

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ОДНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ LUMINAL A ПОДТИПА

Е.О. Шамшурина¹, А.С. Могиленских², Е.В. Гребенюк³,
С.В. Сазонов⁴, С.М. Демидов⁵

¹⁻⁵ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

²⁻⁴ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

¹ elshamshurina@gmail.com

² annasajler@yandex.ru

³ ev.grebenyuk9@yandex.ru

⁴ ssazonov@yandex.ru

⁵ professordemidov@yandex.ru

Аннотация

Введение. Несмотря на значительные достижения в области создания стабильных клеточных линий, в последнее время акцент исследований смещается в сторону создания первичных клеточных культур, полученных непосредственно из образца опухоли пациентов, которые включают в себя как клетки опухоли, так и клетки микроокружения. **Цель исследования** — сравнить морфологические характеристики клеток образца карциномы молочной железы при культивировании на протяжении трех пассажей. **Материалы и методы.** Материал для исследования был получен в ходе хирургического вмешательства у пациентки с диагнозом «карцинома молочной железы». Из образца опухоли получали срезы, которые готовили по стандартному гистологическому протоколу и окрашивали моноклональными антителами к рецепторам эстрогенов, прогестерона, Ki-67, Her2/neu. Ядра клеток докрашивали гематоксилином. Иммуногистохимическая реакция осуществлялась в автостейнере DAKO (Дания). Часть материала помещали в раствор Хэнкса с 5% антибиотиков-антимикотиков и доставляли в Лабораторию клеточных культур, где после проведения стандартного протокола получения клеточной культуры опухолевые клетки разводили в питательной среде Mammocult и помещали в культуральные флаконы. Для морфологической оценки клетки окрашивали по Паппенгейму. Для иммуноцитохимического анализа при определении принадлежности клеток к эпителиоцитам с использованием антитела anti-Pan Keratin Primary Antibody. Подсчет количества клеток осуществлялся в автоматическом счетчике TC20, контроль за ростом культуры проводился с помощью микроскопа Eclipse TS100, Nikon (Япония). **Результаты и обсуждение.** На основании иммуногистохимического исследования образец опухоли отнесен к Люминальному-А подтипу. В ходе исследования выделено несколько групп клеток, которым дана цитологическая оценка. Результаты иммуноцитохимического анализа культивированных клеток подтверждают сохранение опухолевыми клетками эпителиального фенотипа в процессе культивирования. Несмотря на проявление клеточного полиморфизма в культуре клеток КМЖ, на протяжении трех пассажей культивируемые опухолевые клетки сохраняют эпителиальную природу и проявляют тенденцию к формированию монолоя. **Заключение.** Детальное изучение цитоморфологии и иммуноцитологических характеристик культивируемых клеток различных иммуногистохимических подтипов КМЖ поможет оценивать основные закономерности процесса жизнедеятельности опухолевых клеток in vitro и позволит более дифференцированно подходить к созданию персонифицированных клеточных культур с целью отработки направленности химиотерапевтического воздействия на опухоли конкретных пациентов.

Ключевые слова: карцинома молочной железы, Люминальный А подтип, первичная клеточная культура, цитология, иммуногистохимия.

Для цитирования: Цитологическая оценка одной культуры клеток карциномы молочной железы Luminal A подтипа / Е. О. Шамшурина, А. С. Могиленских, Е. В. Гребенюк [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 75-81. – <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2021-20-5-75-81>.

© Шамшурина Е.О., Могиленских А.С., Гребенюк Е.В., Сазонов С.В., Демидов С.М., 2021

CYTOLOGICAL EVALUATION OF A SINGLE CELL CULTURE OF LUMINAL A SUBTYPE BREAST CARCINOMA CELLS

E.O. Shamshurina ¹, A.S. Mogilenskikh ², E.V. Grebenyuk ³,
S.V. Sazonov ⁴, S.M. Demidov ⁵

