

Уральский медицинский журнал. 2022. Т. 21, № 6. С. 89-94.
Ural medical journal. 2022; Vol. 21, No 6. P. 89-94.
Научная статья
УДК 618.19-006.66:57.084.1
DOI: 10.52420/2071-5943-2022-21-6-89-94.

СРАВНЕНИЕ ФЕНОТИПОВ КЛЕТОК АДГЕЗИВНОЙ И НЕАДГЕЗИВНОЙ КУЛЬТУР КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.О. Шамшурина¹, А.С. Могиленских², Е.В. Гребенюк³, В.С. Самохина⁴, С.В. Сазонов⁵, С.М. Демидов⁶

^{1,2,4,5} Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

^{3,6} Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

¹ elshamshurina@gmail.com

² annasajler@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7145-0733>

³ ev.grebenyuk9@yandex.ru

⁴ S.Vika2003@yandex.ru

⁵ prof-ssazonov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7064-0079>

⁶ professordemidov@yandex.ru

Аннотация

Введение. Первичные клеточные культуры карциномы молочной железы (КМЖ) используются как модель для изучения процессов внутриопухолевой гетерогенности, лекарственной резистентности и различных молекулярно-биологических процессов. Одним из вариантов первичной культуры является неадгезивная культура клеток в виде сфероидов – маммосфер. Имеются данные о том, что клетки, выделенные из маммосфер, имеют мезенхимальные признаки. Однако приобретение мезенхимальных признаков в маммосферах, полученных из опухолей, коррелирует с подавлением экспрессии рецепторов эстрогена и, следовательно, с резистентностью к терапии против гормонзависимых опухолей. **Цель исследования** – определить влияние методики культивирования клеток КМЖ на способность клеток сохранять эпителиальный фенотип. **Материалы и методы.** Представлен сравнительный анализ двух образцов культуры КМЖ, исследуемых на протяжении трех пассажей при разных способах культивирования. Окраска для морфологической оценки проводилась по Паппенгейму. Определение принадлежности клеток к эпителиальным проводили с использованием антитела anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody (Roche diagnostics, USA). **Результаты.** Для анализа культур были взяты три пассажа (P2, P3, P4) неадгезивных и три пассажа адгезивных клеток. В ходе исследования данных вариантов культуры КМЖ были определены морфологические особенности клеток на каждом пассаже и обнаружено, что независимо от методики, выбранной при культивировании, клетки исследуемых культур сохраняют эпителиальный фенотип. Однако при исследовании адгезивной культуры выявлен больший процент клеток, демонстрирующих эпителиальный фенотип, по сравнению с клетками неадгезивной культуры. **Обсуждение.** В ходе исследования выделено шесть морфологических групп клеток, полученных при создании первичной культуры образца КМЖ, среди которых проявляются отличия в сохранении эпителиальной природы на всем протяжении культивирования. **Заключение.** Выбор методики культивирования оказывает влияние на способность клеток сохранять эпителиальный фенотип на протяжении трех пассажей. На втором пассаже уровень экспрессии панцитокератина в адгезивной культуре значительно отличается от неадгезивной. К четвертому пассажу происходит резкое снижение количества эпителиальных клеток.

Ключевые слова: первичная клеточная культура, маммосферы, карцинома молочной железы

Для цитирования: Шамшурина Е.О., Могиленских А.С., Гребенюк Е.В. с соавт. Сравнение фенотипов клеток адгезивной и неадгезивной культур карциномы молочной железы. Уральский медицинский журнал. 2022;2(6): 89-94.. <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-6-89-94>.

@ Криволезова Т.А.

@ Krivolesova T.A.

