (Рис. 11 Б слева). При погружении в PBS на 24 часа, композит сильно набухал, в результате чего его масса увеличивалась в 5 раз (Табл. 1). После промывки PBS композит превращался в прозрачный мутноватый вязкий гель (Рис. 11 А, В). Гель, добавленный в среду, не изменял цвет или прозрачность среды.



Рисунок 11. Фото композита БЦ-ПЭГ-ПВС. А) в процессе приготовления, Б) слева – в высушенном состоянии; справа - во влажном; В) в процессе отмывки PBS перед посадкой клеток H1299.

При оценке физических характеристик композита БЦ-ПЭГ-ПВС наблюдали повышенную пористость ($677,1 \pm 43,3$), а также адсорбционную ёмкость ($389,4 \pm 44,3$)

(Табл. 2). На данные показатели могло повлиять добавление ПЭГ и ПВС к БЦ. Известно, что сама по себе БЦ не обладает такими характеристиками (Shishparenok с соавторами, 2024), а добавление ПЭГ увеличивает пористость различных материалов и используется для приготовления биокompозитов (Bahrami с соавторами, 2025). Для увеличения механической прочности биокompозитов используется ПВС (Qiang с соавторами, 2025). В результате добавления ПВС к БЦ и ПЭГ композит БЦ-ПЭГ-ПВС приобретал оформленную структуру (БЦ и ПЭГ были жидкие сами по себе) и не терял значительное количество массы при высушивании.

Таблица 1. Основные физические характеристики композита БЦ-ПЭГ-ПВС

Параметр	Среднее значение
Масса влажных пленок, г	520,50 ± 0,03
Масса лиоф. плёнок, г	0,206 ± 0,014
Масса лиоф. плёнок после замачивания, г	1,003 ± 0,046
Водопоглощающая способность, %	62,2 ± 1,0
Пористость, %	677,1 ± 43,3
Адсорбционная способность, %	389,4 ± 44,3

4.2. ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК H1299 ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ В 2D-КУЛЬТУРЕ

Для проверки функциональных свойств БЦ-ПЭГ-ПВС было проведено сравнительное изучение цитотоксического действия цисплатина на классическую 2D культуру и 3D культуру H1299 (немелкоклеточного рака лёгкого) на основе полученной матрицы. Подбор количества клеток необходим, так как оптимальное количество клеток позволяет сделать МТТ-анализ с минимальной погрешностью: слишком малое количество клеток ведет к большей погрешности измерений; слишком большое ведет к неадекватным результатам (Cosenza с соавторами, 2022).

Для подбора оптимальной концентрации клеток H1299 для выращивания в монослое (2D культуре) клетки были посажены в диапазоне концентраций 0-20000 клеток в лунку (Рис. 12 А, Б) 96-луночного планшета. Через 72 ч наибольшая оптическая плотность (0,8) наблюдалась для концентрации клеток 20000/лунку, поэтому для оценки цитотоксичности цисплатина на 2D-культуру брали концентрацию клеток 20000/лунку.