¹⁻⁵ Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

²⁻⁵ Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russia

¹ elshamshurina@gmail.com

² annasajler@yandex.ru

³ ev.grebenyuk9@yandex.ru

⁴ ssazonov@yandex.ru

⁵ professordemidov@yandex.ru

Abstract

Introduction. Despite significant advances in the creation of stable cell lines, the focus of research has recently shifted toward the creation of primary cell cultures derived directly from patient tumor samples, which include both tumor cells and microenvironmental cells. **The aim of the study** was to compare the morphological characteristics of the cells of a breast carcinoma sample when cultured over three passages. **Materials and methods.** Material for the study was obtained during surgical intervention in a patient diagnosed with breast carcinoma. Slices were prepared from the tumor sample according to the standard histological protocol and stained with monoclonal antibodies to estrogen, progesterone, Ki-67, Her2/neu receptors. Cell nuclei were stained with hematoxylin. Immunohistochemical reaction was performed in DAKO autostainer (Denmark). Part of the material was placed in Hanks' solution with 5% antibiotic antimycotics and delivered to the Cell Culture Laboratory, where after performing the standard protocol for obtaining cell culture, tumor cells were diluted in Mammocult nutrient medium and placed in culture vials. For morphological evaluation, cells were stained by Pappenheim. For immunocytochemical analysis in determining the belonging of cells to epithelial cells using anti-Pan Keratin Primary Antibody antibody. The number of cells was counted in an automatic TC20 counter, and culture growth was monitored using an Eclipse TS100 microscope, Nikon (Japan). **Results and Discussion.** On the basis of immunohistochemical study, the tumor sample was classified as Luminal-A subtype. During the study several groups of cells were isolated and cytologically evaluated. The results of immunocytochemical analysis of the cultured cells confirm that the tumor cells retained their epithelial phenotype during culturing. In spite of the manifestation of cell polymorphism in BML cell culture, during three passages the cultured tumor cells retained their epithelial nature and showed a tendency to form a monolayer. **Conclusion.** A detailed study of cytomorphology and immunocytological characteristics of cultured cells of different immunohistochemical PBMC subtypes will help to evaluate the main regularities of tumor cell vital functions in vitro and allow a more differentiated approach to the creation of personalized cell cultures in order to develop a targeted chemotherapeutic effect on tumors of specific patients.

Keywords: breast carcinoma, Luminal A subtype, primary cell culture, cytology, immunohistochemistry.

For citation:

Cytological evaluation of a single cell culture of Luminal A subtype breast carcinoma cells / E. O. Shamshurina, A. S. Mogilenskikh, E. V. Grebenyuk [et al.] // Ural medical journal. – 2021. – Vol. 20 (5) / – P. 75-81. – <http://doi.org/10.52420/2071-5943-2021-20-5-75-81>.

ВВЕДЕНИЕ

Карцинома молочной железы (КМЖ) продолжает оставаться лидером в структуре смертности женского населения во всем мире и включает сложную и разнообразную группу новообразований, которые классифицированы по различным молекулярно-биологическим подтипам для определения прогноза течения заболевания и чувствительности клеток опухоли к различным видам лекарственной терапии. Выделяют пять подтипов: Luminal A, Luminal B, Luminal B (HER2+), HER2-overexpression, Basal-like [1].

В качестве универсальных моделей для проведения фундаментальных исследований in vitro молекулярных, клеточных механизмов роста опухоли, анализа активности лекарственных препаратов, оценки подходов к диагностике, лечению, профилактике онкологических заболеваний выступают стабильные клеточные линии [2]. Кол-

лекция иммортализованных клеточных линий постоянно обновляется и в настоящее время насчитывает свыше 50 различных вариантов культур, характеризующих разные подтипы КМЖ [3].

Однако данное заболевание имеет высокую степень гетерогенности, что усложняет создание модели in vitro, полностью соответствующей фенотипу опухоли за счет высокой вероятности появления молекулярных и генетических изменений в опухолевых клетках при большом количестве пассажей [4]. Результаты исследования различных клеточных линий, выращенных in vitro или in vivo, показали, что эти линии имеют большее сходство друг с другом, чем с клиническими образцами, которые они должны моделировать [5].

Несмотря на значительные достижения в области создания стабильных иммортализованных клеточных линий, в настоящее время акцент исследователей смещается в сторону создания

первичных клеточных культур, которые включают в себя как клетки опухоли, так и клетки микроокружения (фибробласты, Т-клетки, клетки эндотелия сосудов), играющие определенные роли в физиологии, структуре и функциях опухоли [6, 7]. Более того, в ряде исследований документально подтверждены сходства и различия между клеточными линиями рака груди и первичными опухолями на уровне экспрессии генов [8, 9], количества копий ДНК [8] и ответа на лекарственную терапию [10].