COMPARISON OF ADHERENT AND NON-ADHERENT CELL PHENOTYPES OF BREAST CARCINOMA CULTURES

E. O. Shamshurina¹, A. S. Mogilenskikh², E. V. Grebenyuk³, V. S. Samokhina⁴, S. V. Sazonov⁵, S. M. Demidov⁶^{1,2,4,5} Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia^{3,6} Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia¹ elshamshurina@gmail.com² annasajler@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7145-0733>³ ev.grebenyuk9@yandex.ru⁴ S.Vika2003@yandex.ru⁵ prof-ssazonov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7064-0079>⁶ professorsordemidov@yandex.ru

Abstract

Introduction. Primary cell cultures of breast carcinoma (BC) are used as a model for study the processes of intratumoral heterogeneity, drug resistance and various molecular and biological processes. One of the variants of primary culture is non-adhesive cell culture in the form of spheroids – mammospheres. There is evidence that cells isolated from mammospheres have mesenchymal features. However, the acquisition of mesenchymal features in mammospheres derived from tumors correlates with suppression of estrogen receptor expression and, therefore, with resistance to therapy against hormone-dependent tumors. **The aim of the study** was to determine the effect of the method of culturing BC cells on the ability of cells to preserve the epithelial phenotype. **Materials and methods** A comparative analysis of two BC culture samples examined over three passages using different methods of cultivation was performed. Staining for morphological evaluation was carried out according to Pappenheim. Determination of belonging to epitheliocytes was performed using anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody (Roche diagnostics, USA). **Results** Three passages (P2, P3, P4) of non-adherent and three passages of adherent cells were taken for culture analysis. During the study of these BC culture variants, the morphological features of the cells in each passage were determined and it was found that regardless of the technique chosen during cultivation, the cells of the cultures under study retained the epithelial phenotype. However, the study of the adhesive culture revealed a higher percentage of cells showing the epithelial phenotype compared to the cells of the non-adhesive culture. **Discussion** In the course of our study, six morphological groups of cells obtained during the creation of a primary culture of a BC sample were identified, among which differences in the preservation of the epithelial nature throughout the cultivation were manifested. **Conclusion** The choice of cultivation technique influences the ability of cells to retain the epithelial phenotype for three passages. In the second passage, the level of pancytokeratin expression in the adhesive culture is significantly differed from that in the non-adhesive culture. By the fourth passage there is a sharp decrease in the number of epithelial cells.

Keywords: primary cell culture, mammospheres, breast carcinoma

For citation:

Shamshurina E.O., Mogilenskikh A.S., Grebenyuk E.V. et al. Comparison of adherent and non-adherent cell phenotypes of breast carcinoma cultures. Ural medical journal. 2022;21(6): 89-94. (In Russ.). <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-6-89-94>.

ВВЕДЕНИЕ

Иммортализованные клеточные линии карциномы молочной железы (КМЖ) длительное время применяются для оценки *in vitro* подходов к лечению, диагностике, профилактике онкологических заболеваний [1–4].

Однако при сравнении клеточных линий с клиническими образцами КМЖ обнаружилось, что все клеточные линии имеют большее сходство друг с другом, чем с клиническими образцами, которые они должны моделировать [5]. Поэтому в последние несколько лет получение первичных культур является актуальной задачей для разработки методик персонализированной терапии рака. Такая культура обладает характеристиками более близкими к условиям *ex vivo*, поскольку содержит не только опухолевые клетки, но и включает элементы

микроокружения: стромальные компоненты, клетки иммунной системы, клетки эндотелия сосудов, то есть все, что окружает опухоль в организме [6, 7].

Остается открытым вопрос: какой вариант для получения релевантной модели КМЖ *in vitro* подходит больше – адгезивная культура или маммосферы [8].

Методики, используемые при получении клеточных культур, отличаются у разных авторов. Это связано с определенными сложностями, которые возникают при культивировании опухолевых клеток [9–11].