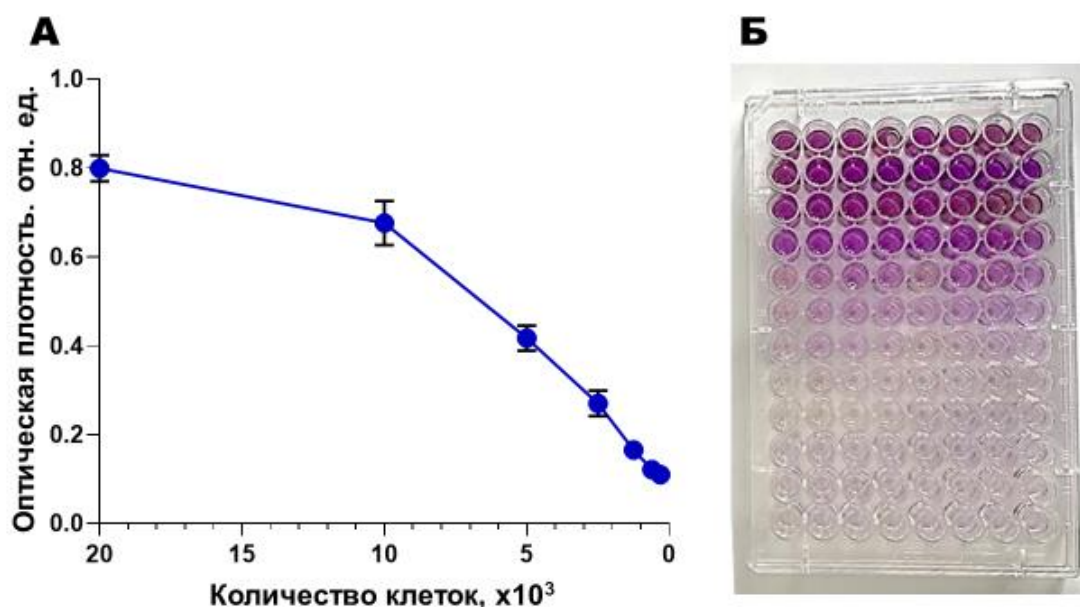


Рисунок 12. Подбор количества клеток. А) Зависимость оптической плотности от количества посаженных клеток в 2D культуре через 72 ч; Б) Фото МТТ-теста клеточных культур Н1299 в количестве от 20000 до 0 клеток на лунку.

4.3. ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КЛЕТОК ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ В КОМПОЗИТЕ БЦ-ПЭГ-ПВС

Для подбора оптимальной концентрации клеток Н1299 для выращивания в 3D культуре на основе композита БЦ-ПЭГ-ПВС клетки были посажены в диапазоне концентраций 22 500-180 000 клеток в лунку (Рис. 15 А, Б) 12-луночного планшета. Через 72 ч наибольшая оптическая плотность (1,38) была характерна для концентрации клеток 180 000/лунку. Для оценки цитотоксичности циплатина на 2D-культуру далее мы брали концентрацию 180 000 клеток на лунку.

Таким образом, для 3D-культивирования в разработанном биокompозите БЦ-ПЭГ-ПВС требуется значительно большее количество клеток (180000 клеток/лунка) по сравнению с классическим 2D-культивированием (20000/лунка).

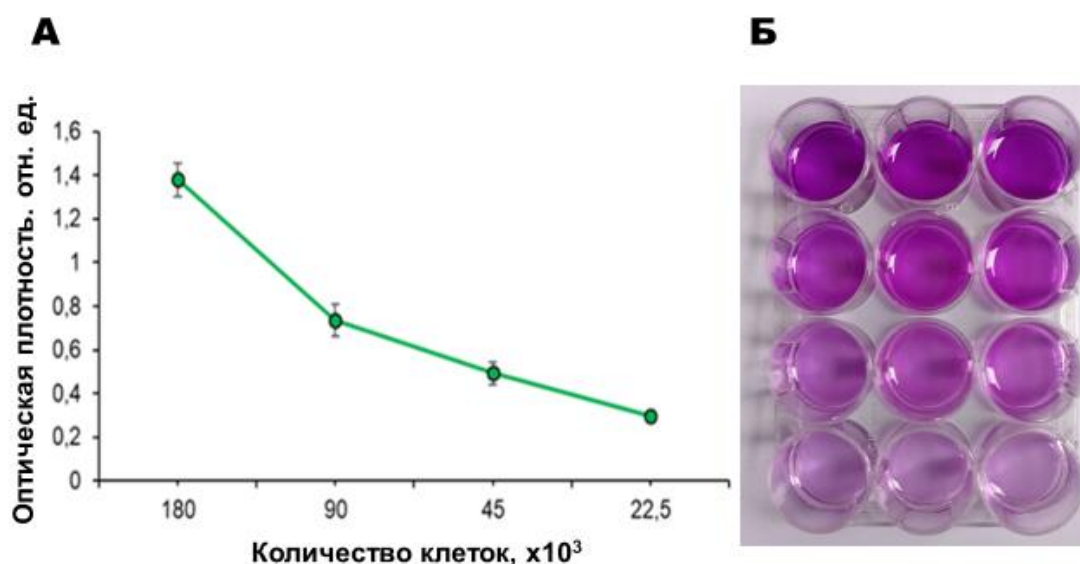


Рисунок 15. Подбор количества клеток. А) Зависимость оптической плотности от количества посаженных клеток в 3D культуре через 72 ч. Б) Фото МТТ-теста клеточных культур Н1299 в количестве от 22 500 до 180 000 клеток на лунку.

