

Для цитирования: Алифанов В.В., Третьякова М.С., Григорьева Е.С., Булдаков М.А., Таширева Л.А., Колегова Е.С., Андрюхова Е.С., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Характеристика стволовых признаков EpCAM-негативных и EpCAM-позитивных опухолевых клеток в первичной опухоли, 2D- и 3D-культурах при раке молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2024; 23(5): 59–72. – doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-5-59-72

For citation: Alifanov V.V., Tretyakova M.S., Grigoryeva E.S., Buldakov M.A., Tashireva L.A., Kolegova E.S., Andryuhova E.S., Zavyalova M.V., Denisov E.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Characteristics of stem sings of EpCAM-negative and EpCAM-positive tumor cells in primary tumor and 2D and 3D cultures in breast cancer. Siberian Journal of Oncology. 2024; 23(5): 59–72. – doi: 10.21294/1814-4861-2024-23-5-59-72

ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ ПРИЗНАКОВ ЕРСАМ-НЕГАТИВНЫХ И ЕРСАМ-ПОЗИТИВНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ, 2D- И 3D-КУЛЬТУРАХ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В.В. Алифанов¹, М.С. Третьякова¹, Е.С. Григорьева¹, М.А. Булдаков¹,
Л.А. Таширева¹, Е.С. Колегова¹, Е.С. Андрюхова¹, М.В. Завьялова^{1,2},
Е.В. Денисов¹, Н.В. Чердынцева¹, В.М. Перельмутер¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

Аннотация

Одним из предикторов неблагоприятного прогноза при раке молочной железы (РМЖ) считается гиперэкспрессия белка EpCAM. Однако значительная доля опухолевых клеток либо слабо экспрессирует, либо вовсе не экспрессирует мембранный EpCAM. Молекулярная характеристика и способность к росту в 2D- и 3D-культурах, косвенно отражающие метастатический потенциал опухолевых клеток без экспрессии EpCAM, исследованы недостаточно. **Цель исследования** – сравнение фенотипических вариантов стволовых клеток и проявлений эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в зависимости от экспрессии EpCAM в первичной опухоли молочной железы и при культивировании в 2D и 3D. **Материал и методы.** В исследование включено 7 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа (люминальный А и люминальный В HER2-негативный подтип). Пациентки не получали неoadъювантной химиотерапии. В первичной опухоли и после 2D- и 3D-культивирования проводилось фенотипирование клеток методом проточной цитофлуориметрии с использованием антител против CD45, EpCAM (CD326), CK7/8, CD44, CD24, N-cadherin (CD325), ALDH и CD133. **Результаты.** Все фенотипические варианты коэкспрессии маркеров стволовости CD44, CD24, CD133 и ALDH присутствовали как в первичной опухоли, так и в 2D- и 3D-культурах. Стволовые клетки имели признаки как эпителиальных, так и гибридных фенотипов ЭМП. В первичных опухолях, 2D- и 3D-культурах наименьшую долю составляли стволовые клетки с фенотипом CD44+CD24- и клетки с коэкспрессией CD44+CD24- с другими маркерами стволовости, наибольшую – стволовые клетки с фенотипами ALDH+ и ALDH+CD133+. Отмечалась выраженная внутри- и межопухолевая фенотипическая гетерогенность клеток первичных опухолей, 2D- и 3D-культур. **Заключение.** Результаты свидетельствуют о том, что опухолевые клетки люминального молекулярно-биологического подтипа РМЖ, не экспрессирующие EpCAM, способны, как и EpCAM-положительные, проявлять различные фенотипические варианты стволовости и ЭМП в первичной опухоли и при культивировании в 2D- и в 3D-культурах. В большинстве случаев в одной опухолевой клетке наблюдается коэкспрессия нескольких маркеров стволовости. Фенотипический состав первичных опухолей, 2D- и 3D-культур характеризуется выраженной внутри- и межперсональной гетерогенностью.

Ключевые слова: рак молочной железы, EpCAM, стволовость, ЭМП, 2D- и 3D-культуры.

CHARACTERISTICS OF STEM SINGS OF EPCAM-NEGATIVE AND EPCAM-POSITIVE TUMOR CELLS IN PRIMARY TUMOR AND 2D AND 3D CULTURES IN BREAST CANCER

V.V. Alifanov¹, M.S. Tretyakova¹, E.S. Grigoryeva¹, M.A. Buldakov¹,
L.A. Tashireva¹, E.S. Kolegova¹, E.S. Andryuhova¹, M.V. Zavyalova^{1,2},
E.V. Denisov¹, N.V. Cherdyntseva¹, V.M. Perelmuter¹

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences
5, Kooperativny St., Tomsk, 634009, Russia

²Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia
2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

Abstract

One of the predictors of adverse prognosis in breast cancer is the overexpression of the EpCAM protein. However, a significant part of tumor cells have low or no EpCAM expression. The molecular features and the ability to grow in 2D and 3D cultures, indirectly reflecting metastatic potential of tumor cells without EpCAM expression, have not been sufficiently studied. **The aim of the study** was to compare phenotypic variants of stem cells and EMT depending on the EpCAM expression in the primary tumor of breast cancer and 2D and 3D cultures. **Material and Methods.** The study included 7 patients with invasive breast carcinoma of no special type. Luminal A subtype was found in 2/7 patients (29 %), and luminal B HER2-negative molecular subtype was found in 5/7 patients (71 %). The patients didn't have neoadjuvant chemotherapy. Cells from the primary tumor were cultured in 2D and 3D. The primary tumor cells, 2D and 3D cultures were phenotyped using flow cytometry with antibodies targeting: CD45, EpCAM (CD326), CD44, CD24, N-cadherin (CD325), and CD133, CK7/8, EpCAM (CD326). **Results.** No significant differences were found in the frequency of detection and the number of cells exhibiting stem cell features among EpCAM- and EpCAM+ tumor cells, 2D and 3D cultures. All phenotypic variants of co-expression of stemness markers CD44, CD24, CD133, and ALDH were present both in the primary tumor and 2D/3D cultures. Stem cells in mammospheres had features of both epithelial and hybrid EMT phenotypes. In primary tumors and 2D/3D cultures, the smallest proportion consisted of stem cells with the CD44+CD24- phenotype and cells co-expressing CD44+CD24- with other stemness markers, while the largest proportion comprised stem cells with ALDH+ and ALDH+CD133+ phenotypes. Marked intra- and inter-tumor heterogeneity in the phenotypic composition of primary tumors, 2D, and 3D cultures was noted. **Conclusion.** The results indicate that EpCAM-negative and EpCAM-positive tumor cells of luminal molecular subtype of breast cancer are capable of exhibiting various phenotypic variants of stemness and EMT in the primary tumor and 2D and 3D cultures. In most cases, individual tumor cells show co-expression of several stemness markers. The phenotypic composition of primary tumors, 2D and 3D cultures is characterized by pronounced intra- and inter-tumor heterogeneity.

Key words: breast cancer, EpCAM, stemness, EMT, 2D and 3D cultures.

Введение

К настоящему времени одним из предикторов неблагоприятного прогноза при многих видах карцином считается гиперэкспрессия молекулы клеточной адгезии эпителия (Epithelial cell adhesion molecule; EpCAM). При этом молекулярная характеристика, биологические потенции и клиническое значение опухолевых клеток без экспрессии EpCAM исследованы недостаточно. EpCAM является многофункциональным трансмембранным белком, участвующим в регуляции клеточной адгезии, пролиферации, миграции, стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) клеток карциномы [1]. Участвуя в развитии ЭМП, EpCAM взаимодействует с N-cadherin, находясь с ним в обратной корреляционной связи [2]. Прогностическая ценность экспрессии EpCAM зависит от нозологической формы злокачественной опухоли.