В литературе имеются данные о том, что в клеточных линиях рака молочной железы сфероиды демонстрируют наличие стволовых опухолевых клеток, а также имеют функциональную связь между экспрессией Е-кадгерина, связанной с типичной эпителиальной морфологией, что может способствовать получению культуры с меньшим количеством фибробластов и сохранению природы

Сравнение количества клеток, экспрессирующих панцитокератин, при разных способах культивирования

	Адгезивная культура, n = 500		Неадгезивная культура, n = 500		p (χ^2); п. Йетса
	Окрашенных, шт.	%	Окрашенных, шт.	%	
P2	230	46	133	26,5	p = 0,001; p = 0,001
P3	180	36	151	29	p = 0,052; p = 0,060
P4	54	10,8	47	9,3	p = 0,463; p = 0,529
p (χ^2), п. Йетса	P2:P3 = 0,002; P2:P3 = 0,002; P3:P4 = 0,001; P3:P4 = 0,001; P2:P4 = 0,001; P2:P4 = 0,001		P2:P3 = 0,207; P2:P3 = 0,234; P3:P4 = 0,001; P3:P4 = 0,001; P2:P4 = 0,001; P2:P4 = 0,001		

опухоли, более близкой к природе *in vivo* [12, 13].

В то же время имеются данные о том, что клетки, выделенные из маммосфер, имеют мезенхимальные признаки [13]. Однако приобретение мезенхимальных признаков клетками в маммосферах, полученных из опухолей, коррелирует с подавлением экспрессии рецепторов эстрогена и, следовательно, с резистентностью к терапии гормонзависимых опухолей [14–15]. В связи с этим скрининг новых лекарственных соединений должен проводиться в условиях культивирования, которые хорошо отражают эти явления, а получение маммосфер потенциально позволяет использовать новые терапевтические подходы [16]. Однако остается открытым вопрос о выборе методики получения первичной культуры, поскольку наличие большого количества клеток, демонстрирующих мезенхимальный фенотип как в адгезивной, так и в неадгезивной культуре может привести к полной потере связи между культурой и изначальным образцом опухоли [17–19].

Цель исследования – определить влияние методики культивирования клеток КМЖ на способность клеток сохранять эпителиальный фенотип.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе представлен сравнительный анализ двух образцов культуры КМЖ на протяжении трех пассажей при разных способах культивирования. Материал был получен в ходе хирургического вмешательства у пациентки с диагнозом карцинома молочной железы слева, T1N0M. Наличие клинического диагноза и добровольное согласие пациентки послужили критерием включения образца в исследование. Из части материала были изготовлены парафиновые блоки для иммуногистохимического (ИГХ) фенотипирования опухоли [20]. Иммуногистохимические реакции осуществлялись в автостейнере DAKO (Дания). Для определения экспрессии рецепторов срезы окрашивали моноклональными антителами к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, Dako, Дания), рецепторам прогестерона (клон PgR636, Dako, Дания), Ki-67 (клон MIB-1, Dako, Дания), а также моноклональными антителами к Her2/neu (clone 4B5, Rabbit Monoclonal primary Antibody, Ventana, США). Ядра клеток докрашивали гематоксилином.

Уровень экспрессии рецепторов определяли по шкале Allred от 0 до 8 баллов, учитывающей одновременно количество окрашенных ядер опухолевых клеток и интенсивность их окраски (рис. 1) [21].

Уровень пролиферативной активности определяли по процентному отношению числа окрашен-

ных и неокрашенных к Ki-67 ядер клеток опухоли. При подсчете учитывали только ядерное окрашивание, без учета его интенсивности и особенностей прокрашивания ядер опухолевых клеток. Подсчет проводился при увеличении оптического микроскопа $\times 400$. При диффузном распределении окрашивания исследование проводилось в нескольких случайно выбранных полях зрения среза опухоли. В каждом случае оценивали не менее 600 опухолевых клеток на случай наблюдения [20–21].

По результатам иммуногистохимического исследования первого образца КМЖ была выявлена экспрессия рецепторов эстрогена – 8 баллов, прогестерона – 5 баллов, индекс клеточной пролиферации Ki-67 составил 30 %. Экспрессия к HER-2/neu отсутствовала. Таким образом, данный образец карциномы молочной железы относился к люминальному-B подтипу, HER-2-негативному. По результатам ИГХ исследования второго образца выявлена экспрессия рецепторов эстрогена – 2 балла, прогестерона – 8 баллов, индекс клеточной пролиферации Ki-67 составил 30 %. Экспрессия к HER-2/neu отсутствовала. Таким образом, данный образец КМЖ относился к люминальному-A подтипу.