4.4. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК Н1299 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЦИСПЛАТИНА НА 2D- И 3D-КУЛЬТУРАХ

Для сравнения действия противоопухолевой активности на 2D и 3D-культуры был выбран препарат цисплатин. Цисплатин — это химиотерапевтический препарат на основе платины, который используется для лечения солидных опухолей, в том числе рака яичек, яичников, мочевого пузыря, лёгких, головы и шеи, благодаря своей способности повреждать ДНК раковых клеток и тем самым вызывать их гибель (Ghosh, 2019).

На рисунке 13 показаны фотографии клеток Н1299 до (А, Б) и после (В, Г) добавления цисплатина через 72 часа. При инкубации клеток с цисплатином нарушалась их морфология: клетки приобретали шарообразную форму и агрегировали, кроме того, их количество в светлом поле и при флуоресцентном режиме различалось, что означает, что часть клеток погибла.

Это связано с тем, что клеточная линия Н1299 экспрессирует в цитоплазме флуоресцентный белок GFP. Соответственно, клетка может флуоресцировать, только если она метаболически активна. Таким образом, можно сделать вывод, что цисплатин подействовал на 2D культуру клеток Н-1299.

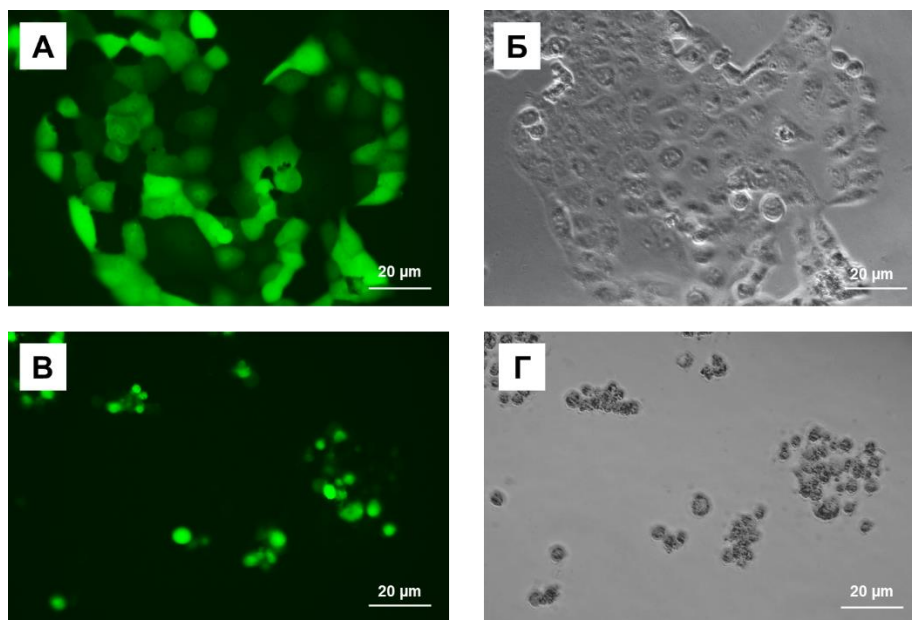


Рисунок 13. Морфология клеток H1299 в 2D культуре при увеличении x20. А-Б) Морфология клеток H1299 до добавления цисплатина. В-Г) Морфология после добавления 10 мкМ цисплатина.

