

Оригинальная статья | Original article



3.3.3 — Патологическая физиология

УДК 616-092.18

<https://doi.org/10.52420/umj.23.4.18>

<https://elibrary.ru/BSVYLL>

Возможности оценки основных диагностических маркеров при культивировании клеток люминального В подтипа рака молочной железы

Анна Сергеевна Могиленских^{1,2}✉, Михаил Игоревич Дерюгин^{1,2},
Фёдор Алексеевич Фадеев¹, Сергей Михайлович Демидов^{1,2},
Сергей Владимирович Сазонов^{1,2}

¹ Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

² Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

✉ annasajler@yandex.ru

Аннотация

Введение. Несмотря на многочисленные проводимые исследования, посвященные комплексным сравнениям экспрессии мРНК, белков, мутаций в клеточных культурах и образцах тканей рака молочной железы, данных об их связи с изменениями рецепторного аппарата недостаточно.

Цель исследования — определение изменения уровней экспрессии рецепторов в культуре клеток, полученной из образцов люминального В подтипа рака молочной железы, на протяжении пяти пассажей.

Материалы и методы. Произведен анализ эстрогена и Ki67, панцитокератина и виментина на протяжении пяти пассажей в клеточной культуре. Из части материала изготовлены парафиновые блоки для иммуногистохимического анализа, часть материала использовалась для получения клеточной суспензии для проведения проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Получена культура с высоким уровнем Ki-67 и экспрессии эстрогена на первых трех пассажах. Клетки сохраняли эпителиальную природу на протяжении всего культивирования.

Обсуждение. Возможно, полученная культура может демонстрировать процессы, происходящие при региональном метастазировании. Об этом свидетельствует обнаружение опухолевых клеток, экспрессирующих виментин, с первого по четвертый пассаж. Изучение процессов, происходящих в моделях *in vitro*, поможет приблизиться к пониманию процессов в биологии рака молочной железы и выяснить природу гетерогенности этого заболевания.

Заключение. Показана принципиальная возможность мониторинга основных параметров жизнедеятельности клеточной культуры люминального подтипа рака молочной железы, что позволяет создать эффективную модель наблюдения за культурами *in vitro*.

Ключевые слова: рак молочной железы, люминальный В подтип, первичная культура, уровень пролиферативной активности Ki-67, рецепторы эстрогена, виментин, кератин, проточная цитометрия

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов.

Соответствие принципам этики. Все пациенты дали письменное информированное добровольное согласие на проведение лечебно-диагностических мероприятий, анализ данных медицинских документов и анонимное участие в исследовании. Работа одобрена локальным этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 24 января 2020 г.).

Для цитирования: Возможности оценки основных диагностических маркеров при культивировании клеток люминального В подтипа рака молочной железы / А.С. Могиленских, М.И. Дерюгин, Ф.А. Фадеев [и др.] // Уральский медицинский журнал. 2024. Т. 23, № 4. С. 18–28. DOI: <https://doi.org/10.52420/umj.23.4.18>. EDN: <https://elibrary.ru/BSVYLL>.

Possibilities of Assessing the Main Diagnostic Markers When Cultivating Luminal B Subtype Breast Cancer Cells

Anna S. Mogilenskikh^{1,2✉}, Michail I. Deryugin^{1,2}, Fedor A. Fadeev¹, Sergey M. Demidov^{1,2}, Sergey V. Sazonov^{1,2}

¹ Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia

² Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

✉ annasajler@yandex.ru

Abstract

Introduction. Despite extensive studies devoted to comprehensive comparisons of the expression of mRNA, proteins, mutations in cell cultures and tissue samples of breast cancer, there is insufficient data on the comparability of their receptor apparatus.

The purpose of the study was to determine changes in receptor expression levels in a cell culture obtained from a sample of the luminal B over five passages.

Materials and methods. A cell culture was obtained. Estrogen and Ki-67, pancytokeratin and vimentin were analyzed over five passages. Paraffin blocks were prepared from part of the material for immunohistochemical analysis.

Results and discussion. A culture was obtained with high levels of Ki-67 and estrogen expression during the first three passages. The cells maintained their epithelial nature throughout the culture. Perhaps this culture can demonstrate the processes occurring during regional metastasis. This is evidenced by the detection of tumor cells expressing vimentin from the first to the fourth passage. Thus, studying the processes occurring in in vitro models will help to come closer to understanding the processes in the biology of breast cancer and clarify the nature of the heterogeneity of this disease.