При раке молочной железы (РМЖ) высокая экспрессия EpCAM в первичной опухоли связана с плохим прогнозом [1]. Неблагоприятное течение и исход опухолевой болезни во многом ассоциированы с приобретением опухолевыми клетками стволовых свойств и их способностью к ЭМП. Имеются данные, что высокий уровень экспрессии EpCAM коррелирует с признаками стволовости и с приобретением плюрипотентности при репрограммировании соматических клеток [3, 4].

Способность опухолевых клеток к культивированию в двухмерных (2D) и трехмерных (3D) культурах косвенно отражает их метастатический потенциал [5]. Преимуществом и недостатками 2D- и 3D-культур анализируются в обзоре M.A.G. Barbosa et al. [6]. Формирование сфероидов/маммосфер считается признаком, указывающим на наличие стволовых свойств [7]. Однако позитивность не-

Таблица 1/Table 1

Клинико-патологические характеристики пациенток
Clinical and pathological characteristics of patients

Параметры/Parameters		Пациентки (n=7)/Patients (n=7)
Средний возраст, лет/Average age, age		60 (53:65)
Менопауза/Menopause		5 (71,4 %)
Стадия опухоли/Stage of tumor	T1	2 (28,6 %)
	T2	5 (71,4 %)
	N0	3 (42,9 %)
	N1	4 (56,1 %)
Размер опухоли, мм/Tumor size, mm		24,5 (21:26,25)

Примечание:таблица составлена авторами.

Note: created by the authors.

которых стволовых маркеров в клетках не всегда коррелирует с их способностью образовывать сфероиды/маммосферы [8–10]. Представляет интерес, насколько отличаются стволовые свойства опухолевых клеток РМЖ, не экспрессирующих ЕрСАМ, от экспрессирующих и как они меняются в 2D- и 3D-культурах.

Цель исследования состояла в сравнении фенотипических вариантов стволовых клеток и проявлений ЭМП в зависимости от экспрессии ЕрСАМ в первичной опухоли молочной железы, 2D- и 3D-культурах.

Материал и методы

В исследование включено 7 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа стадии T1–2N0–1M0, получавших лечение в Научно-исследовательском институте онкологии Томского НИМЦ. У 2/7 пациенток (29 %) определялся люминальный А, у 5/7 (71 %) – люминальный В HER2-негативный молекулярно-биологический подтип опухоли. Больные не получали неоадьювантной химиотерапии. Клинико-патологические характеристики пациенток приведены в табл. 1.

Материалом исследования являлась ткань первичной опухоли, полученная на хирургическом этапе лечения. Образцы первичной опухоли гомогенизировали механическим способом с применением ножниц в течение 3 мин. Далее к образцу опухоли добавляли 3 мл фосфатно-солевого буфера (Phosphate buffered saline; FBS) и центрифугировали на низких оборотах 60 g, 5 мин. Верхний слой гидрофобных частиц (адипоциты, жиры, осколки мембран) удаляли, а оставшийся надосадок отмывали в 2 мл FBS центрифугированием при 300 g 10 мин. Далее осадок ресуспендировали, и одиночные клетки были отфильтрованы с помощью фильтра 70 мкм (BD Pharmingen). Образец центрифугировали 300 g 5 мин, осадок ресуспендировали в 300 мкл среды DMEM. Количество клеток и их жизнеспособность оценивались методом проточной цитофлуориметрии. Для культивирования и

последующего фенотипирования использовались образцы с клеточностью не менее 10⁴ и долей живых клеток не менее 98 %. Для фенотипирования отбирали 50 мкл, остальной объем использовали для культивирования.

2D-культивирование проходило в иммунологических планшетах с обработанной поверхностью для улучшения адгезии клеток с добавлением среды EpiCult B (STEMCELL Technologies, Canada). Оценка апоптоза осуществлялась с помощью Аннексина-V и пропидия иодида методом проточной цитофлуориметрии (Annexin V, Alexa Fluor® 350 Conjugate, Thermo Fisher Scientific, USA) на 10–14-й день культивирования клеток в монослой. Оценивались показатели жизнеспособности, в частности доля апоптотических и некротических опухолевых клеток, культивируемых в виде монослоя. Доля живых клеток варьировала в различных образцах, составляя от 95 до 56 %. Количество клеток с признаками некроза не превышало 5 %. После культивирования популяционный состав полученного клеточного монослоя оценивался методом проточной цитофлуориметрии.

При 3D-культивировании клеток использовали иммунологические планшеты, препятствующие адгезии клеток на поверхности. В качестве питательной среды использовалась готовая среда MammoCult (STEMCELL Technologies, Canada), включающая все необходимые компоненты для формирования маммосфер (тумороидов/сфероидов). Оценка жизнеспособности клеток осуществлялась с помощью флуоресцентного витального красителя Calcein AM (Thermo Fisher Scientific, USA) на 7–9-й день культивирования маммосфер. При 3D-культивировании из 7 образцов первичной опухоли молочной железы маммосферы были получены во всех случаях. В большинстве случаев маммосферы обладали четкой и ровной структурой, имели плотную шарообразную форму и окрашивались витальным красителем Calcein AM (т.е. имели высокую жизнеспособность после культивирования 3D). Размер маммосфер составлял 200 ± 50 мкм. После визуализации маммосферы



Рис. 1. Микрофотография маммосфер клеток рака молочной железы.

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 1. Microphoto of mammospheres of breast cancer cells.
Note: created by the authors

подвергались дальнейшему фенотипированию (рис. 1).

Экспрессия маркеров в клетках первичной опухоли, 2D- и 3D-культурах оценивалась методом проточной цитофлуориметрии. Методика проведения цитофлуориметрического исследования соответствует методике, описанной в 2022 г. В.М. Перельмутером с соавт. [11]. На поверхностном этапе использовались антитела: APC-Cy7-анти-CD45 (клон HI30, мышиные IgG1, Sony Biotechnology), BV 650-анти-EpCAM (клон 9C4, мышиные IgG2b, Sony Biotechnology), PE-Cy7-

анти-N-cadherin (клон 8C11, мышиные IgG1, Sony Biotechnology), BV 510-анти-CD44 (клон G44-26, мышиные IgG2b, BD Horizon), PerCP-Cy5.5-анти-CD24 (клон ML5, мышиные IgG2a, Sony Biotechnology), BV 786-анти-CD133 (клон 293C3, мышиные IgG2b, BD Pharmingen). На внутриклеточном этапе: AF647-анти-CK7/8 (клон CAM5.2, Mouse IgG2a, BD Pharmingen), BV 650-анти-EpCAM (клон 9C4, мышиные IgG2b, Sony Biotechnology) и BV421-анти-Ki67 (клон 16A8, mouse IgG2a, Sony Biotechnology). Для устранения ложноположительных результатов, вызванных с неспецифическим связыванием антител, на поверхностном и внутриклеточном этапах окрашивания образцы инкубировали с раствором, блокирующим свободные Fc-рецепторы (Human TruStain FcX, Sony Biotechnology, USA). Частицы VersaComp Antibody Capture Bead (Beckman Coulter, USA) применяли для настройки компенсации, которая позволяет учитывать только истинноположительный сигнал для каждого флуорофора. Иммунофлуоресценцию анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyt 3000 (ACEA Bio-sciences, USA). Логика гейтирования представлена на рис. 2.