На сегодняшний день первичная культура опухолевых клеток наряду с неоспоримыми достоинствами имеет и ряд недостатков [11], к которым относятся потеря эпителиальной природы клеток при диссоциации [12], генетический дрейф при длительном поддержании культуры [13], технические сложности при ее создании, вызванные недостаточным воспроизведением элементов микроокружения опухоли и наличия большого количества фибробластов в образцах опухолей, которые быстро приспосабливаются к условиям *in vitro* и размножаются быстрее, чем эпителиальные клетки [14].

С развитием клеточных технологий предлагается все больше вариантов решения проблем, возникающих при создании первичных культур опухолевых клеток. Так, предложены новые пути диссоциации культуры [15], подбор и использование специальных обогащенных питательных сред [16, 17], использование специфических покрытий, способных поддерживать стабильный рост популяции опухолевых клеток [18, 19, 20], что приводит к получению первичных опухолей с доказанной эпителиальной природой [21, 22].

В диагностике КМЖ большое значение имеет цитологическое исследование опухолевых клеток [23], описание морфологии первичных клеточных культур, полученных от пациентов с различными молекулярно-генетическими подтипами опухоли [24, 25], сравнительный анализ клеток в культурах при различных пассажах [26, 27], изучение реакции культивируемых клеток на воздействие химическими препаратами [28, 29].

Кроме того, в процессе исследования первичных культур огромное значение имеет изучение пролиферативных процессов клеток в культуре, состояние их рецепторного статуса [30], роль и влияние процессов эпителио-мезенхимального перехода на морфологическое и функциональное состояние опухолевых клеток при культивировании [31].

Цель исследования — сравнить морфологические характеристики клеток образца карциномы молочной железы при культивировании на протяжении трех пассажей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал был получен в ходе хирургического вмешательства у пациентки с диагнозом «карцинома молочной железы». Критериями включения образца в исследование явились наличие диагноза «карцинома молочной железы» справа (T2. N0. M0) и добровольное информированное согласие, подписанное пациенткой.

Из образца опухоли получали срезы, которые готовили по стандартному гистологическому протоколу и окрашивали моноклональными антителами к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, Dako, Дания), рецепторам прогестерона (клон PgR636, Dako, Дания), Ki-67 (клон MIB-1, Dako, Дания),

Her2/neu (клон 4B5, Ventana, США). Ядра клеток докрашивали гематоксилином. Иммуногистохимическая реакция осуществлялась в автостейнере DAKO (Дания). Уровень экспрессии рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR) оценивался по шкале от 0 до 8 баллов [1], которая учитывает как количество клеток, ядра которых экспрессируют рецепторы ER и PR, так и степень экспрессии. Уровень пролиферативной активности клеток оценивали по ядерному индексу пролиферации опухолевых клеток — Ki-67, который в процентном соотношении выражает число положительно окрашенных ядер опухолевых клеток от общего количества подсчитанных клеток.

Часть материала помещали в раствор Хэнкса с 5% антибиотиков-антимикотиков и доставляли в Лабораторию клеточных культур. После механического измельчения гомогенную массу образцов помещали в среду для диссоциации (ферменты коллагеназа-гиалуронидаза, DMEM-F12) и инкубировали 16 часов в отсутствие 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). Полученный осадок растворяли в диспазе и ДНКазе, вновь центрифугировали, после чего разводили клеточный осадок в питательной среде Mammocult и помещали в культуральные флаконы. Для пересева клеточную культуру диссоциировали в трипсине, часть высаживали на предметные стекла в чашки Петри. Для морфологической оценки клетки окрашивали по Паппенгейму.

Для иммуноцитохимического анализа 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 эпителиоцитам с использованием антитела anti-Pan Keratin (AE1/AE3/PCK26) Primary Antibody (Roche diagnostics, USA) проводили демаскировку с помощью 0,01% раствора Тритона X-100 (10 минут), трипсином (10 минут), для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 1% растворе эмбриональной бычьей сыворотки. Подсчет количества клеток осуществлялся в автоматическом счетчике TC20, контроль за ростом культуры проводился с помощью микроскопа Eclipse TS100, Nikon (Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

По итогам иммуногистохимического исследования образца КМЖ выявлена экспрессия рецепторов эстрогена (ER) — 20 баллов, прогестерона (PR) — 70 баллов, Ki-67 — 10%, амплификация гена HER2 отсутствует. Согласно классификации иммуногистохимических подтипов КМЖ данный образец относится к Люминальному А подтипу [32].