При оценке действия цисплатина на 2D-культуру клеток H1299 было выяснено, что его $IC_{50} = 10$ мкМ (Рис. 13). Этот результат согласуется с ранее полученными результатами действия цисплатина на клетки H1299 в другой работе, где IC_{50} составлял 7,6 мкМ (Ghosh, 2019). При этом при добавлении 90 мкМ цисплатина происходила гибель 90% опухолевых клеток. Можно сделать вывод о том, что линия H1299 при выращивании в 2D-культуре имеет среднюю чувствительность к цисплатину.

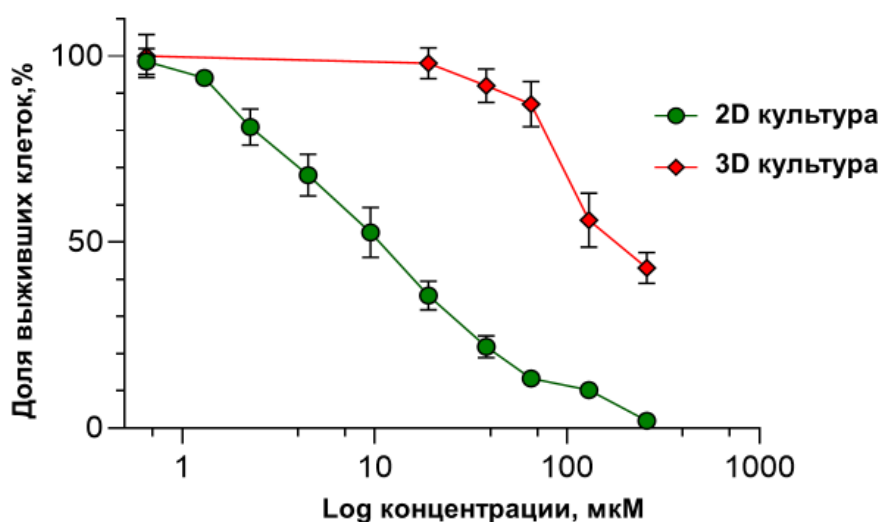


Рисунок 14. Зависимость доли выживших клеток H1299 от концентрации цисплатина в 2D и 3D культуре.

Для оценки действия цисплатина в 3D-культуре опухолевых клеток H1299 добавляли его в концентрации 90 мкМ к 3D-культуре возрастом 12 дней (Рис. 15). Потом оценивали долю выживших опухолевых клеток через 72 ч (на 15 сутки) с помощью МТТ-теста (Рис. 14).

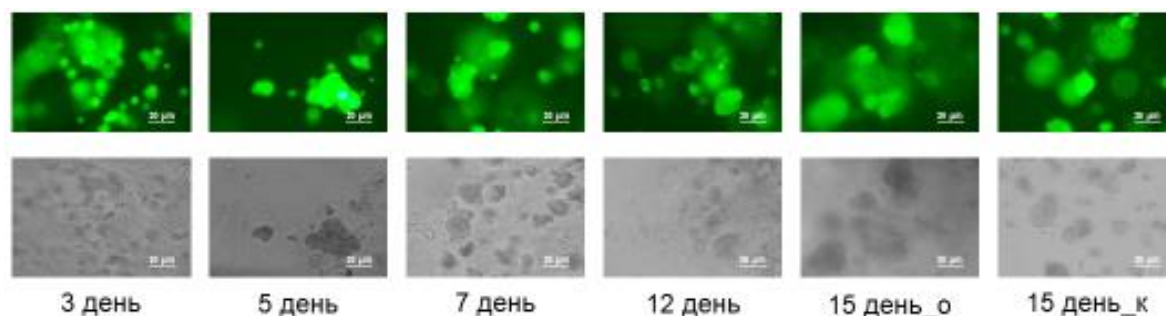


Рисунок 15. Морфология клеток H1299 в 3D-культуре на 3 день, 5 день, 7 день и 12 день - до добавления цисплатина 26,7 мкМ; 15 день_о и 15 день_к - после добавления цисплатина 90 мкМ . 15 день_о - опыт, 15 день_к - контроль.