Статистическую обработку проводили с помощью GraphPad Prizm9. Для сравнения частот встречаемости использовали точный критерий Фишера. Непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых переменных был использован для обнаружения разного количества клеток при культивировании. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

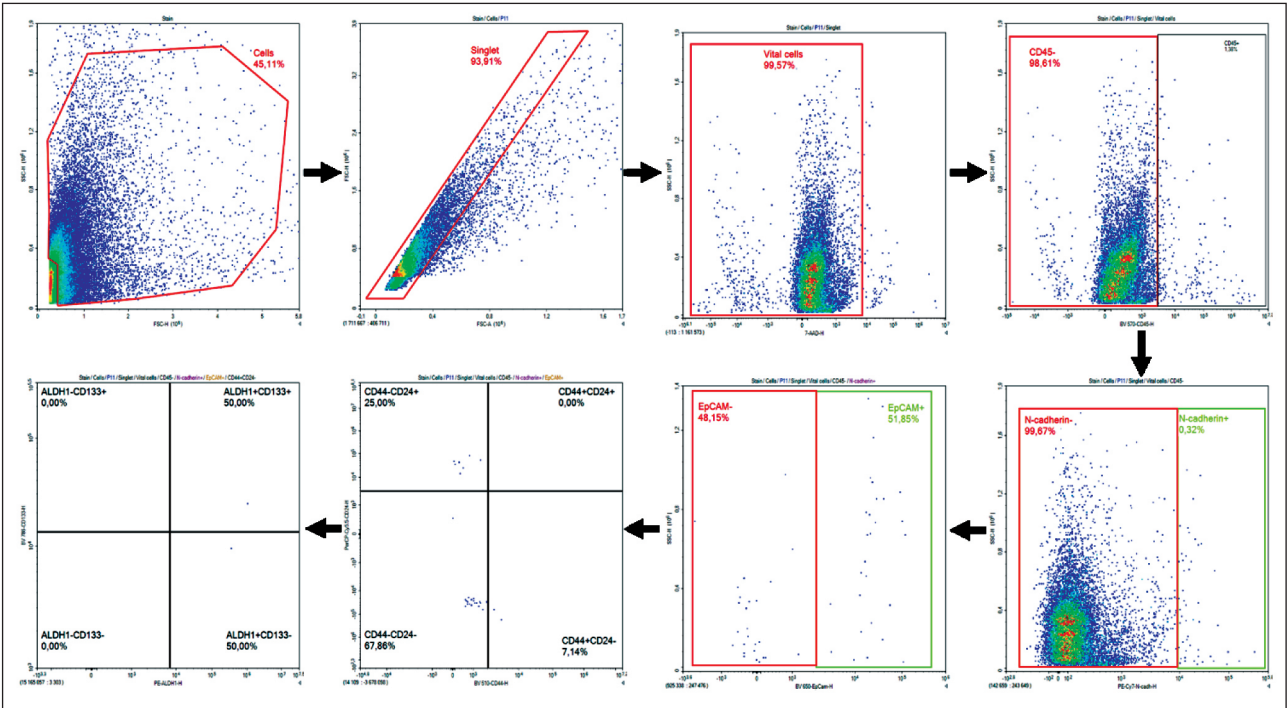


Рис. 2. Логика фенотипирования опухолевых клеток. Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 2. Logic of tumor cell phenotyping. Note: created by the authors

Результаты

В зависимости от сочетания экспрессии маркеров стволовости (CD44, CD24, CD133, ALDH) и ЭМП (ЕpCAM, CK7/8 и N-cadherin) анализировались 96 фенотипов опухолевых клеток. Определение вариантов коэкспрессии трех маркеров стволовости позволило оценить наличие стволовых клеток с фенотипами CD44+CD24-ALDH-CD133-; CD44+CD24-ALDH+CD133-; CD44+CD24-ALDH-CD133+; CD44+CD24-ALDH+CD133+; CD44+CD24+/CD44-CD24+/-ALDH-CD133+; CD44+CD24+/CD44-CD24+/-ALDH+CD133- и клеток без признаков стволовости: CD44+CD24+ALDH-CD133-, CD44- CD44-CD24+/- ALDH-CD133-.

Групповая оценка представленности клеток с разными фенотипами стволовости показала, что все варианты обнаруживаются в первичной опухоли, в 2D- и 3D-культурах. Не обнаружено значимых различий по частоте встречаемости всех исследованных фенотипов стволовых клеток между первичной опухолью и 2D-культурой, первичной опухолью и 3D-культурой, а также 2D- и 3D-культурой. В то же время выявлены различия частот встречаемости некоторых фенотипов стволовых клеток как в 2D-, так и 3D-культурах. В 2D-культуре среди клеток с фенотипом Еpcam-CK+N-cadherin стволовые клетки с фенотипом CD44+CD24-ALDH-CD133+ встречаются реже, чем с фенотипом CD44+CD24+/CD44-CD24+/-ALDH+CD133- (1/7 и 7/7 соответственно, $p=0,0047$). В 3D-культуре среди клеток с фенотипом Еpcam-CK+/-N-cadherin стволовые клетки с фенотипом CD44+CD24-ALDH+CD133 обнаруживались реже (1/7), чем с фенотипами CD44+CD24+/CD44-CD24+/-ALDH+CD133- (5/7, $p=0,0210$), CD44+CD24+/CD44-CD24+/-CD133+ALDH+ (5/7, $p=0,0210$) и CD44+CD24+/-

CD44-CD24+/-ALDH-CD133+ (6/7, $p=0,0291$). Среди клеток 3D-культур, экспрессирующих N-cadherin, также наблюдались различия: Еpcam-CK+ клетки с фенотипом стволовости CD44+CD24-ALDH-CD133+ встречались реже, чем с фенотипом CD44+CD24+/CD44-CD24+/-CD133+ALDH+ (2/7 и 6/7 соответственно, $p=0,0210$), а клетки Еpcam+ CK+/- с тем же фенотипом стволовости CD44+CD24-ALDH-CD133+ выявлялись реже, чем CD44+CD24+/CD44-CD24+/-ALDH-CD133+ клетки (2/7 и 6/7, $p=0,0210$).

Общим для указанных различий частот фенотипов стволовых клеток было то, что они касались 2D- и 3D-культур, но не первичной опухоли. Кроме этого, реже всегда встречались фенотипы стволовых клеток с разными вариантами коэкспрессии маркера стволовости CD44+CD24-, а чаще клетки с экспрессией CD133 и/или ALDH без экспрессии CD44+CD24- (рис. 3).

В каждом случае исследовался обобщенный фенотипический состав каждого из трех объектов: первичной опухоли, 2D- и 3D-культур без учета их внутриопухолевой гетерогенности или гетерогенности результатов культивирования одной и той же опухоли. Полученные результаты свидетельствуют о значительной межперсональной фенотипической гетерогенности (рис. 4).

Межперсональная гетерогенность демонстрируется результатами анализа каждого из случаев, который дал возможность оценить фенотипические варианты стволовости в клетках первичной опухоли, 2D- и 3D-культур при различных вариантах экспрессии ЕpCAM и CK7/8. Клетки со всеми вариантами сочетания экспрессии маркеров стволовости, как и клетки без экспрессии маркеров стволовости, присутствуют в 4 из 7 исследованных случаев как в первичной опухоли, так и в 2D- и 3D-

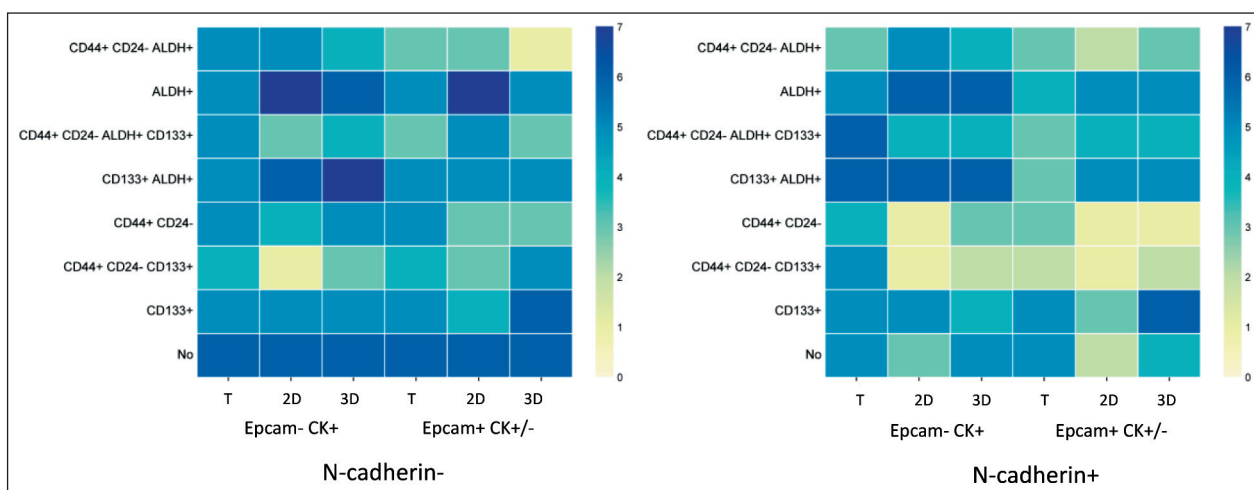


Рис. 3. Частота встречаемости опухолевых клеток с разными вариантами коэкспрессии маркеров стволовости в первичной опухоли (Т), 2D- и 3D-культурах в зависимости от мембранной экспрессии ЕpCAM и N-cadherin.