Conclusions. Studying the differences between primary culture cells and tumor tissue samples will provide an effective in vitro model.

Keywords: breast cancer, luminal B subtype, primary culture, level of Ki-67 proliferative activity, estrogen receptors, vimentin, keratin, flow cytometry

Conflicts of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest.

Conformity with the principles of ethics. All patients gave written informed voluntary consent to conduct diagnostic and treatment measures, analyze medical document data, and anonymously participate in the study. The study was approved by the Local Ethics Committee of the Ural State Medical University (Protocol No. 1 dated 24 January 2020).

For citation: Mogilenskikh AS, Deryugin MI, Fadeev FA, Demidov SM, Sazonov SV. Possibilities of assessing the main diagnostic markers when cultivating luminal B subtype breast cancer cells. *Ural Medical Journal*. 2024; 23(4):18–28. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.52420/umj.23.4.18>. EDN: <https://elibrary.ru/BSVYLL>.

Введение

Клеточные культуры традиционно используются в качестве экспериментальной модели для изучения биологии рака и молекулярной фармакологии [1–3].

Существуют разные подходы к выбору культур для исследований. Во многих работах подчеркивается важность использования культур, соответствующих суррогатному молекулярно-биологическому подтипу рака молочной железы (РМЖ), которые различаются по индексу клеточной пролиферации Ki-67, уровню экспрессии к рецепторам эстрогена и прогестерона, онкобелка HER2/neu¹ [4–5]. Для определения подтипа используется метод иммуногистохимического (ИГХ) анализа, с помощью которого оцениваются индекс клеточной пролиферации Ki-67, экспрессия ядерных рецепторов эстрогенов-α и прогестерона, статус онкобелка HER2/neu.

При положительной экспрессии рецепторов эстрогена, высоком уровне экспрессии рецепторов прогестерона ($\geq 20\%$), низком уровне индекса Ki-67 и отсутствии признаков активации гена *HER2* опухоль рекомендуется относить к люминальному типу А. При наличии экспрессии рецепторов эстрогена и одного из факторов (Ki-67 высокий ($\geq 30\%$) или экспрессия рецепторов эстрогена низкая ($< 20\%$)) подтип определяется как люминальный тип В (HER2-отрицательный). Люминальный тип В (HER2-положительный) характерен для эстроген-позитивного РМЖ, у которого есть клинически значимые признаки амплификации и гиперэкспрессии гена *HER2* (ИГХ-статус HER2+++ либо HER2++ в сочетании с положительным результатом метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (англ. Fluorescence In Situ Hybridization)). HER2-положительный подтип определяется при гиперэкспрессии гена *HER2* в сочетании с отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона. При отсутствии экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона и HER2 определяется базальноподобный (тройной негативный протоковый) РМЖ [6].

Другие исследователи используют иммортализованные культуры без экспрессии специфических рецепторов, как, например, клеточная линия MCF-7 [7–9].

Рецепторный аппарат клеток играет важную роль в происхождении и развитии опухолей, принимает участие в процессах карценогенеза, пролиферации и апоптоза, а также обеспечивает регуляцию физиологических функций клетки [10, 11]. Высокий уровень индекса клеточной пролиферации Ki-67 считается плохим прогностическим фактором при РМЖ и напрямую коррелирует с высокой степенью злокачественности [12].

Значимую роль в процессах канцерогенеза играют связи между изменениями в рецепторном аппарате клеток РМЖ. Так, имеются данные о том, что потеря экспрессии цитокератина и увеличение экспрессии виментина являются индикаторами биологически агрессивного РМЖ [13, 14]. Виментин необходим для миграции клеток, которая осуществляется благодаря его способности взаимодействовать с компонентами цитоскелета: актином и тубулином. Приобретение клетками виментина способствует распространению опухолевых клеток по кровеносным сосудам. Коэкспрессия цитокератина и виментина в клетках встречается во время эмбрионального развития, процессов регенерации и раке [15].

Т. А. Богуш и др. (2018) исследовали уровни экспрессии мезенхимального маркера виментина в иммортализованных клеточных линиях. Показано, что уровень виментина может как повышаться, так и снижаться, а также полностью утрачиваться при росте культуры. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования клеточных культур как модели для изучения процессов эпителиально-мезенхимального перехода [16].

¹ HER2/neu — рецептор эпидермального фактора роста, тип 2 (англ. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2).