Доля выживших опухолевых клеток H1299 после добавления цисплатина (опыт - $97 \pm 5,3$ %) не отличалась от доли выживших контрольных клеток, к которым цисплатин не добавляли (контроль - $100 \pm 3,8$ %) (Рис. 16). Эти данные согласуются с тем, что цисплатин очень часто не вызывает противоопухолевого эффекта у пациентов с немелкоклеточным раком лёгкого из-за резистентности этих опухолей к действию цисплатина (Zhou с соавторами, 2023).

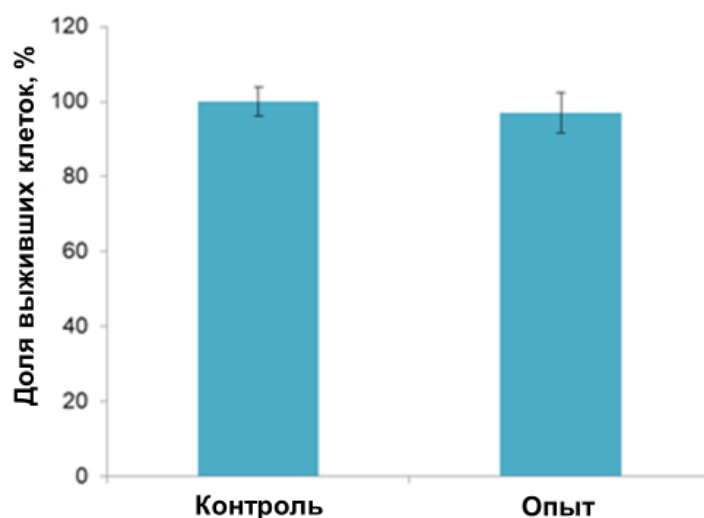


Рисунок 16. Доля выживших клеток в 3D культуре по сравнению с контрольной группой. Контроль - доля выживших опухолевых клеток H1299 после добавления цисплатина; Опыт - доля выживших контрольных клеток H1299.

Можно сделать вывод, что цисплатин не оказал значимого влияния на рост клеток H1299 в 3D-культуре. Объясняется это тем, что опухолевые клетки внутри 3D-культуры защищены от проникновения лекарств другими опухолевыми клетками, растущими снаружи. Цисплатин, соответственно, уничтожил клетки, которые вероятно росли снаружи 3D-культуры, не затронув те, которые были внутри её. Соответственно, на 2D-культуру препарат оказал видимый эффект, так как в ней раковые клетки растут в монослое, что делает их более доступными для действия лекарств.

Поэтому можно сделать вывод о том, что цисплатин (90 мкМ) который вызывал гибель 90% клеток в 2D-культуре клеток H1299, оказался неэффективным в этой же концентрации отношении 3D-культуры H1299. Поэтому для цитотоксического действия на 3D-культуру H1299 требуется воздействие более высоких доз цисплатина, чем для 2D-культуры H1299, тем самым, 3D-культура H1299 больше напоминает поведение опухолей *in vivo*.

Таким образом, созданная матрица обеспечивает условия, приближенные к условиям *in vivo*, включая сниженную чувствительность к химиотерапевтическим агентам за счёт барьерных свойств трёхмерной структуры. Таким образом, биокompозит БЦ-ПЭГ-ПВС является перспективной матрицей для 3D культивирования опухолевых клеток. Данная работа вносит вклад в развитие современных методов скрининга противораковых препаратов.

4.5. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

В дальнейшем целесообразно исследовать влияние других цитотоксических средств и их комбинаций на 3D-культуру на основе полученной матрицы БЦ-ПЭГ-ПВС; установить возможность использования 3D-культуры на основе полученной матрицы БЦ-ПЭГ-ПВС для других типов опухолевых клеток, а также их комбинаций со стромальными клетками; определить стабильность полученной матрицы БЦ-ПЭГ-ПВС в долгосрочной перспективе. Также целесообразно изучать структурно-механические свойства матрицы БЦ-ПЭГ-ПВС с дополненным качественным составом в виде различных веществ, в том числе других биополимеров.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработан биосовместимый композит, состоящий из БЦ, ПВС и ПЭГ для 3D-культивирования опухолевых клеток линии H1299. Полученный материал обладает необходимыми структурными свойствами, обеспечивающими пролиферацию клеток, что подтверждено в ходе экспериментов.