Морфологическое исследование культивируемых клеток образца на протяжении трех пассажей показали, что в исследуемых культурах выявляются несколько типов клеток (рис. 1).

В культуре первого пассажа (P1) присутствуют следующие типы клеток:

Первый тип — мелкие (4-6 мкм) округлые клетки, с четкими границами. Ядро плотное, гиперхромное, занимает значительную часть цитоплазмы, которая представлена узким гомогенным

ободком. Эти клетки лежат в основном отдельно, но встречаются группы из нескольких клеток без плотных контактов между ними.

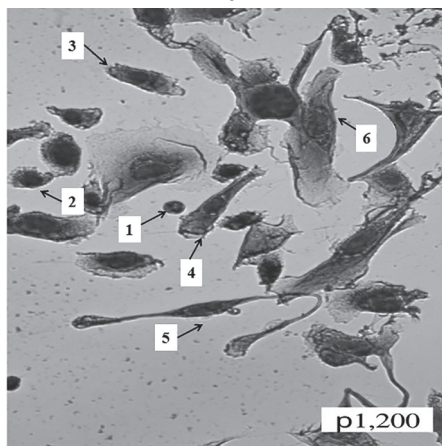


Рис. 1. Морфология клеток культуры карциномы молочной железы 1 пассажа (P1). 1 — первый тип, 2 — второй тип, 3 — третий тип, 4 — четвертый тип, 5 — пятый тип, 6 — шестой тип. Световая микроскопия, окрашивание по Паппенгейму, ув. 200

Второй тип — округлые, овальные клетки средних размеров (10-12 мкм) с неровными границами, обусловленными выпячиваниями плазмолеммы. Ядро крупное, центрально расположенное, рисунок хроматина неравномерный, определяется ядрышко. Эндоцитоплазма этих клеток плотная, темноокрашена, содержит гранулы. Эктоцитоплазма светлая, пенистая, с большим количеством вакуолей. Клетки лежат как отдельно, так и образуют группы из 3-5 клеток, достаточно плотно прилежащих друг к другу с небольшим количеством межклеточного пространства.

Третий тип — отросчатые клетки средних размеров, имеющих много вытягивающихся выростов по всей поверхности. Ядро светлое, глыбки мелкодисперсного хроматина распределены равномерно, хорошо определяется ядрышко. Эндоцитоплазма вакуолизирована, светлая пенистая, эктоцитоплазма более гомогенная. Эти клетки лежат отдельно, без тенденции к слиянию.

Четвертый тип — фибробластоподобные, средних (12-14 мкм) и крупных (16-18 мкм) размеров клетки с нечеткими границами. Имеют один тонкий, длинный отросток, а на противоположном полюсе и латерально по поверхности — толстые широкие выпячивания, заполненные светлой пенистой эктоцитоплазмой. Ядро расположено центрально, рисунок мелкодисперсного хроматина равномерный, определяется ядрышко. Эндоцитоплазма плотная, содержит гранулы. Клетки расположены группами по 5 и более клеток, плотно контактируют отростками.

Пятый тип клеток — достаточно крупные (16-18 мкм), имеют веерообразную форму. Один отросток клетки тонкий длинный, на противоположном полюсе клетки — широкий короткий веерообразный отросток. Ядро расположено в центре, ближе к веерообразному выросту, овальное, рисунок хроматина равномерный, определяется ядрышко. Эндоцитоплазма плотная, темноокрашена, содержит гранулы, эктоцитоплазма (в веерообразном выпячивании) светлая, пенистая, с большим количеством крупных вакуолей. Клетки лежат отдельно и группами, в которых контактируют отростками.

Шестой тип — гигантские (20-30 мкм) распластаные клетки с неровными, но четкими границами, с широкими короткими выпячиваниями цитоплазмы. Ядро расположено эксцентрично, глыбки хроматина крупные, плотно прилегают друг к другу, ядрышко не определяется. Эндоцитоплазма плотная, темноокрашена, содержит разного размера гранулы. Эктоцитоплазма светлая, содержит мелкодисперсные вакуоли. Среди этих клеток встречаются двухъядерные. Их количество небольшое, лежат отдельно.

Кроме того, в культуре P1 встречаются участки монослоя, состоящие из плотно прилежащих друг к другу клеток средних размеров (10-12 мкм) полигональной формы, без отростков. Границы клеток четкие, ядра светлые, видны ядрышки, цитоплазма светлая, пенистая. Периферические клетки группы вытягивают отростки (рис. 2).