Рецепторы эстрогена при РМЖ являются важной мишенью для терапии. Несмотря на клиническую пользу от антиэстрогеновой терапии, точное биологическое действие этих рецепторов при опухолях молочной железы до конца не изучено. Отмечено, что клетки с высоким уровнем экспрессии эстрогена играют роль при процессах метастазирования [17, 18].

Несмотря на обширные исследования, посвященные комплексным сравнениям экспрессии матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), белков, мутаций в клеточных культурах и образцах тканей РМЖ, данных об их связи с изменениями рецепторного аппарата недостаточно.

Цель исследования — определение изменения уровней экспрессии основных рецепторов в культуре клеток, полученной из люминального В подтипа, на протяжении пяти пассажей.

Материалы и методы

Образцы опухолевой ткани для получения клеточной культуры доставлялись в лабораторию в стерильных условиях.

Критерии включения образца в исследование: наличие клинического диагноза, отсутствие терапии, добровольное информированное согласие пациента.

Всего с 2020 по 2024 г. получено 29 культур люминального В подтипа РМЖ.

Метод клеточных культур

Образец ткани опухоли измельчали, растворяли в смеси ферментов коллагеназы и гиалуронидазы 1 : 10 с DMEM/F12 в течение 15–16 ч. в инкубаторе в герметично закрытой пробирке (лента Parafilm). Полученную массу клеток центрифугировали 30 с. при 0,7 RPM. Супернатант сливали, полученный осадок ресуспендировали сначала с трипсином (Gibco, США) и центрифугировали 5 минут при 1,4 RPM, затем с диспазой-ДНКазой (STEMCELL, Канада) при тех же оборотах. Затем клеточный осадок растворяли в питательной среде Mammocult Human Medium (STEMCELL, Канада) с добавлением гентамицина и помещали в культуральные флаконы, покрытые коллагеном (STEMCELL, Канада), растворенным в растворе Дюльбекко без кальция и магния (ПанЭко, Россия) в соотношении 1 : 46. Получали нулевой пассаж. Контроль за ростом среды осуществлялся с помощью биологического инвертированного микроскопа для лабораторных исследований Axio Vert A1 (Carl Zeiss, Германия).

Образцы сохранены в криобанке. Для заморозки клеточную культуру после обработки трипсином и центрифугирования растворяли в среде «КриоМед» (ПанЭко, Россия). Криоконсервация осуществлялась с помощью прибора Kryo 560 (Kryo, Великобритания).

Все работы с культурами осуществлялись в ламинарном боксе биологической безопасности (класс II, тип A).

ИГХ-метод:

- 1) с полученного парафинового блока с помощью микротомы Microm HM340 с системой переноса срезов (MICROM Labor gerate GmbH, Германия);
- 2) ИГХ-исследование проводилось по стандартному протоколу компании Ventana (США) с помощью моноклональных антител к рецепторам эстрогена и прогестерона, уровню клеточной пролиферации Ki-67 и онкобелку HER2 (клон SP1, клон SP2, клон SP6, клон 4B5 (Ventana, США));
- 3) ядра клеток докрашивались гематоксилином.

Метод проточной цитофлуорометрии

Пересев осуществлялся на 6 или 7 сутки после достижения клетками монослоя. Для пересева клетки открепляли с помощью обработки ферментом трипсином в н.у. в течение 9 минут (ПанЭко, Россия), для нейтрализации фермента добавляли раствор HF (1 % фетальной бычьей сыворотки и раствор Хенкса без фенолового красного) и центрифугировали 5 минут при 1,4 RPM. Подсчет пассажей производился после 1 пересева первичной культуры.

Оценка клеточной гибели

Использовался коммерческий набор (Lumiprobe, Россия) для определения апоптотических клеток аннексина V, конъюгированного с Alexa Fluor 488, и йодистого пропидия, конъюгированного с PI.

1. Клетки промывались охлажденным фосфатным буфером (pH 7,4) и буфером для связывания.
2. В буфер для связывания добавлялось 3 мкл раствора аннексина V-AF488, инкубация проводилась в течение 10–15 мин. при комнатной температуре в защищенном от света месте.
3. Йодистый пропидий добавлялся в количестве 5 мкл за 5 мин. до проведения анализа.
4. Клетки от буфера для связывания не промывались.