2. Было установлено оптимальное количество опухолевых клеток линии H1299 для выращивания в 2D- и 3D-культуре: 20000 и 180000 клеток в лунке, соответственно.

3. Была проведена сравнительная оценка цитотоксического действие цисплатина на 3D культуру, выращенную в полученном композите и 2D культуре. Тестирование показало, что в отношении 2D культуры цисплатин обладал повышенной цитотоксичностью ($IC_{50} = 26,7 \text{ мкМ}$), в то время как на 3D культуру клеток H1299 цисплатин не оказал видимого действия.

Благодарности

Мы выражаем благодарность Сергею Менделевичу Глаголеву за помощь в организации практики для старшеклассников, Анастасии Николаевне Шишпарёнок за руководство нашей работой, а также Дмитрию Дмитриевичу Жданову за ценные консультации. Елене Арнольдовне Марквичёвой за рецензию на нашу работу. Также признательны лаборатории медицинской биотехнологии и ФГБНУ «ИБМХ им. В.Н. Ореховича» за предоставленную возможность прохождения практики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arora L, Kalia M, Dasgupta S, с соавторами (2022) Development of a Multicellular 3D Tumor Model to Study Cellular Heterogeneity and Plasticity in NSCLC Tumor Microenvironment. *Front Oncol* 12: 881207. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.881207>
2. Bahrami P, Abbasi D, Matin A с соавторами. (2025) Highly-Porous Plasticized Polylactide Foams with Bi-modal Structure Prepared via a Combined Economical Process: Processing-Morphology-Performance Correlations. *J Polym Environ* 33:423–1444. <https://doi.org/10.1007/s10924-025-03491-x>
3. Campano C, Balea A, Blanco A, Negro C (2016) Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. *Cellulose* 23:57–91. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0>
4. Castro C, Zuluaga R, Álvarez C, с соавторами (2012) Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydr Polym* 89:1033–1037. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.045>
5. Cesarz Z, Tamama K (2016) Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2016/9176357>
6. Cosenza Z, Astudillo R, Frazier PI, Baar K, Block DE (2022) Multi-information source Bayesian optimization of culture media for cellular agriculture 119(9): 2447-2458.
7. Curvello R, Kast V, Abuwarwar MH, с соавторами (2021) 3D Collagen-Nanocellulose Matrices Model the Tumour Microenvironment of Pancreatic Cancer. *Front Digit Heal* 3: 704584. <https://doi.org/10.3389/fdgth.2021.704584>
8. Duval K, Grover H, Han L-H, с соавторами (2017) Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* 32:266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
9. Fontana JD, Koop HS, Tiboni M, с соавторами (2017) New Insights on Bacterial Cellulose. In: *Food Biosynthesis*. Elsevier, 213–249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811372-1.00007-5>
10. Ghosh S (2019) Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry*. 88:102925. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>.
11. Griffith LG, Swartz MA (2006) Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:211–224. <https://doi.org/10.1038/nrm1858>
12. HogenEsch H, Nikitin AY (2012) Challenges in pre-clinical testing of anti-cancer drugs in cell culture and in animal models. *J Control Release* 164:183–186. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.02.031>
13. Hyun J, Mahanty B, Kim C (2014) Utilization of Makgeolli Sludge Filtrate (MSF) as Low-Cost Substrate for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*.

Biochemistry and Biotechnology 172:3748-3760. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0810-9>.