Примечание: рисунок выполнен авторами

Fig. 3. Frequency of occurrence of tumor cells with different variants of coexpression of stemness markers in the primary tumor (T), 2D and 3D cultures depending on the membrane expression of EpCAM and N-cadherin.

Note: created by the authors

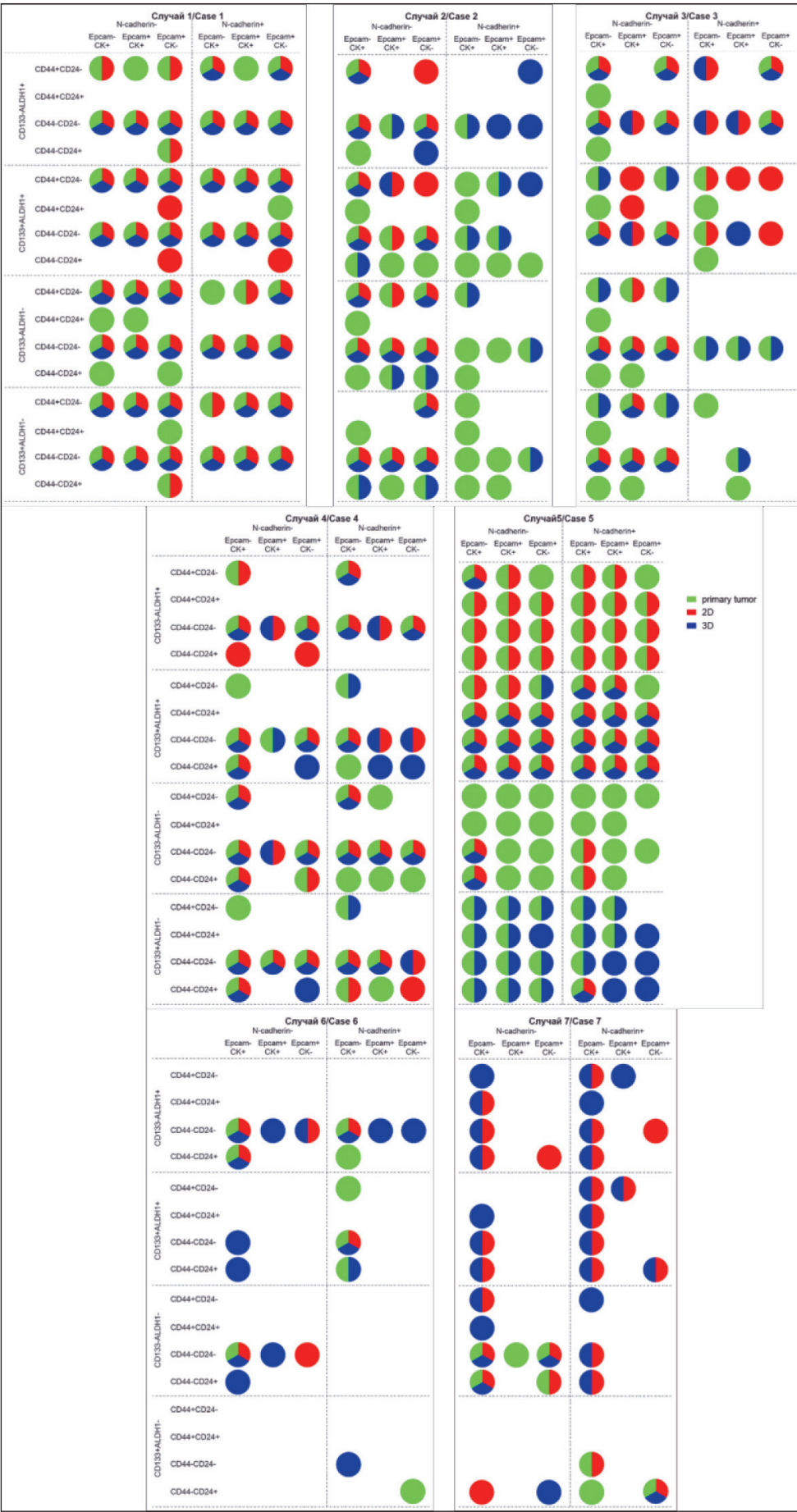


Рис. 4. Фенотипический состав первичной опухоли, 2D- и 3D-культур. Варианты стволовости. Примечания: первичная опухоль – зеленый; 2D – красный; 3D – синий; рисунок выполнен авторами

Fig. 4. Phenotypic composition of the primary tumor, 2D and 3D cultures. Variants of stemness. Notes: primary tumor – green, 2D – red, 3D – blue; created by the authors

культурах (случаи 1–4). Исключением был второй случай, в котором в 2D-культуре среди клеток, экспрессирующих N-cadherin, отсутствовали все фенотипические варианты стволовых клеток. В 5-м случае при наличии в первичной опухоли клеток со всеми вариантами коэкспрессии маркеров стволовости в 2D- и 3D-культурах наблюдается потеря некоторых фенотипов стволовых клеток. В 2D-культурах теряются стволовые клетки с экспрессией CD44+CD24-, а также с сочетанием CD44+CD24- и CD133+. В 3D-культуре отсутствовали клетки с экспрессией CD44+CD24- и ALDH+.

Шестой случай характеризовался наличием в первичной опухоли четырех фенотипов стволовых клеток: ALDH+; CD133+; CD133+ALDH+ и CD44+CD24-ALDH+CD133+. В 2D-культуре исчезали клетки с фенотипом CD133+ и CD44+CD24-ALDH+CD133+. В 3D-культуре спектр стволовых клеток отличался от первичной опухоли не только потерей клеток с коэкспрессией CD44+CD24-ALDH+CD133+, но и появлением клеток с фенотипом CD133+.

Седьмой случай отличался от предыдущих появлением в культурах стволовых клеток с фенотипами, отсутствующими в первичной опухоли. В первичной опухоли присутствовал только фенотип стволовых клеток с экспрессией CD133. В 2D- и 3D-культурах появлялись кроме клеток CD133+ все другие фенотипы стволовых клеток: CD44+CD24-; ALDH+; CD133+ALDH+; CD44+CD24-ALDH+ и CD44+CD24-ALDH+CD133+.

В табл. 2 и 3 приведены результаты статистического сравнения долей различных фенотипов стволовых клеток в первичной опухоли, 2D- и 3D-культурах с учетом экспрессии EpCAM и N-cadherin. Сравнение долей разных фенотипов опухолевых клеток в каждом из трех исследуемых объектов показало, что относительное количество клеток каждого из стволовых фенотипов в основном не различалось в первичной опухоли и в 2D-культурах независимо от экспрессии EpCAM и N-cadherin. Исключением оказались стволовые клетки с фенотипом EpCAM+CD44+CD24-ALDH+CD133-N-cadherin+, относительная доля которых в 2D-культурах была меньше, чем подобных клеток, не экспрессирующих EpCAM ($p=0,043$). В 3D-культуре было меньше клеток EpCAM+CD44+CD24-ALDH+CD133-N-cadherin- ($p=0,043$), но больше клеток EpCAM+CD44+CD24+/CD44-CD24+/-ALDH-CD133+N-cadherin- ($p=0,028$) по сравнению с подобными стволовыми клетками в 3D-культурах, не экспрессирующими EpCAM (табл. 2). Кроме этого, среди клеток 3D-культур, экспрессирующих N-cadherin, было больше трижды позитивных стволовых клеток (EpCAM+CD44+CD24-ALDH+CD133+N-cadherin+, $p=0,046$). Общим для стволовых клеток, которых было меньше в 2D- и 3D-культурах, экспрессирующих EpCAM, в сравнении с EpCAM-

клетками, была коэкспрессия с другими маркерами стволовости CD44+CD24-.