Оценка рецепторного аппарата

1. Хирургический образец измельчался, полученную взвесь клеток растворяли в фосфатном буфере просеивали через сито, центрифугировали в течение 5 мин. при 350 xg.
2. Для фиксации клетки ресуспендировали с 4 % формалином в течение 5 мин.
3. После фиксации клетки промывали фосфатным буфером, центрифугировали при тех же оборотах 5 мин.
4. Премобилизация проводилась 0,1 % раствором тритона в течение 15 мин.
5. Для оценки использовались антитела производства Abscam (Канада): к виментину — меченные Alexa Fluor 405; эстрогену — меченные Alexa Fluor 647; Ki-67 — меченные Alexa Fluor 488; HER2 — меченные Brilliant Violet 421; панцитокератину — меченные Alexa Fluor® 647 (BioLegend, Великобритания).
6. Инкубация проводилась в течение 40 мин. при комнатной температуре в защищенном от света месте.
7. После инкубации клетки однократно промывали в фосфатном буфере.

Измерение уровня флуоресценции окрашенных клеток осуществляли с помощью проточного цитофлуориметра Navios 10 (Beckman Coulter, США). Оценивали не менее 5 млн событий.

Статистический анализ

Для статистической обработки результатов использовали программу STATISTICA 5.1. Для сравнительного анализа качественных переменных применяли χ^2 -критерий на основании анализа таблиц сопряженности, критерий значимости различий p принимался равным $<0,05$.

Результаты

При ИГХ-исследовании материала обнаружена экспрессия рецепторов к эстрогену, прогестерону, высокий индекс клеточной пролиферации Ki-67. Экспрессия HER2/неу отсутствует. Образец относится к люминальному В HER2-негативному подтипу.

При исследовании клеток методом проточной цитофлуориметрии на первом пассаже обнаружена гетерогенность клеточных популяций при оценке размеров клеток согласно корреляции с прямым и боковым светорассеянием.

При оценке клеточной гибели с помощью аннексина V и йодистого пропидия количество живых клеток составило 48,4 %, некротических — 18,0 %, мертвых — 33,3 %. Выделено три гейта клеток. Гейт G содержал только живые клетки, преимущественно крупные согласно прямому светорассеянию. При оценке бокового светорассеяния отмечена гетерогенность по количеству гранул, форме ядра. Гейт F содержал мелкие клетки — как живые, так и некротические. Гейт I — только мертвые клетки (рис. 1).

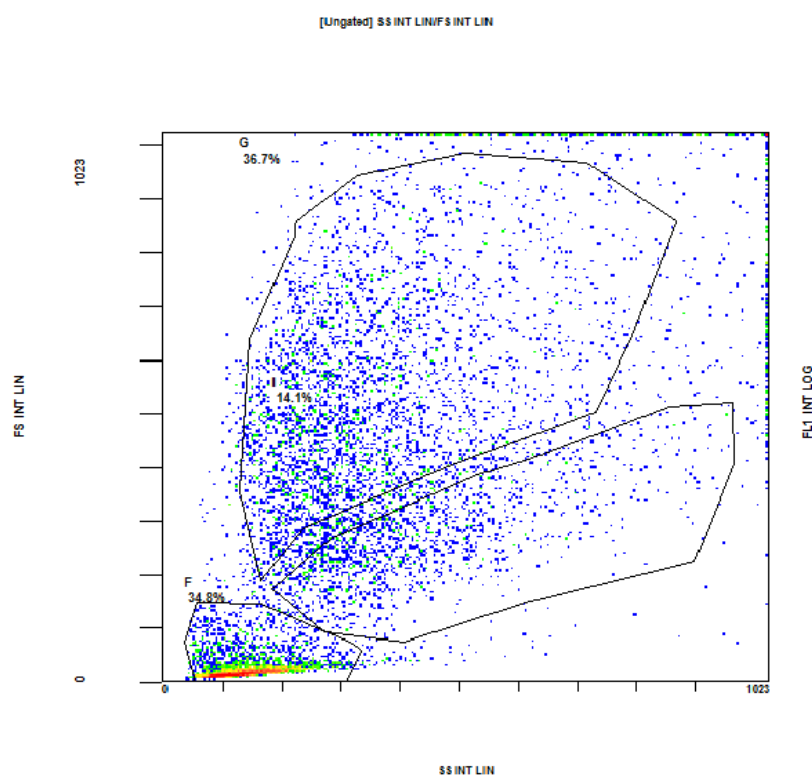


Рис. 1. Гетерогенность клеток культуры РМЖ. Проточная цитометрия, первый пассаж. Ось X — боковое светорассеяние; ось Y — прямое светорассеяние (под углом 90° к направлению пучка света)

На первом пассаже обнаружена высокая экспрессия по рецептору эстрогена (84,5 %), уровню Ki-67 (83,8 %); большая часть клеточной популяции представлена клетками, имеющими эпителиальный фенотип (95,2 %), меньшая — клетками, имеющими мезенхимальный фенотип (44 %) (рис. 2).