14. Jo Y, Choi N, Kim K, с соавторами (2018) Chemoresistance of Cancer Cells: Requirements of Tumor Microenvironment-mimicking *In Vitro* Models in Anti-Cancer Drug Development. *Theranostics* 8:5259–5275. <https://doi.org/10.7150/thno.29098>

15. Katt ME, Placone AL, Wong AD, с соавторами (2016) In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4:12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>

16. Lee S-Y, Koo I-S, Hwang HJ, Lee DW (2023) In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discov* 28:119–137. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2023.03.006>

17. Lv D, Hu Z, Lu L, с соавторами (2017) Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery (Review). *Oncol Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7134>

18. Mirabelli P, Coppola L, Salvatore M (2019) Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers*. 11:1098. <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>

19. Nii T, Kuwahara T, Makino K, Tabata Y (2020) A Co-Culture System of Three-Dimensional Tumor-Associated Macrophages and Three-Dimensional Cancer-Associated Fibroblasts Combined with Biomolecule Release for Cancer Cell Migration. *Tissue Eng Part A* 26:1272–1282. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2020.0095>

20. Poornima K, Francis AP, Hoda M, с соавторами (2022) Implications of Three-Dimensional Cell Culture in Cancer Therapeutic Research. *Front Oncol* 12: 891673. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.89167>

21. Qiang F, Junxiao T, Weimin W, Rongjie W (2025) Biocomposite Polyvinyl Alcohol/Ferritin Hydrogels with Enhanced Stretchability and Conductivity for Flexible Strain Sensors. *Gels*. 11(1):59. <https://doi.org/10.1002/bit.28132>

22. Rodriguez-Brenes IA, Wodarz D, Komarova NL (2015) Quantifying replicative senescence as a tumor suppressor pathway and a target for cancer therapy. *Sci Rep* 5:17660. <https://doi.org/10.1038/srep17660>

23. Rogova EA, Alashkevich YD, Kozhukhov VA, с соавторами (2023) The state and prospects of improving the methods of obtaining and using bacterial cellulose (review). *Russ J Bioorg Chem* 49: 1536–1552. <https://doi.org/10.1134/S1068162023070841>

24. Shishparenok AN, Furman VV, Dobryakova NV, Zhdanov DD (2024) Protein Immobilization on Bacterial Cellulose for Biomedical Application. *Polymers (Basel)*. 16(17):2468. <https://doi.org/10.3390/polym16172468>

25. Shishparenok AN, Koroleva SA, Dobryakova NV, с соавторами (2024) Bacterial

cellulose films for L-asparaginase delivery to melanoma cells. *Int J Biol Macromol* 276:133932. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133932>

26. Shishparenok AN, Petryaev ER, Koroleva SA, с соавторами (2024) Bacterial Cellulose-Chitosan Composite for Prolonged-Action L-Asparaginase in Treatment of Melanoma Cells. *Biochemistry*, 89(10):1727-1743. <https://doi.org/10.1134/S0006297924100067>

27. Silva IGR da, Pantoja BT dos S, Almeida GHDR, с соавторами (2022) Bacterial Cellulose and ECM Hydrogels: An Innovative Approach for Cardiovascular Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci* 23:3955. <https://doi.org/10.3390/ijms23073955>

28. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, с соавторами (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

29. Thompson DN, Hamilton MA (2001) Production of Bacterial Cellulose from Alternate Feedstocks. *Appl Biochem Biotechnol* 91:503–514. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:503>

30. Tutty MA, Holmes S, Prina-Mello A (2023) Cancer Cell Culture: The Basics and Two-Dimensional Cultures. In: Dania Movia, Andriele Prina-Mello (eds) *Cancer Cell Culture: The Basics and Two-Dimensional Cultures*. Humana Press, New York, 2645:3-40. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3056-3_1

31. Wang J, Zhao L, Zhang A, с соавторами (2018) Novel bacterial cellulose/gelatin hydrogels as 3D scaffolds for tumor cell culture. *Polymers (Basel)* 10:581. <https://doi.org/10.3390/polym10060581>

32. Zhong Y, Lin Q, Yu H с соавторами (2024) Construction methods and biomedical applications of PVA-based hydrogels. *Frontiers in Chemistry*. 12: 1376799. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1376799>

33. Zhou H, Zhou L, Guan Q, со соавторами (2023) Skp2-mediated MLKL degradation confers cisplatin-resistant in non-small cell lung cancer cells. *Communications Biology*. 6:805. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05166-6>