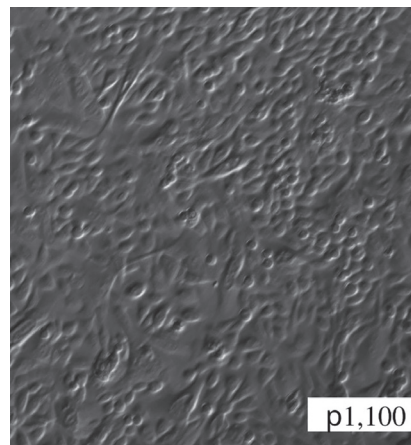


Рис. 2. Клеточная культура карциномы молочной железы, 1 пассаж (P1), световая микроскопия, нативный препарат, ув. 100

При изучении культуры на втором пассаже (P2) определились три основных типа клеток:

Первый тип — мелкие округлые клетки (4-6 мкм) с четкими границами, которые по своим морфологическим характеристикам аналогичны клеткам первого типа культуры P1.

Второй тип клеток — округлые, средних размеров (10-12 мкм) с четкими границами. Ядро округлое, расположено центрально, хроматин плотный, рисунок равномерный. Цитоплазма гомогенная, светлая, равномерно окрашена. Так же, как и клетки первого типа, лежат отдельно и группами без плотных контактов.

К третьему типу отнесены крупные (гигантские, 20-30 мкм) округлые клетки правильной формы с четкими ровными границами. Ядро занимает не более 1/3 объема цитоплазмы, расположено эксцентрично у одного из полюсов клетки. Форма ядра чаще неправильная (бобовидная, двулопастное и т.д.), глыбки мелкодисперсного хроматина расположены рыхло, ядрышко определяется редко. Цитоплазма светлоокрашенная, эндоцитоплазма более плотная, содержит небольшое количество гранул. Эктоцитоплазма более гомогенная. В этих клетках часто встречаются фигуры митоза (метафаза, телофаза), так же встречаются двухъядерные клетки.

Основную популяцию клеток культуры на третьем пассаже (P3, рис. 3) также составили лежащие отдельно или группами мелкие и средние клетки округлой формы с четкими границами.

Второй тип клеток представлен средними и крупными клетками вытянутой с обоих полюсов формы (вытянутые овалы, треугольные клетки) с четкими границами. Ядро чаще лежит центрально, в некоторых клетках смещено к одному из полюсов, контуры ядра ровные, рисунок хроматина равномерный. Цитоплазма светлая, содержит гранулы и мелкодисперсные вакуоли в эктоцитоплазме. Клетки лежат как отдельно, так и группами неправильной формы, где плотно контактируют между собой.

Третий тип составили единичные крупные (17-19 мкм) округлые клетки с четкими ровными границами. Ядро крупное, с ровными контурами, занимает половину цитоплазмы, лежит центрально, рисунок хроматина равномерный. Цитоплазма плотная, гомогенная, светлоокрашенная.

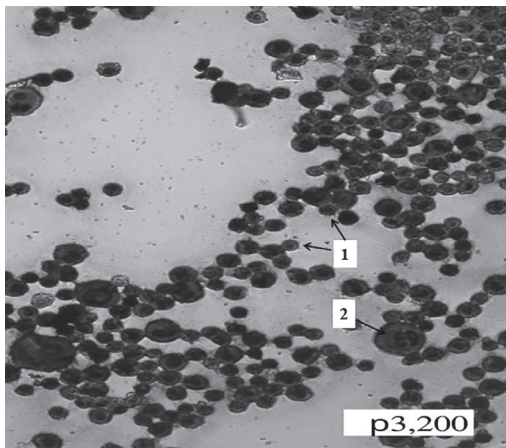


Рис. 3. Морфология клеток культуры карциномы молочной железы, третий пассаж (Р3). 1 — первый тип, 2 — второй тип. Световая микроскопия, окрашивание по Паппенгейму, ув. 200

Анализ результатов иммуноцитохимического исследования мазков клеток показал, что на всех пассажах клетки сохраняют эпителиальный фенотип (рис. 4).