При дальнейшей оценке эпителиальной природы культуры клеток РМЖ обнаружено, что на протяжении пяти пассажей преобладают клетки, экспрессирующие панцитокератин. Наибольшее количество клеток эпителиальной природы обнаружено на первом (4 760/5 000; 95,2 %) и втором пассажах (4 845/5 000; 96,9 %) (таблица). После второго пассажа количество клеток, экспрессирующих панцитокератин, существенно варьирует. На третьем пассаже самое низкое количество клеток, экспрессирующих маркеры эпителиальной природы (3 120/5 000; 62,4 %).

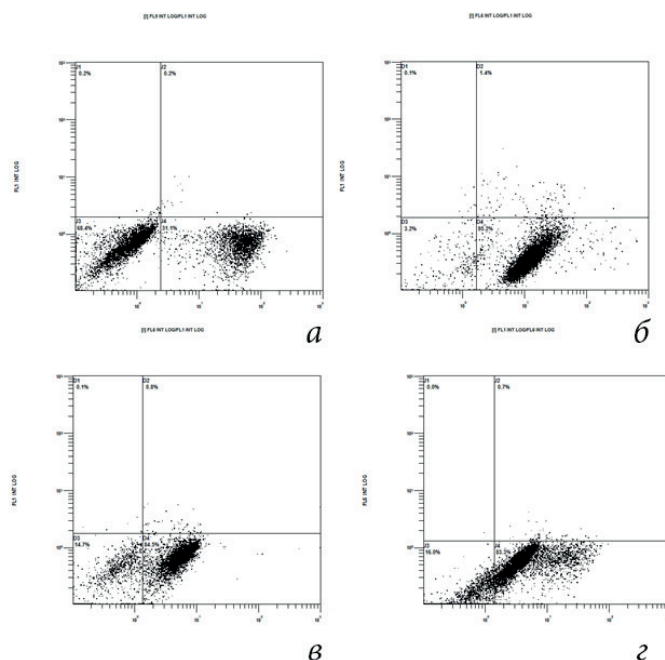


Рис. 2. Анализ рецепторного аппарата клеток первичной культуры рака молочной железы, первый пассаж, проточная цитофлуорометрия:

а — уровень экспрессии виментина; *б* — уровень экспрессии панцитокератина; *в* — уровень экспрессии рецепторов к эстрогену; *г* — индекс клеточной пролиферации Ki-67

Уровень экспрессии виментина менее половины клеток на всех пассажах и значительно отличается между первым и пятым пассажами, а также четвертым и пятым. На пятом пассаже самый низкий уровень клеток мезенхимальной природы (195/5 000; 3,9 %).

Экспрессия рецепторов эстрогена сохраняется на высоком уровне на всех пассажах, на втором составляет 3 125/5 000 (62,5 %), третьем — 2 490/5 000 (49,8 %), четвертом — 4 085/5 000 (81,7 %), пятом — 3 400/5 000 (68,0 %). Однако уровень экспрессии на каждом пассаже значительно отличается от предыдущего.

**Изменения рецепторного аппарата в клетках культуры РМЖ
на протяжении пяти пассажей (количество клеток с экспрессией, абс./общ. (%))**