Другую часть материала доставляли в лабораторию клеточных культур в стерильных условиях в растворе Хэнкса с 5 % гентамицина. Образцы измельчали, далее гомогенную массу помещали в среду для диссоциации (ферменты коллагеназы – гиалуронидаза, DMEM-F12) и инкубировали около 15–16 часов в отсутствии CO₂ на шейкере. Полученную взвесь центрифугировали при 0,7 RPM (30 сек), супернатант сливали, а осадок ресуспендировали с трипсином, после чего растворяли в HF (раствор Хэнкса с 10 % FBS) и центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин). Супернатант сливали, а полученный осадок растворяли в диспазе и ДНКазе, вновь центрифугировали, после чего разводили клеточный осадок в питательной среде Mammocult™ Human Medium (STEMCELL) и помещали в культуральные флаконы. После первого пассажа культуру поделили на адгезивную и неадгезивную. Для пересева клеточную культуру диссоциировали в трипсине, часть осадка распределяли на предметные стекла, покрытые коллагеном и помещенные в чашки Петри, культивировали 1–2 дня для проведения иммуноцитохимического исследования (ИЦХ). Далее стекла высушивали, фиксировали в 10 % нейтральном формальдегиде в течение 2–3 часов, затем промывали фосфатным буфером, выполняли проводку по ксилолам и спиртам. При определении принадлежности клеток к эпители-

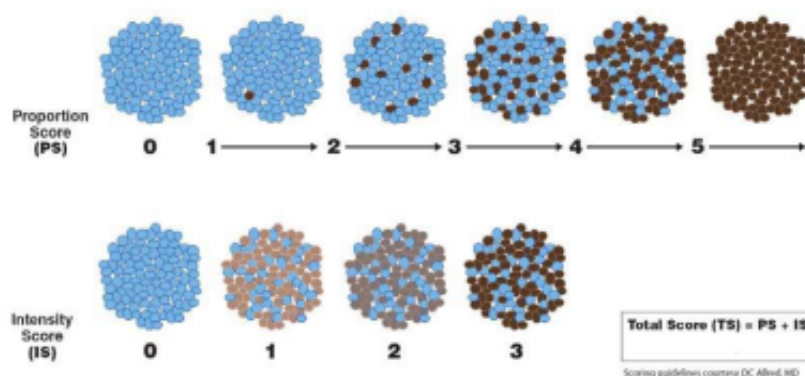


Рис. 1. Шкала оценки экспрессии ER и PR по Allred [21]

альному фенотипу использовали антитела anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody (Roche diagnostics, USA), проводили демаскировку с помощью 0,01%-го раствора Тритон X-100 (10 минут), трипсинизировали в течение 10 минут, для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 1%-м растворе эмбриональной бычьей сыворотки. Эпителиальную природу клеток определяли по процентному отношению числа окрашенных и неокрашенных клеток. Подсчет проводился при увеличении оптического микроскопа $\times 200$. В каждом случае оценивали не менее 500 клеток на случай наблюдения. Контроль над ростом культуры проводился с помощью микроскопа Eclipse TS100, Nikon, определение подтипа осуществлялось с помощью микроскопа Meiji Techno MT4200L.

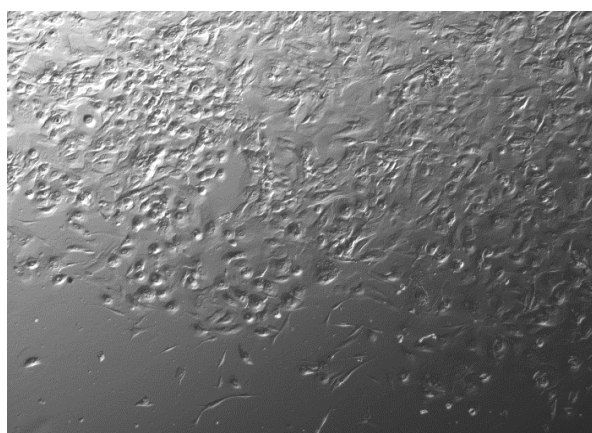
Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 5.1. Рассчитывали число клеток, экспрессирующих панцитокератин. Для сравнительного анализа качественных переменных применяли критерий Хи-квадрат с

поправкой Йейтса на основании анализа таблиц сопряженности, критерий значимости различий p принимался равным менее 0,05.