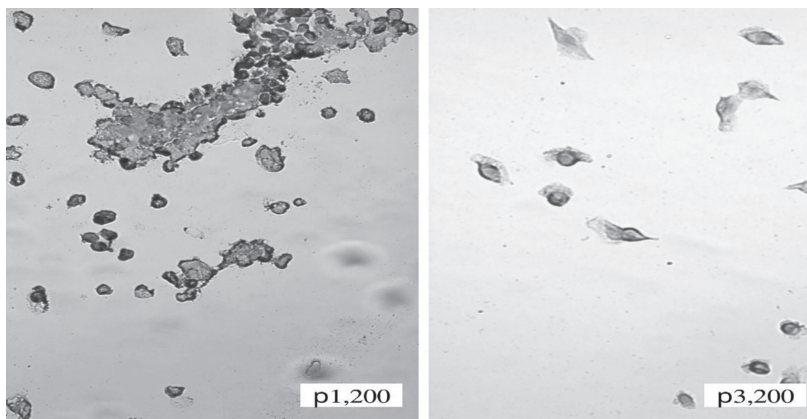


Рис. 4. Клетки КМЖ после первого и третьего пассажей клеточной культуры. Иммуноцитохимическое исследование с использованием антител к панцитокератину, ув. 200

ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время достаточно широко изучаются культуры клеток карцином молочных желез [2, 4, 8], при этом в исследованиях используются стабильные иммортализованные клеточные

линии, характеризующие разные подтипы КМЖ [3], коллекция которых постоянно обновляется. На этих моделях активно исследуется рецепторный аппарат клеток [4, 6], процесс эпителио-мезенхимального перехода, играющий ведущую роль в процессе метастазирования опухолей [8, 19], влияние лекарственных препаратов на опухолевые клетки в культуре [16, 29]. Цитоморфологические исследования культивируемых клеток более активно используются при изучении культуры фибробластов [27].

Особенностью нашей работы является пролонгированное исследование изменения морфологических характеристик культивируемых клеток карциномы молочной железы, полученных непосредственно из операционного материала, сохраняющих, по данным иммуноцитохимического исследования, эпителиальный фенотип на протяжении нескольких пассажей.

Наши исследования показали, что полиморфизм клеток культуры Р1, проявляющийся наличием различного типа выпячиваний, обусловлен тенденцией опухолевых клеток к процессу формирования монослоя, сопровождающегося перемещениями клеток по стеклу, вызывающему изменение их формы, размеров. На процесс распластывания указывает появление в культуре уплотненных — овальной и вытянутой формы — клеток с последующим увеличением размеров выпячиваний цитоплазмы, а положение выпячиваний указывает на направление перемещения и распластывания клеток. Следовательно, клетки 2-5 типов можно рассматривать как переходные формы от мелких округлых клеток первого типа к гигантским распластанным клеткам. Следует также отметить, что эктоцитоплазма всех типов клеток, за исключением мелких клеток первого типа, содержит многочисленные вакуоли разного размера, что, очевидно, связано с «обводнением» клеток, находящихся в культуральной среде, при их перемещении и увеличении объема цитоплазмы.

Смена культуральной среды всегда является стрессовым фактором для клеток культуры, что приводит к их инактивации и приобретению лимфоцитоподобного фенотипа. Но при каждом пассаже наблюдается различное время для восстановления клеточной активности. Так, при исследовании культуры Р2 активность передвижения клеток была снижена, но на этом пассаже клетки активнее вступали в пролиферацию, что подтверждается наличием в культуре клеток третьего типа, находящихся на разных стадиях митотического цикла, а наличие двухъядерных клеток может свидетельствовать о незавершенном процессе цитотомии на момент исследования.

На третьем пассаже клетки вновь обретают активность к передвижению и распластыванию, что подтверждается наличием уплотненных клеток второго типа и появление в культуре крупных распластанных клеток без признаков активности пролиферативных процессов, а также плотных участков монослоя (рис. 5).

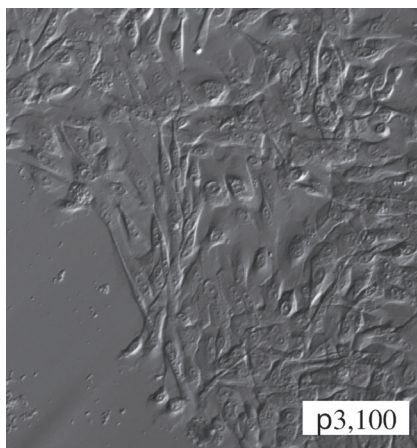


Рис. 5. Клеточная культура карциномы молочной железы, 3 пассажа (Р3), световая микроскопия, нативный препарат, ув. 100

При оценке роста культуры клеток можно наблюдать участки плотного монослоя на всех пассажах, который к третьему пассажу сформирован более плотно клетками округлой, треугольной, веретенновидной формы.