Показатель	Панцитокератин	Виментин	Эстроген	Ki-67
P1	4 760/5 000 (95,2)	2 200/5 000 (44,0)	4 225/5 000 (84,5)	4 190/5 000 (83,8)
P2	4 845/5 000 (96,9)	2 375/5 000 (47,5)	3 125/5 000 (62,5)	3 015/5 000 (60,3)
P3	3 120/5 000 (62,4)	1 690/5 000 (33,8)	2 490/5 000 (49,8)	2 840/5 000 (56,8)
P4	4 465/5 000 (89,3)	2 480/5 000 (49,6)	4 085/5 000 (81,7)	1 640/5 000 (32,8)
P5	3 360/5 000 (67,2)	195/5 000 (3,9)	3 400/5 000 (68,0)	1 900/5 000 (38,0)
$p(\chi^2)$	$P_1 : P_2 = 1,000$ $P_2 : P_3 < 0,001$ $P_3 : P_4 < 0,001$ $P_4 : P_5 < 0,001$ $P_1 : P_5 < 0,001$	$P_1 : P_2 = 0,200$ $P_2 : P_3 = 0,045$ $P_3 : P_4 = 0,020$ $P_4 : P_5 < 0,001$ $P_1 : P_5 < 0,001$	$P_1 : P_2 < 0,001$ $P_2 : P_3 = 0,030$ $P_3 : P_4 < 0,001$ $P_4 : P_5 = 0,020$ $P_1 : P_5 = 0,020$	$P_1 : P_2 < 0,001$ $P_2 : P_3 = 0,700$ $P_3 : P_4 < 0,001$ $P_4 : P_5 = 0,400$ $P_1 : P_5 < 0,001$

На первом пассаже обнаружен наибольший индекс клеточной пролиферации Ki-67. На втором и третьем пассажах Ki-67 сохраняется более чем у половины клеток (3 015/5 000; 60,3 % и 2 840/5 000; 56,8 % соответственно). На четвертом (1 640/5 000; 32,8 %) и пятом пас-

сажах (1 900/5 000; 38 %) уровень значительно снижается по сравнению с предыдущими пассажами. На пятом пассаже обнаруживается часть клеток без экспрессии маркеров виментина и панцитокератина (1 445/5 000; 28,9 %).

Обсуждение

Поскольку большинство иммортализованных клеточных линий получено не из образцов первичной опухоли, а от метастатических очагов, то невозможно провести корреляцию между первичной опухолью и получаемой клеточной культурой. Это также означает, что полученные культуры демонстрируют нетипичный фенотип для более ранних стадий РМЖ и не соответствуют характеристикам суррогатных молекулярно-биологических подтипов. По этим причинам вектор исследований сместился на получение клеток из первичной опухоли [19].

Оценка первого пассажа по прямому светорассеянию показала, что полученная первичная культура обладает полиморфизмом и включает в себя клетки разного размера. Интенсивность бокового светорассеяния свидетельствует о сложном строении клеточных структур, наличии гранул.

Имеются сведения о том, что при сравнении клеточных линий с опухолевой тканью наблюдается соответствие при ИГХ-анализе рецепторов эстрогена и прогестерона (87 % и 73 % соответственно), HER2/neu (93 %) [20, 21].

Полученные в настоящем исследовании результаты показывают высокий уровень индекса клеточной пролиферации на протяжении трех пассажей, как и у изначального образца, и сохранение уровня экспрессии эстрогена на протяжении пяти пассажей. Имеются данные иммуноцитохимических исследований уровня Ki-67 в первичных клеточных культурах, полученных от образцов люминального В подтипа, которые свидетельствуют об отсутствии достоверных отличий с изначальными образцами и демонстрируют высокие показатели Ki-67 с первого по четвертый пассаж [22].

В некоторых работах отмечено изменение уровней экспрессии рецепторов к эстрогену в ходе культивирования. Причины этих явлений в настоящее время неизвестны. Предполагается, что на экспрессию рецепторов могут влиять факторы среды или более активный рост определенных популяций клеток из гетерогенной опухоли [23, 24]. Возможно, эта культура может демонстрировать процессы, происходящие при региональном метастазировании [25]. Об этом свидетельствует обнаружение опухолевых клеток, экспрессирующих виментин с первого по четвертый пассаж. Положительная экспрессия виментина в клетках РМЖ связана как с процессами эпителиально-мезенхимального перехода, так и является важным признаком при определении базальной дифференцировки опухолевых клеток [26].

Таким образом, изучение процессов, происходящих в моделях *in vitro*, поможет приблизиться к пониманию процессов в биологии РМЖ и выяснить природу гетерогенности этого заболевания.

Заключение

Исследование различий между клетками первичных культур и образцами опухолевых тканей позволяет при использовании проточной цитофлуориметрии создавать модель опухоли *in vitro* для изучения процессов, протекающих *in vivo*, и оценивать как основные процессы жизнедеятельности опухолевых клеток, так и особенности внутриклеточных механизмов в формировании гетерогенности опухолевой ткани.