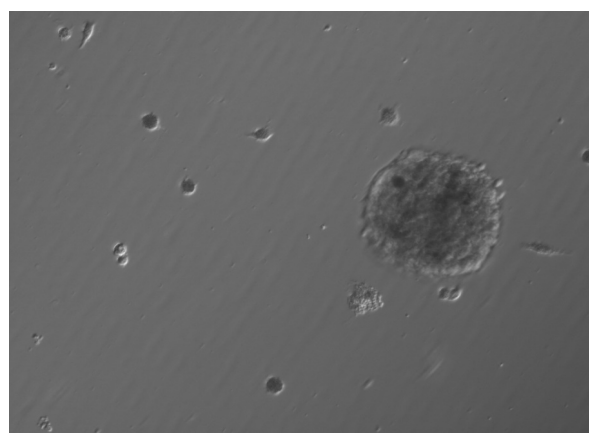
РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования культуры на первом пассаже выявили тенденцию как к формированию монослоя культивируемыми клетками, так и к образованию маммосфер (рис. 2).

На втором пассаже культура была разделена на адгезивную (фрагменты монослоя) и неадгезивную (маммосферы) части, после чего было проведено ИЦХ для определения принадлежности культивируемых клеток к эпителиальной природе. Было выявлено, что клетки обеих культур экспрессировали эпителиальный маркер на втором (P2), третьем (P3) и четвертом (P4) пассажах. Так, в адгезивной культуре процент эпителиальных клеток на P2 составил 46 %, с дальнейшим снижением показателя на P3 до 36 % (P2:P3, $p = 0,002$) и резким снижением экспрессирующих эпителиальный маркер клеток на P4 до 10,8 % (P2:P4,



а



б

Рис. 2. Первый пассаж культуры КМЖ: а – формирование монослоя, ув. $\times 50$, б – образование сфер, ув. $\times 400$ световая микроскопия

$p = 0,001$; P3:P4, $p = 0,001$). При исследовании клеток неадгезивной культуры процент эпителиальных клеток на P2 составил 26,5 % и увеличился на P3 до 29 % (P2:P3, $p = 0,207$). Так же как и в случае с адгезивной культурой произошло снижение экспрессирующих эпителиальный маркер клеток на P4 до 9,8 % (P2:P4, $p = 0,001$; P3:P4, $p = 0,001$).

При сравнении количества клеток, экспрессирующих панцитокератин, в адгезивной и неадгезивной культурах обнаружены значимые различия на втором пассаже $p = 0,001$ (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты ИЦХ анализа адгезивной и неадгезивной культур показывают значимые различия в количестве эпителиальных клеток от пассажа к пассажу. Уменьшение количества клеток, экспрессирующих панцитокератин на четвертом пассаже, свидетельствует об изменении молекулярно-генетической природы культуры и является ограничением для проведения дальнейших пассажей.

В большинстве работ, посвященных первичной культуре КМЖ, имеются данные о том, в процессе культивирования выявляются промежуточные клеточные формы, которые могут быть переходными стадиями между эпителиальными клетками и клетками с мезенхимальной природой [22–24].

В ходе нашего исследования получены данные о том, что при создании первичной культуры образца КМЖ среди культивируемых клеток проявляются отличия в сохранении эпителиальной природы уже на первом пассаже, что может являться определяющим моментом при проведении визуального контроля состояния клеток культуры при длительном культивировании.

Полученные данные согласуются с результатами исследователей об изменении фенотипа опухолевых клеток в процессе культивирования,

а также демонстрируют необходимость контролировать сохранение эпителиальной природы при получении первичной культуры клеток и переводе ее в клеточную линию [24–27].