Мы полагаем, что детальное изучение цитоморфологии и иммуноцитологических характеристик культивируемых клеток различных иммуногистохимических подтипов КМЖ позволит исследователям более дифференцированно подходить к созданию персонифицированных клеточных культур с целью отработки направленности химиотерапевтического воздействия на опухоли конкретных пациенток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на проявление клеточного полиморфизма при культивировании клеток КМЖ, на протяжении трех пассажей клетки данного образца сохраняют эпителиальную природу и проявляют тенденцию к формированию монослоя.

Данные исследования помогают оценивать основные процессы жизнедеятельности опухолевых клеток *in vitro* и имеют большое значение для отработки методики создания персонифицированных моделей опухолевых клеток с целью определения эффективности цитотоксического действия химиопрепаратов и создания индивидуального подхода к стратегии лечения пациенток с разными иммуногистохимическими подтипами КМЖ.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Сазонов С. В. Обеспечение качества молекулярно-биологического исследования при диагностике инвазивного рака молочной железы : монография. – Екатеринбург : ВУМАН, 2018. 152 с.
2. Галимова Э. С., Галагудза М. М. Двухмерные и трехмерные модели культур клеток опухолей *in vitro*. Преимущества и недостатки // Бюллетень сибирской медицины. – 2018. 17 (3). С.188-196.
3. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes / Neve RM [et al.] // Cancer Cell. 2006. 10 (6). С. 515-27.
4. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение / Т.С. Геращенко [и др.] // Биохимия. 2013. Т.78, № 11. С.1531-1549.
5. Establishment and Characterization of a New Triple Negative Breast Cancer Cell Line from an Iranian Breast Cancer Tissue / F.Ghaderi [et al.] // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2019. Vol. 20(6). P. 1683-1689.
6. Hanahan D., Coussens L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment // Cancer Cell. 2012. Vol. 21(3). P. 309-22.
7. Могиленских А. С., Сазонов С. В. Создание клеточных линий карциномы молочной железы // Гены и Клетки. 2021. Т. 16., № 1. С. 15-23.
8. Primary culture of breast cancer: a model system for epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells/ T. Nishikata [et al.] // Anticancer Res. 2013. 33(7). С. 2867-73.
9. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery / J. Kao [et al.] // PloS one. 2009. Vol. 4. e6146.
10. Subtype and pathway specific responses to anticancer compounds in breast cancer / L.M. Heiser [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012. Vol.109. P.2724-9.
11. Могиленских А. С., Сазонов С. В., Демидов С. М. Оценка влияния различных условий культивирования на рост первичной клеточной культуры карциномы молочной железы // Современная медицина новые подходы и актуальные исследования : сборник материалов международной научно-практической конференции, посвященной 30-летию юбилею Медицинского института ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет» / под ред. М. Р. Нахаева. – Изд-во ГЧГУ, 2020. – С.508-514.
12. ROCK Inhibitor and Feeder Cells Induce the Conditional Reprogramming of Epithelial Cells / S. Liu [et al.] // The American Journal of Pathology. 2015. Vol.180 (2). P. 599-607.
13. Mitra A., Mishra L., Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy // Trends Biotechnol. 2013. Vol. 31(6). P. 347-54.
14. Freshney R. I. Induction of differentiation in neoplastic cells // Anticancer Res. 1985. Vol 5(1). P.111-30.
15. Могиленских А. С., Седнева-Луговец Д. А. Сравнение роста первичной культуры карциномы молочной железы в различных условиях для культивирования // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения : Материалы V Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной 75-летию Победы в Великой Отечественной войне, 90-летию УГМУ и 100-летию медицинского образования на Урале. – Екатеринбург : Изд-во ФГБОУ ВО УГМУ, 2020. – с.128-132.
16. Нуштаева А. А. Культуры онкотрансформированных клеток молочной железы и эндометрия для изучения опухолевой прогрессии и разработки терапевтических подходов : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.03. – Новосибирск, 2019. – 171с.
17. Роль экстрацеллюлярного матрикса в патогенезе опухолей молочной железы / А. В. Летуновская, Д. А. Олейников, О. Я. Порембская, Я. Г. Торопова // Цитология. – 2020. – Т.62, № 2. – С.98-111.
18. Могиленских А. С., Сазонов С. В., Демидов С. М. Оптимизация условий культивирования первичной карциномы молочной железы человека: сборник научных докладов VI Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2020». – Санкт-Петербург : Изд-во АННО «Вопросы онкологии», 2020. – С. 98.
19. Primary culture of squamous head and neck cancer with and without 3T3 fibroblasts and effect of clinical tumor characteristics on growth *in vitro* / M. A. Cobleigh [et al.] // Cancer. – 1987. Vol. 59 (10). P. 1732-8.
20. Selective culture of epithelial cells from primary breast carcinomas using irradiated 3T3 cells as feeder layer / C. S. Wang [et al.] // Pathol. Res. Pract. – 2001. Vol. 197(3). P. 175-81.