При анализе диагностических маркеров при культивировании клеток, полученных от образца люминального В подтипа РМЖ, обнаружены высокий уровень Ki-67 на протяжении трех пассажей и сохранение уровня экспрессии эстрогена на протяжении пяти пассажей.

Список источников | References

1. Mezhevova IV, Sitkovskaya AO, Kit OI. Primary tumor cell cultures: Current methods of obtaining and subcultivation. *South Russian Journal of Cancer*. 2020;1(3):36–49. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.37748/2687-0533-2020-1-3-4>.
2. Mogilenskikh AS, Sazonov SV. Establishment of breast carcinoma cell lines (literature review). *Gens & Cells*. 2021;16(1):15–23. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.23868/202104002>.
3. Ravi M, Sneka MK, Aastha J. The culture conditions and outputs from breast cancer cell line in vitro experiments. *Experimental Cell Research*. 2019;383(2):111548. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111548>.
4. Sazonov SV, Brilliant AA, Brilliant YuM. Proliferative processes and features of tumor cell receptor apparatus of the breast carcinoma. *Gens & Cells*. 2017;12(4):76–81. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.23868/201707033>.
5. Dolzhikov AA, Kotlyarov AA, Mukhina TS. Investigating the expression of estrogen and progesterone receptors, Her2/neu and proliferation marker ki67, and their interrelationships in breast cancer. *Kursk Scientific and Practical Bulletin "Man and His Health"*. 2007;(4):37–44. (In Russ.). EDN: <https://elibrary.ru/kckstp>.
6. Sazonov SV. Quality assurance for molecular genetic diagnosis of breast cancer. *Ural Medical Journal*. 2020;(2):62–66. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.25694/URMJ.2020.02.16>.
7. Bogush TA, Kalyuzhny SA, Chetyrkina MR, Yastrebova MA, Scherbakov AM, Ryabinina OM, et al. Molecular mechanisms of drug resistance in MCF7/ADR breast cancer cells. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2018;59(5):374–376. (In Russ.). EDN: <https://elibrary.ru/xpurpn>.
8. Krause S, Maffini MV, Soto AM, Sonnenschein C. The microenvironment determines the breast cancer cells' phenotype: Organization of MCF7 cells in 3D cultures. *BMC Cancer*. 2010;10:263. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-263>.
9. Kinder DH, Aulthouse AL. MCF-7 breast cancer cell line grown in agarose culture for study of COX-2 inhibitors in three-dimensional growth system. *Cancer Letters*. 2004;205(1):49–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.10.030>.
10. Semiglazov VF, Letyagin VP, Semiglazov VV, Manikhas AG, Paltuev RM. Clinical recommendations on organ-preserving treatment of breast cancer. In: *Clinical recommendations of the All-Russian public organization ROOM for the diagnosis and treatment of breast cancer*. Moscow: ABC-press; 2015. P. 152–154. (In Russ.). EDN: <https://elibrary.ru/gerynk>.
11. Konyshov KV, Sazonov SV. Changes in expression of immunohistochemical markers in regional breast cancer metastases. *Russian Journal of Archive of Pathology*. 2020;82(4):19–26. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17116/patol20208204119>.
12. Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, Mehta SV, Brahmabhatt BV, Shah MJ, et al. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. *The International Journal of Biological Markers*. 2009;24(1):38–46. DOI: <https://doi.org/10.1177/172460080902400106>.
13. Minafra L, Norata R, Bravatà V, Viola M, Lupo C, Gelfi C, et al. Unmasking epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer primary culture: A study report. *BMC Research Notes*. 2012;5:343. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-343>.
14. Ostrowska-Podhorodecka Z, Ding I, Lee W, Tanic J, Abbasi S, Arora PD, et al. Vimentin tunes cell migration on collagen by controlling $\beta 1$ integrin activation and clustering. *Journal of Cell Science*. 2021;134(6):jcs254359. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.254359>.
15. Bogush T, Kaliuzhny SA, Chetyrkina MR, Yastrebova MA, Scherbakov AM, Mamichev IA, et al. Vimentin expression in human cell lines of epithelial tumors. *Advances in Molecular Oncology*. 2018;5(2):24–30. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-2-24-30>.
16. Topi G, Satapathy SR, Ghatak S, Hellman K, Ek F, Olsson R, et al. High Oestrogen receptor alpha expression correlates with adverse prognosis and promotes metastasis in colorectal cancer. *Cell Communication and Signaling*. 2024;22(1):198. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01582-1>. Erratum in: *Cell Communication and Signaling*. 2024;22(1):253. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01631-9>.
17. Chiu JH, Wen CS, Wang JY, Hsu CY, Tsai YF, Hung SC, et al. Role of estrogen receptors and Src signaling in mechanisms of bone metastasis by estrogen receptor positive breast cancers. *Journal of Translational Medicine*. 2017;15(1):97. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1192-x>.
18. Mitra A, Mishra L, Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends in Biotechnology*. 2013;31(6):347–354. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.006>.