Сравнение между собой долей стволовых клеток с разными фенотипами в первичной опухоли, 2D- и 3D-культурах выявило закономерные различия. Они очевидны в 2D- и 3D-культурах, если разделить фенотипы на группы с долями клеток меньше и больше 0,15 %. Оказалось, что среди клеток с долями меньше 0,15 % преобладают фенотипы стволовых клеток с коэкспрессией маркера стволовости CD44+CD24-. Поскольку таких фенотипов было 4, то максимальное число в 2D- и 3D-культурах с долями меньше 0,15 % могло быть 8. Среди фенотипов, доли которых превышали 0,15 %, большинство составляли фенотипы клеток с экспрессией ALDH и/или CD133 (всего 3 фенотипа, максимальное число фенотипов, превышающих 0,15 %, могло быть 6).

Оценка соответствия «малочисленных» фенотипов предположению, что такие клетки должны иметь CD44+CD24-, а «многочисленные» фенотипы иметь маркеры стволовости ALDH и/или CD133 и не иметь сочетания экспрессии CD44+CD24-, дала следующие результаты. Среди клеток, не экспрессирующих N-cadherin, при отсутствии экспрессии EpCAM соотношение «малочисленные»/«многочисленные» фенотипы среди (CD44+CD24-)+ клеток равнялось 7/1, а среди ALDH и/или CD133 клеток – 0/6 ($p=0,0047$); среди стволовых клеток, экспрессирующих EpCAM, соответственно, 8/0 и 0/6 ($p=0,0003$). Экспрессия N-cadherin не влияла на отмеченную закономерность: среди EpCAM- стволовых клеток соотношения 8/0 и 2/4 ($p=0,0150$), среди EpCAM+ клеток – 8/0 и 1/5 ($p=0,0030$).

Следует отметить, что в первичной опухоли доли указанных двух групп фенотипов стволовости не различаются: среди EpCAM-N-cadherin- стволовых клеток соотношения 2/2 и 0/3, EpCAM+N-cadherin- 4/0 и 2/1; среди EpCAM-N-cadherin+ 3/1 и 1/2, а EpCAM+N-cadherin+ 4/0 и 3/0. Исключением были и стволовые клетки N-cadherin + CD133+ (табл. 3), которые составляли доли, меньшие чем 0,15 % в EpCAM- клетках 2D- и 3D- культур и EpCAM+ клетках первичной опухоли и 2D- культуры.

Обсуждение

Настоящее исследование посвящено сравнению проявлений стволовых свойств опухолевых клеток в зависимости от экспрессии EpCAM при люминальном подтипе РМЖ при культивировании опухолевых клеток в 2D- и 3D-культурах. По имеющимся данным, экспрессия EpCAM ассоциирована с признаками стволовости [3, 4]. Известно, что выраженная экспрессия EpCAM сопряжена при РМЖ с неблагоприятным прогнозом [1]. Значит ли это, что клетки опухоли, не экспрессирующие мембранный EpCAM, существенно отличаются по важным признакам, обеспечивающим агрессивное поведение: стволовости и ЭМП?

Таблица 2/Table 2
Процент клеток с разными фенотипами стволовости в зависимости от экспрессии EpCAM в группе без экспрессии N-cadherin
Percentage of cells with different stemness phenotypes depending on EpCAM expression in the group without N-cadherin expression

Фенотип опухолевых клеток/ Phenotypes of tumor cells	N-cadherin -					
	а	б	в	г	д	е
CD44+CD24-ALDH+CD133-	0,135 (0,000:0,937)	0,060 (0,000:0,175)	0,008 (0,000:0,773)	0,000 (0,000:1,276) p _{г-а} =0,715	EpCAM+ CK+/- 2D Me (Q1:Q3) 0,051 (0,000:0,200) p _{д-б} =0,345	3D Me (Q1:Q3) 0,000 (0,000:0,000) p _{е-а} =0,043
CD44+CD24+/-ALDH+CD133-	0,491 (0,114:3,326)	3,659 (0,369:18,468)	0,684 (0,028:4,667)	0,008 (0,000:4,894) p _{г-а} =0,753	1,220 (0,014:6,265) p _{д-б} =0,866	0,425 (0,000:2,623) p _{е-а} =0,917
CD44+CD24-ALDH+CD133+	0,259 (0,000:0,532)	0,000 (0,000:0,128)	0,030 (0,000:0,114)	0,000 (0,000:0,878) p _{г-а} =0,893	0,012 (0,000:0,831) p _{д-б} =0,144	0,013 (0,000:0,228) p _{е-а} =0,285
CD44+CD24+/-ALDH+CD133+	0,223 (0,000:2,099)	0,180 (0,082:1,270)	0,541 (0,211:0,653)	0,045 (0,000:0,444) p _{г-а} =0,500	2,439 (0,000:6,527) p _{д-б} =0,225	2,487 (0,000:2,623) p _{е-а} =0,176
CD44+CD24-ALDH-CD133-	1,486 (0,000:2,514)	0,013 (0,000:5,822)	0,179 (0,000:2,179)	0,074 (0,000:1,135) p _{г-а} =0,500	0,000 (0,000:0,306) p _{д-б} =0,500	0,000 (0,000:0,912) p _{е-а} =0,500
CD44+CD24-ALDH-CD133+	0,134 (0,000:1,738)	0,000 (0,000:0,000) p _{б-г} =0,043 p _{б-8} =0,018	0,000 (0,000:0,114) p _{в-г} =0,043 p _{в-8} =0,028	0,037 (0,000:0,397) p _{г-а} =0,500 p _{г-7} =0,043 p _{г-8} =0,028	0,000 (0,000:1,570) p _{д-б} =0,109 p _{д-8} =0,028	0,063 (0,000:1,245) p _{е-а} =0,144 p _{е-7} =0,028 p _{е-8} =0,028
CD44+CD24+/-ALDH-CD133+	0,714 (0,000:6,380)	0,204 (0,000:1,219)	0,868 (0,000:1,254)	0,322 (0,000:1,386) p _{г-а} =0,500	0,780 (0,000:14,278) p _{д-б} =0,273	5,198 (0,105:13,683) p _{е-а} =0,028
Отсутствие маркеров стволовости/ Lack of stemness markers	9,977 (2,142:24, 233)	1,642 (0,306:30,487)	5,324 (2,166:14,108)	6,839 (0,180:24,944) p _{г-а} =0,866	20,828 (0,041:42,965) p _{д-б} =0,866	13,234 (0,070:68, 073) p _{е-а} =0,310

Примечания: * – зеленым цветом выделены фенотипы стволовых клеток меньше 0,15 %; розовым цветом – чаще; таблица составлена авторами.
Notes: * – stem cell phenotypes of less than 0.15 % are highlighted in green and more than 0.15 % are highlighted in pink; created by the authors.