21. Efficient and simple approach to in vitro culture of primary epithelial cancer cells / K. Janik [et al.] // Biosci Rep. 2016. Vol. 36 (6). e00423.
22. Large expansion of morphologically heterogeneous mammary epithelial cells, including the luminal phenotype, from human breast tumours. / L. Krasna [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. 2002. Vol.71 P. 219-35.
23. Волченко Н. Н., Полонская Н. Ю. Цитологический метод в диагностике опухолей и опухолеподобных процессов // Новости клинической цитологии России. – 2018. – Т.22, № 1-2. – С.23-29.
24. Могиленских А. С., Шамшурина Е. О. Морфологическая оценка клеток карциномы молочной железы тройного негативного подтипа в культуре // Гены и Клетки. – 2020. – Т. 15, № S3. – С. 104.
25. Опыт культивирования клеток карциномы молочной железы люминального подтипа / С. В. Сазонов [и др.] // Материалы VII межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии — практическому здравоохранению 2018» / под общей редакцией С. Л. Леонтьева. – Екатеринбург : Изд-во Вестник Уральской медицинской академической науки, 2018. – С.115-128.
26. Морфологическая характеристика клеток, полученных из образцов карциномы молочной железы разных молекулярно-биологических подтипов / А. С. Могиленских [и др.] // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения : сборник статей VI Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной году науки и технологий. – Екатеринбург : Изд-во: ФГБОУ ВО УГМУ, 2021. – С. 1201-1206.
27. Структурная динамика адгезивных клеток костного мозга при культивировании: первый пассаж (часть 2) / Н. П. Омеляненко, В. К. Ильина, А. В. Ковалев, С. А. Родионов // Гены и клетки. – 2014. – Т. IX, № 4. – С.56-62.
28. Влияние доксорубина на клетки карциномы молочной железы тройного негативного подтипа в культуре / Е. О. Шамшурина [и др.] // Вопросы морфологии XXI века. Выпуск 6. С. 205-209.
29. Оценка изменения морфологических и иммуногистохимических характеристик карцином молочной железы при проведении неoadъювантной системной терапии / В. О. Башлык [и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2018. – Т.14, № 8. – С.12-19.
30. 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. – Т.12 (4). – С.76-81.
31. Сазонов С. В., Казанцева Н. В., Коньшев К. В. Проявления эпителиально-мезенхимального перехода при трижды негативном раке молочной железы // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – Т.5, № S4. – С. 77.
32. Клинические рекомендации РООМ по диагностике и лечению рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов [и др.]. – Санкт-Петербург : Издательский дом «АБВ-пресс», 2015. – 504 с.

Сведения об авторах

Елена Олеговна Шамшурина — кандидат медицинских наук, доцент
 Анна Сергеевна Могиленских — аспирант
 Екатерина Владимировна Гребенюк — аспирант
 Сергей Владимирович Сазонов — доктор медицинских наук, профессор
 Сергей Михайлович Демидов — доктор медицинских наук, профессор

Information about the authors

Elena O. Shamshurina — MD, Associate Professor
 Anna S. Mogilenskikh — Postgraduate student
 Ekaterina V. Grebenyuk — Postgraduate student
 Sergej V. Sazonov — Doctor of Science (Medicine), Professor
 Sergej M. Demidov — Doctor of Science (Medicine), Professor

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
 The authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 11.10.2021; одобрена после рецензирования 27.10.2021; принята к публикации 08.11.2021.
 The article was submitted 11.10.2021; approved after reviewing 27.10.2021; accepted for publication 08.11.2021.