При проведении сравнительного анализа уровня экспрессии панцитокератина в адгезивной и неадгезивной культурах выявлена отчетливая тенденция к сохранению эпителиальной природы клеток адгезивной культуры по сравнению с клетками сфероидов. Полученные нами данные коррелируют с результатами исследователей, отмечающих снижение количества эпителиальных клеток и увеличение клеток, экспрессирующих мезенхимальные маркеры, при культивировании маммосфер [15, 25–27].

При этом на третьем пассаже в неадгезивной культуре произошло значимое увеличение количества клеток, экспрессирующих панцитокератин, по сравнению со вторым и четвертым пассажем. Эти данные могут свидетельствовать о том, что при культивировании маммосфер происходят процессы эпителиально-мезенхимального перехода. Доказано, что в состав сфероидов входят стволовые раковые клетки, однако до сих пор нет полных данных в понимании процессов самообновления и дифференцировки этих клеток, соответственно нет и возможности утверждать о корреляции результатов *in vivo* и *ex vivo* [28–30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования выявлено, что выбор методики культивирования оказывает влияние на способность клеток сохранять эпителиальный фенотип на протяжении трех пассажей. На втором пассаже уровень экспрессии панцитокератина в адгезивной культуре значимо отличается от неадгезивной. К четвертому пассажу при обеих методиках происходит достоверное снижение количества эпителиальных клеток.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Галимова Э.С., Галагудза М.М. Двухмерные и трехмерные модели культур клеток опухолей *in vitro*. Преимущества и недостатки. Бюллетень сибирской медицины. 2018;17(3):188–196.
2. Ali R., Samman N., Al Zahrani H. et al. Isolation and characterization of a new naturally immortalized human breast carcinoma cell line, KAIMRC1. BMC Cancer. 2017;17(1):803. <http://doi.org/10.1186/s12885-017-3812-5>.
3. Zhao P., Zhou W., Liu Ch. et al. Establishment and characterization of a CTC cell line from peripheral blood of breast cancer patient. J Cancer. 2019;10(24):6095–6104. <http://doi.org/10.7150/jca.33157>.
4. Bezdienieznykh N., Lykhova A., Semesiuk N. et al. Establishment and characterization of new breast and ovarian cancer cell lines as a model for studying cellular plasticity *in vitro*. Exp Oncol. 2016;38(2):94–100.
5. Gillet J-P, Calcagno A.M., Varma S. et al. Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108(46):18708–18713. <http://doi.org/10.1073/pnas.1111840108>.
6. Freshney R.I. Induction of differentiation in neoplastic cells. Anticancer Res. 1985;5(1):111–130.
7. Могиленских А.С., Сазонов С.В. Создание клеточных линий карциномы молочной железы. Гены и Клетки. 2021;16(1):15–23.
8. Janik K., Popeda M., Peciak J. et al. Efficient and simple approach to *in vitro* culture of primary epithelial cancer cells. Biosci Rep. 2016;36(6):e00423. <http://doi.org/10.1042/BSR20160208>.
9. Lasfargues E.Y., Ozzello L. Cultivation of human breast carcinomas. J Natl Cancer Inst. 1958;21(6):1131–1147.
10. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Фадеев Ф.А. с соавт. Первый опыт культивирования клеток рака молочной железы. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2018;15(6):860–867.
11. Нуштаева А.А. Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов: дис. ... канд. биол. наук. Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 2019.
12. Iglesias J.M., Belouqui I., Garcia-Garcia F. et al. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. PLoS One. 2013;8(10):e77281. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077281>.
13. Borgna S., Armellini M., di Gennaro A. et al. Mesenchymal traits are selected along with stem features in breast cancer cells grown as mammospheres. Cell cycle. 2012;11(22): 4242–4251. <http://doi.org/10.4161/cc.22543>.