19. Burdall SE, Hanby AM, Lansdown MR, Speirs V. Breast cancer cell lines: Friend or foe? *Breast Cancer Research*. 2003;5(2):89–95. DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr577>.
20. Forozan F, Mahlamäki EH, Monni O, Chen Y, Veldman R, Jiang Y, et al. Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: A basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Research*. 2000;60(16):4519–4525. PMID: <https://pubmed.gov/10969801>.
21. Grebenyuk EV, Mogilenskikh AS, Sazonov SV. Features of proliferative processes in cell cultures from samples of the luminal B (HER2-negative) subtype of breast cancer. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science*. 2023;20(1–2):53–62. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2023-20-1-53-62>.
22. Dekkers JF, van Vliet EJ, Sachs N, Rosenbluth JM, Kopper O, Rebel HG, et al. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nature Protocols*. 2021;16(4):1936–1965. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00474-1>.
23. Linnemann JR, Meixner LK, Miura H, Scheel CH. An organotypic 3D assay for primary human mammary epithelial cells that recapitulates branching morphogenesis. *Methods in Molecular Biology*. 2017;1612:125–137. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_9.
24. Konyshov K, Sazonov S. Heterogeneity of breast cancer surrogate subtype of primary tumour and local metastases. *Virchows Archiv*. 2022;481(Suppl 1):189–190 DOI: <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03379-4>.
25. Kusinska RU, Kordek R, Pluciennik E, Bednarek AK, Piekarski JH, Potemski P. Does vimentin help to delineate the so-called “basal type breast cancer”? *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2009;28(1):118. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-118>.

Информация об авторах

Анна Сергеевна Могиленских  — научный сотрудник лаборатории клеточных культур, Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия; ассистент кафедры гистологии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия.

E-mail: annasajler@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7145-0733>

Михаил Игоревич Дерюгин — лаборант-исследователь патологоанатомического отделения, Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия; ассистент кафедры гистологии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия.

E-mail: mderyugin@mail.ru

Фёдор Алексеевич Фадеев — кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией клеточных культур, Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия.

E-mail: fdf79@mail.ru

Сергей Михайлович Демидов — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник патологоанатомического отделения, Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия; заведующий кафедрой онкологии и лучевой диагностики, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия.

E-mail: professordemidov@mail.ru

Сергей Владимирович Сазонов — доктор медицинских наук, профессор, заместитель главного врача по науке, заведующий патологоанатомическим отделением, Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия; заведующий кафедрой гистологии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия.

E-mail: prof-ssazonov@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7064-0079>

Information about the authors

Anna S. Mogilenskikh  — Researcher of the Laboratory of Cell Cultures, Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia; Assistant of the Department of Histology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia.

E-mail: annasajler@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7145-0733>

Michail I. Deryugin — Laboratory Technician and Researcher of the Pathoanatomical Department, Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia; Assistant of the Department of Histology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia.

E-mail: mderyugin@mail.ru

Fedor A. Fadeev — Candidate of Sciences (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory of Cell Cultures, Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia.

E-mail: fdf79@mail.ru

Sergey M. Demidov — Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Leading Researcher of the Pathoanatomical Department, Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia; Head of the Department of Oncology and Radiation Diagnostics, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia.

E-mail: professordemidov@mail.ru

Sergey V. Sazonov — Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Deputy Chief Physician for Science, Head of the Pathoanatomical Department, Institute of Medical Cellular Technologies, Ekaterinburg, Russia; Head of the Department of Histology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia.

E-mail: prof-ssazonov@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7064-0079>

Рукопись получена: 11 апреля 2024. Одобрена после рецензирования: 8 августа 2024. Принята к публикации: 21 августа 2024.

Received: 11 April 2024. Revised: 8 August 2024. Accepted: 21 August 2024.