Таблица 3/ Table 3
Процент клеток с разными фенотипами стволовости в зависимости от экспрессии EpCAM в группе с экспрессией N-cadherin
Percentage of cells with different stemness phenotypes depending on EpCAM expression in the group with N-cadherin expression

Фенотип опухолевых клеток/ Phenotypes of tumor cells	N-cadherin +					
	EpCAM- СК+		EpCAM+ СК+/-		EpCAM+ СК+/-	
	а	б	в	г	д	е
оп Me (Q1:Q3)	оп Me (Q1:Q3)	3D Me (Q1:Q3)	оп Me (Q1:Q3)	2D Me (Q1:Q3)	3D Me (Q1:Q3)	
CD44+CD24-ALDH+CD133-	1	0,000 (0,000:0,585)	0,077 (0,000:0,122)	0,009 (0,000:0,114)	0,000 (0,000:2,766) P _{г-а} = 1,000	0,008 (0,000:0,224) P _{е-а} = 0,465
CD44+CD24+/- CD44-CD24+/- ALDH+CD133-	2	0,125 (0,000:20,163)	2,261 (0,408:44,460)	2,075 (0,036:16,655)	0,000 (0,000:11,414) P _{г-а} = 0,345	0,354 (0,000:2,490) P _{е-а} = 0,686
CD44+CD24- ALDH+CD133+	3	0,351 (0,045:3,242)	0,051 (0,000:0,095)	0,032 (0,000:0,070)	0,000 (0,000:4,037) P _{г-а} = 0,753	0,141 (0,014:0,510) P _{е-а} = 0,046
CD44+CD24+/- CD44-CD24+/- ALDH+CD133+	4	4,015 (0,223:15,675)	1,020 (0,204:5,699)	2,490 (0,038:7,191)	0,045 (0,000:2,050) P _{г-а} = 0,463	0,830 (0,147:42,278) P _{е-а} = 0,499
CD44+CD24-ALDH-CD133-	5	0,037 (0,000:0,314)	0,000 (0,000:0,000)	0,006 (0,000:0,211)	0,000 (0,000:0,134) P _{г-а} = 0,893	0,000 (0,000:0,000) P _{е-а} = 0,273
CD44+CD24-ALDH-CD133+	6	0,084 (0,000:0,248)	0,000 (0,000:0,000)	0,000 (0,000:0,008)	0,000 (0,000:0,197) P _{г-а} = 0,500	0,005 (0,000:0,114) P _{е-а} = 0,285
CD44+CD24+/- CD44-CD24+/- ALDH- CD133+	7	0,191 (0,000:7,135)	0,012 (0,000:0,231)	0,034 (0,000:0,569)	0,105 (0,086:0,373) P _{г-а} = 0,237	0,415 (0,070:3,528) P _{е-а} = 0,128
Отсутствие маркеров ство- ловости/ Lack of stemness markers	8	0,190 (0,000:1,276)	0,035 (0,000:1,633)	0,294 (0,000:2,450)	0,074 (0,000:0,268) P _{г-а} = 0,138	0,415 (0,000:2,564) P _{е-а} = 0,463

Примечания: зеленым цветом выделены фенотипы стволовых клеток меньше 0,15 %; розовым цветом — чаще; таблица составлена авторами.

Notes: stem cell phenotypes of less than 0.15 % are highlighted in green, and more than 0.15 % are highlighted in pink; created by the authors.

В связи с этим предполагалось выяснить, насколько различны фенотипические варианты стволовых клеток в сфероиде, образующихся в 3D-культурах, в ЕрСAM- и ЕрСAM+ клетках. Еще одна задача состояла в сравнении стволовых признаков клеток в 3D-культурах с фенотипами клеток, культивируемых в 2D-культурах, и клеточным составом первичной опухоли. Полученные результаты позволили получить ответы на эти вопросы.

Основные выводы состоят в следующем. Не обнаружено значимых различий по частоте выявления клеток с проявлениями стволовых признаков среди ЕрСAM- и ЕрСAM+ клеток опухоли, 2D- и 3D-культур. Как в первичной опухоли, так и в 2D- и 3D-культурах присутствуют все фенотипы стволовых клеток опухоли, различающихся вариантами коэкспрессии CD44, CD24, CD133 и ALDH. Отмечается выраженная внутри- и межопухолевая гетерогенность по фенотипическому составу первичных опухолей, 2D- и 3D-культур. Отсутствовали и различия ЕрСAM- и ЕрСAM+ клеток первичной опухоли, 2D- и 3D-культур по проявлениям ЭМП. Что касается связи фенотипа ЭМП стволовых клеток и способности формировать маммосферы, наши результаты показывают, что сфероиды могут формироваться при наличии клеток как с вариантами эпителиального фенотипа ЭМП (ЕрСAM+СК7/8-N-cadherin-; ЕрСAM-СК7/8+N-cadherin-), так и гибридных фенотипов ЭМП (ЕрСAM+СК7/8-N-cadherin+; ЕрСAM-СК7/8+N-cadherin+). Данные литературы свидетельствуют о том, что различия в способности формировать маммосферы в зависимости от фенотипа ЭМП только количественные: гибридные фенотипы ЭМП показали повышенную способность формировать маммосферы [7]. Наши наблюдения свидетельствуют о том, что опухолевые клетки проявляют высокую адаптивность к условиям культивирования в 2D- и 3D-культурах независимо от варианта коэкспрессии маркеров стволовости и проявления ЭМП.

Проявление стволовых свойств в 3D-культурах настолько закономерно, что сам факт формирования сфероидов рассматривается как признак стволовости культивируемых клеток [7]. Однако не всегда отсутствие формирования сфероидов при культивировании в условии 3D-модели является аргументом в пользу отсутствия стволовых свойств опухолевых клеток. Такое утверждение справедливо, поскольку экспрессия стволовых маркеров в клетках опухоли не всегда коррелирует с их способностью образовывать сфероиды/маммосферы [9, 10]. Способность формировать сфероиды зависит от многих факторов: условий культивирования, плотности клеток в момент посева и состава среды, сохранения ими эпителиального фенотипа и, прежде всего, экспрессии E-cadherin [12]. И наконец, в формировании сфероидов молочных желез в 3D-культуре имеет значение клеточная адгезия, опосредованная взаимодействием $\alpha\beta 4$ с аутокринно продуцируемым ламинином-332 [13].

Наше исследование свидетельствует о том, что во всех случаях в 2D-культурах определялись стволовые клетки с разными фенотипами стволовости. Только в одном случае в 2D-культурах среди клеток, экспрессирующих N-cadherin, отсутствовали стволовые клетки со всеми фенотипами. Такой результат закономерен. Устоявшимся является суждение о том, что условия культивирования опухолевых клеток в 2D-культурах не оптимальны для изучения стволовых свойств опухолевых клеток. Однако возможность культивирования стволовых клеток в 2D-культурах подтверждается результатами работы с BCSC3 и BCSC4 линиями РМЖ. Стволовые клетки этих линий первоначально культивировали в 3D-, а затем в среде 2D для более эффективного размножения клеток [14]. В соответствии с протоколом «Large-Scale Expansion of Human Pluripotent Stem Cells (hPSCs) in 2D Monolayer Culture», 2D-культуры считаются вполне подходящими для культивирования плюрипотентных стволовых клеток человека [15]. По-видимому, адгезия опухолевых клеток к поверхности в условиях 2D-культивирования не препятствует проявлению разнообразных признаков стволовости.

Межперсональная гетерогенность в настоящем исследовании проявилась в том, что в 57 % случаев в 2D- и 3D-культурах обнаруживались все варианты коэкспрессии маркеров стволовости. В остальных наблюдениях в 2D- и 3D-культурах не выявлялись некоторые фенотипы стволовости. Один из наиболее интересных результатов состоял в том, что при выборе порогового значения 0,15 % все фенотипы стволовости, которые обнаруживались в 2D- и 3D-культурах (но не в первичной опухоли), можно было разделить на две группы: «малочисленные» и относительно «многочисленные». Причем это касалось как частот встречаемости малой части фенотипов, так и долей большей части клеток с соответствующими маркерами стволовости. Наименьшие частоты и доли составляли стволовые клетки с фенотипом CD44+CD24- и клетки с коэкспрессией CD44+CD24- с другими маркерами стволовости. Более многочисленными были стволовые клетки, экспрессирующие CD133 и/или ALDH без коэкспрессии с CD44+CD24-. Результат, по-видимому, закономерен. Маркер стволовости CD44+CD24- является наиболее часто определяемым при раке молочной железы [16]. Однако имеются работы, демонстрирующие, что стволовые клетки с фенотипом CD44+CD24- обладают низкой способностью к формированию маммосфер [14]. Полученные результаты дают основание с определенной осторожностью связывать способность опухолевых клеток формировать сфероиды и стволовость, если определялся только один маркер стволовости, поскольку этот феномен может быть обусловлен стволовыми свойствами,

ассоциированными с другими коэкспрессируемы-ми маркерами стволовости.