14. Сазонов С.В., Бриллиант А.А., Бриллиант Ю.М. Связь состояния пролиферативных процессов и особенностей рецепторного аппарата опухолевых клеток карциномы молочной железы. *Гены и Клетки*. 2017;12(4):76–81.
15. Засадкевич Ю.М., Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Роль кадгеринов в норме и при развитии рака молочной железы. *Архив патологии*. 2015;77(3):57–64.
16. Rivenbark A.G., O'Connor S.M., Coleman W.B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol*. 2013;183(4):1113–1124. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002>.
17. Шамшурина Е.О., Могиленских А.С., Гребенюк Е.В. с соавт. Цитологическая оценка одной культуры клеток карциномы молочной железы Luminal A подтипа. *Уральский медицинский журнал*. 2021;20(5):75–81.
18. Омельяненко Н.П., Ильина В.К., Ковалев А.В., Родионов С.А. Структурная динамика адгезивных клеток костного мозга при культивировании: первый пассаж (часть 2). *Гены и клетки*. 2014;9(4):56–62.
19. Wang X., Zhang N., Huo Q. et al. Huaier aqueous extract inhibits stem-like characteristics of MCF7 breast cancer cells via inactivation of hedgehog pathway. *Tumour Biol*. 2014;35(11):10805–10813. <http://doi.org/10.1007/s13277-014-2390-2>.
20. Сазонов С.В. Обеспечение качества молекулярно-биологических исследований при диагностике рака молочной железы. Екатеринбург: ВУМАН, 2018. 152 с.
21. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998;11(2):155–168.
22. Roelofs Ch., Hollande F., Redvers R. et al. Breast tumour organoids: promising models for the genomic and functional characterisation of breast cancer. *Biochem Soc Trans*. 2019;47(1):109–117. <http://doi.org/10.1042/BST20180375>.
23. Ootani A., Li X., Sangiorgi E. et al. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med*. 2009;15(6):701–706. <http://doi.org/10.1038/nm.1951>.
24. Lee B.H. Commentary on: «Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma. *Cancer Genome Atlas Research Network*. *N Engl J Med*. 2016 Jan 14;374(2):135–45. *Urol Oncol*. 2017;35(9):578–579. <http://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.07.022>.
25. Mogilenskikh A. Notch signaling pathway in triple negative breast cancer with high and low content of cancer stem cells. *ISSR Annual Meeting*. 2022:112.
26. Strauss R., Li Z. Y., Liu Y. et al. Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS One*. 2011;6(1):e16186. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0016186>.
27. Ciriello G., Gatza M.L., Beck A.H. et al. Comprehensive molecular portraits of invasive lobular breast cancer. *Cell*. 2015;163(2):506–519. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.033>.
28. Nushtaeva A.A., Stepanov G.A., Semenov D.V. et al. Characterization of primary normal and malignant breast cancer cell and their response to chemotherapy and immunostimulatory agents. *BMC Cancer*. 2018;18(1):728. <http://doi.org/10.1186/s12885-018-4635-8>.
29. Mani S.A., Guo W., Liao M.-J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704–715. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>.
30. Jeppesen M., Hagel G., Glenthøj A. et al. Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine. *PLoS One*. 2017;12(9):e0183074. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0183074>.

Сведения об авторах:

Елена Олеговна Шамшурина – кандидат медицинских наук;
 Анна Сергеевна Могиленских – аспирант;
 Екатерина Владимировна Гребенюк – аспирант;
 Виктория Сергеевна Самохина – студент;
 Сергей Владимирович Сазонов – доктор медицинских наук, профессор;
 Сергей Михайлович Демидов – доктор медицинских наук, профессор.

Information about the authors

Elena O Shamshurina – Ph.D. in medicine;
 Anna S. Mogilenskikh – Postgraduate Student;
 Ekaterina V. Grebenyuk – Postgraduate Student;
 Victoria S. Samokhina – Student;
 Sergei V. Sazonov – Doctor of Science (Medicine), Professor;
 Sergei M. Demidov – Doctor of Science (Medicine), Professor.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of interests. The authors declare no conflicts of interests.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Этическая экспертиза не требуется.

Ethics approval is not required.

Информированное согласие не требуется.

Informed consent is not required.

Статья поступила в редакцию 24.05.2022; одобрена после рецензирования 08.09.2022; принята к публикации 08.11.2022.

The article was submitted 24.05.2022; approved after reviewing 08.09.2022; accepted for publication 08.11.2022.