Таким образом, результаты работы демонстрируют, что при культивировании в 2D- и 3D-условиях отсутствие экспрессии EpCAM не препятствует проявлению опухолевыми клетками разнообразных стволовых свойств и признаков ЭМП, а также выраженной межперсональной гетерогенности. Вместе с тем, следует иметь в виду, что для получения более точных количественных характеристик фенотипического состава стволовых клеток, экспрессирующих и не экспрессирующих EpCAM, частот и долей стволовых клеток в 2D- и 3D-культурах, проявлений межперсональной гетерогенности, необходимо проведение дополнительных исследований.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что опухолевые клетки люминального молекулярно-биологического подтипа РМЖ,

не экспрессирующие EpCAM, способны, как и EpCAM-положительные, при культивировании как в 2D-, так и в 3D-культурах проявлять все варианты фенотипов стволовости. В большинстве случаев в одной опухолевой клетке наблюдается коэкспрессия нескольких маркеров стволовости. Частота выявления разных вариантов коэкспрессии маркеров стволовости CD44, CD24, CD133 и ALDH и маркера мезенхимного фенотипа ЭМП N-cadherin статистически не различается в первичной опухоли, в 2D- и 3D-культурах. Стволовые клетки с экспрессией CD44+CD24- независимо от коэкспрессии с другими маркерами были самыми малочисленными, в то время как клетки, экспрессирующие ALDH или ALDH, в сочетании с CD133 были наиболее многочисленными. Выраженная межперсональная гетерогенность состава стволовых клеток в 2D- и 3D-культурах является объективной причиной сложностей групповой оценки этой важной характеристики агрессивных свойств опухолевых элементов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Gires O., Pan M., Schinke H., Canis M., Baeuerle P.A. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Rev.* 2020; 39(3): 969–87. doi: 10.1007/s10555-020-09898-3.
2. Winter M.J., Cirulli V., Briaire-de Bruijn I.H., Litvinov S.V. Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem.* 2007; 302(1–2): 19–26. doi: 10.1007/s11010-007-9420-y.
3. Huang H.P., Chen P.H., Yu C.Y., Chuang C.Y., Stone L., Hsiao W.C., Li C.L., Tsai S.C., Chen K.Y., Chen H.F., Ho H.N., Kuo H.C. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factormediated pluripotency reprogramming. *J Biol Chem.* 2011; 286(38): 33520–32. doi: 10.1074/jbc.M111.256164.
4. Tran K.A., Pietrzak S.J., Zaidan N.Z., Siahipirani A.F., McCalla S.G., Zhou A.S., Iyer G., Roy S., Sridharan R. Defining reprogramming checkpoints from single-cell analyses of induced pluripotency. *Cell Reports.* 2019; 27(6): 1726–41. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.056.
5. Bouchalova P., Bouchal P. Current methods for studying metastatic potential of tumor cells. *Cancer Cell Int.* 2022; 22(1): 394. doi: 10.1186/s12935-022-02801-w.
6. Barbosa M.A.G., Xavier C.P.R., Pereira R.F., Petrikaitė V., Vasconcelos M.H. 3D Cell Culture Models as Recapitulators of the Tumor Microenvironment for the Screening of Anti-Cancer Drugs. *Cancers.* 2021; 14(1): 190. doi: 10.3390/cancers14010190.
7. Grosse-Wilde A., Fouquier d'Hérouël A., McIntosh E., Ertaylan G., Skupin A., Kuestner R.E., del Sol A., Walters K.A., Huang S. Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. *PLoS One.* 2015; 10(5). doi: 10.1371/journal.pone.0126522.
8. Marcato P., Dean C.A., Pan D., Araslanova R., Gillis M., Joshi M., Helyer L., Pan L., Leidal A., Gujar S., Giacomantonio C.A., Lee P.W.K. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells.* 2011; 29(1): 32–45. doi: 10.1002/stem.563.
9. Keller P.J., Lin A.F., Arendt L.M., Klebba I., Jones A.D., Rudnick J.A., DiMeo T.A., Gilmore H., Jefferson D.M., Graham R.A., Naber S.P., Schnitt S., Kuiperwasser C. Mapping the cellular and molecular heterogeneity of normal and malignant breast tissues and cultured cell lines. *Breast Cancer Res.* 2010; 12(5). doi: 10.1186/bcr2755.
10. Lehmann C., Jobs G., Thomas M., Burtcher H., Kubbies M. Established breast cancer stem cell markers do not correlate with in vivo tumorigenicity of tumor-initiating cells. *Int J Oncol.* 2012; 41(6): 1932–42. doi: 10.3892/ijo.2012.1654.
11. Перельмутер В.М., Григорьева Е.С., Завьялова М.В., Таширева Л.А., Алифанов В.В., Савельева О.Е., Вторушин С.В., Чойнзон Е.Л., Чердынцева Н.В. Проявления апоптоза в субпопуляциях циркулирующих опухолевых клеток с фенотипами, ассоциированными со стволовостью и эпителиально-мезенхимальным переходом, при карциноме молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии.* 2022; 9(4): 96–111. [Perelmutter V.M., Grigorieva E.S., Zavyalova M.V., Tashireva L.A., Alifanov V.V., Saveleva O.E., Vtorushin S.V., Choyznov E.L., Cherdynseva N.V. Signs of apoptosis in circulating tumor cell subpopulations with phenotypes associated with stemness and epithelial-mesenchymal transition in breast carcinoma. *Advances in Molecular Oncology.* 2022; 9(4): 96–111. (in Russian)]. doi: 10.17650/2313-805X-2022-9-4-96-111.
12. Manuel I.J., Belouqui I., Garcia-Garcia F., Leis O., Vazquez-Martin A., Eguia A., Cufi S., Pavon A., Menendez J.A., Dopazo J., Martin A.G. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS One.* 2013; 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0077281.
13. Friedland J.C., Lakins J.N., Kazanietz M.G., Chernoff J., Boettiger D., Weaver V.M. α6β4 integrin activates Rac-dependent p21-activated kinase 1 to drive NF-κB-dependent resistance to apoptosis in 3D mammary acini. *J Cell Sci.* 2007; 120(20): 3700–12. doi: 10.1242/jcs.03484.
14. Strietz J., Stepputtis S.S., Follo M., Bronsert P., Stickeler E., Maurer J. Human Primary Breast Cancer Stem Cells Are Characterized by Epithelial-Mesenchymal Plasticity. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(4): 1808. doi: 10.3390/ijms22041808.
15. Tohyama S., Fujita J., Fujita C., Yamaguchi M., Kanaami S., Ohno R., Sakamoto K., Kodama M., Kurokawa J., Kanazawa H., Seki T., Kishino Y., Okada M., Nakajima K., Tanosaki S., Someya S., Hirano A., Kawaguchi S., Kobayashi E., Fukuda K. Efficient large-scale 2D culture system for human induced pluripotent stem cells and differentiated cardiomyocytes. *Stem cell reports.* 2017; 9(5): 1406–14. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.08.025.
16. Sarrio D., Franklin C.K., Mackay A., Reis-Filho J.S., Isacke C.M. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells.* 2012; 30(2): 292–303. doi: 10.1002/stem.791.

Поступила/Received 06.05.2024

Одобрена после рецензирования/Revised 19.08.2024

Принята к публикации/Accepted 02.09.2024

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Алифанов Владимир Валерьевич, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр

Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 7943-5548. Researcher ID (WOS): AAW-8959-2021. Author ID (Scopus): 57225891731. ORCID: 0000-0002-3025-4445.

Третьякова Мария Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории биологии опухолевой прогрессии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 5207-8330. Researcher ID (WOS): AAL-6195-2021. Author ID (Scopus): 56967923800. ORCID: 0000-0001-7385-6609.

Григорьева Евгения Сергеевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной терапии рака, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 7396-7570. Researcher ID (WOS): C-8571-2012. Author ID (Scopus): 21934560600. ORCID: 0000-0003-4737-8951.

Буддаков Михаил Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной терапии рака, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 7558-4726. Researcher ID (WOS): C-7922-2012. Author ID (Scopus): 55932165800. ORCID: 0000-0001-8276-110X.

Таширева Любовь Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной терапии рака, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 4371-5340. Researcher ID (WOS): C-8222-2012. Author ID (Scopus): 55234960400. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Колегова Елена Сергеевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории биологии опухолевой прогрессии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 5865-1264. Researcher ID (WOS): L-8669-2016. Author ID (Scopus): 57190575464. ORCID: 0000-0001-9122-3274.

Андрюхова Елена Сергеевна, младший научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 3565-7265. Researcher ID (WOS): HLQ-4107-2023. Author ID (Scopus): 57345049300. ORCID: 0000-0003-0909-9206.

Завьялова Марина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; заведующая кафедрой патологической анатомии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 1229-0323. Researcher ID (WOS): C-8580-2012. Author ID (Scopus): 36711031100. ORCID: 0000-0001-9429-9813.

Денисов Евгений Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биологии опухолевой прогрессии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 9498-5797. Researcher ID (WOS): Q-3820-2016. Author ID (Scopus): 26653961800. ORCID: 0000-0003-2923-9755.

Чердынцева Надежда Викторовна, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 5344-0990. Researcher ID (WOS): C-7943-2012. Author ID (Scopus): 6603911744. ORCID: 0000-0003-1526-9013.

Перельмутер Владимир Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения общей и молекулярной патологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). SPIN-код: 6252-5319. Researcher ID (WOS): C-8227-2012. Author ID (Scopus): 8091317300. ORCID: 0000-0002-7633-9620.

ВКЛАД АВТОРОВ

Алифанов Владимир Валерьевич: сбор материала исследования, сбор и обработка данных, подбор и анализ литературных источников, редактирование и оформление текста статьи.

Третьякова Мария Сергеевна: сбор материала исследования, сбор и обработка данных.

Григорьева Евгения Сергеевна: сбор материала исследования, сбор и обработка данных, подбор и анализ литературных источников, обработка результатов исследования.

Буддаков Михаил Александрович: сбор материала исследования, сбор и обработка данных.

Таширева Любовь Александровна: научное редактирование, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Колегова Елена Сергеевна: сбор материала исследования, сбор и обработка данных.

Андрюхова Елена Сергеевна: сбор материала исследования, сбор и обработка данных, подбор и анализ литературных источников.

Завьялова Марина Викторовна: разработка концепции проекта и дизайна работы, написание черновика статьи.

Денисов Евгений Владимирович: критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Чердынцева Надежда Викторовна: критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Перельмутер Владимир Михайлович: руководство научной работой, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Все авторы одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы, подразумевающую надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой части работы.

Финансирование

Анализ и интерпретация результатов культивирования опухолевых клеток РМЖ в 2D- и 3D-культурах, приведенных в базе данных № 2024621453 «База данных фенотипов опухолевых клеток в первичной опухоли и при культивировании в системах 2D и 3D у больных раком молочной железы», выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00135).

Конфликт интересов

Автор Чердынцева Н.В. (доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН) является заместителем главного редактора «Сибирского онкологического журнала». Автор Перельмутер В.М. (доктор медицинских наук, профессор) является членом редколлегии «Сибирского онкологического журнала». Авторам неизвестно о каком-либо другом потенциальном конфликте интересов, связанном с этой статьей.

Соответствие принципам этики

Проведенное исследование соответствует стандартам Хельсинкской декларации, одобрено независимым этическим комитетом Научно-исследовательского института онкологии (Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5), протокол № 8 от 17.06.16.

Информированное согласие

Все пациенты подписали письменное информированное согласие на публикацию данных и фотоматериалов в медицинском журнале, включая его электронную версию.

ABOUT THE AUTHORS

Vladimir V. Alifanov, MD, PhD, Junior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): AAW-8959-2021. Author ID (Scopus): 57225891731. ORCID: 0000-0002-3025-4445.

Mariya S. Tretyakova, Junior Researcher, Laboratory of Tumor Progression Biology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): AAL-6195-2021. Author ID (Scopus): 56967923800. ORCID: 0000-0001-7385-6609.

Evgeniya S. Grigoryeva, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8571-2012. Author ID (Scopus): 21934560600. ORCID: 0000-0003-4737-8951.

Mikhail A. Buldakov, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-7922-2012. Author ID (Scopus): 55932165800. ORCID: 0000-0001-8276-110X.

Liubov A. Tashireva, MD, DSc, Head of the Laboratory of Molecular Cancer Therapy, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8222-2012. Author ID (Scopus): 55234960400. ORCID: 0000-0003-2061-8417.

Elena S. Kolegova, MD, PhD, Researcher, Laboratory of Tumor Progression Biology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): L-8669-2016. Author ID (Scopus): 57190575464. ORCID: 0000-0001-9122-3274.

Elena S. Andryuhova, Junior Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): HLQ-4107-2023. Author ID (Scopus): 57345049300. ORCID: 0000-0003-0909-9206.

Marina V. Zavyalova, MD, DSc, Professor, Leading Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Head of the Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8580-2012. Author ID (Scopus): 36711031100. ORCID: 0000-0001-9429-9813.

Evgeny V. Denisov, DSc, Head of the Laboratory of Tumor Progression Biology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): Q-3820-2016. Author ID (Scopus): 26653961800. ORCID: 0000-0003-2923-9755.

Nadezhda V. Cherdyntseva, MD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-7943-2012. Author ID (Scopus): 6603911744. ORCID: 0000-0003-1526-9013.

Vladimir M. Perelmutter, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Department of General and Molecular Pathology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8227-2012. Author ID (Scopus): 8091317300. ORCID: 0000-0002-7633-9620.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Vladimir V. Alifanov: data collection and analysis, editing and design of the manuscript.

Mariya S. Tretyakova: data collection and analysis.

Evgeniya S. Grigoryeva: data collection and analysis, analysis of research results.

Mikhail A. Buldakov: data collection and analysis.

Liubov A. Tashireva: editing of the manuscript, critical revision of the manuscript with valuable intellectual content.

Elena S. Kolegova: data collection and analysis.

Elena S. Andryuhova: data collection and analysis.

Marina V. Zavyalova: study concept and design, drafting of the manuscript.

Evgeny V. Denisov: critical revision with valuable intellectual content.

Nadezhda V. Cherdyntseva: critical revision with valuable intellectual content.

Vladimir M. Perelmutter: supervision, critical revision with valuable intellectual content.

All authors approved the final version of the manuscript prior to publication and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work were appropriately investigated and resolved.

Funding

Analysis and interpretation of the results of culturing breast cancer cells in 2D and 3D cultures, given in database No. 2024621453 was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 23-15-00135).

Conflict of interests

Prof. Cherdyntseva N.V. is Deputy Editor-in-Chief of Siberian Journal of Oncology. Prof. Perelmutter V.M. is a member of the editorial board of Siberian Journal of Oncology. The authors are not aware of any other potential conflicts of interest related to this manuscript.

Compliance with Ethical Standards

The study was conducted in accordance with ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki approved by Ethics Committee of Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (5, Kooperativny St., Tomsk, 634009, Russia), protocol No. 8 dated June 17, 2016.

Voluntary informed consent

Written informed voluntaries consents were obtained from the patients for the publication of data and photographs in medical journal.