

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ОПЫТ СОЗДАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО В ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ» МИНЗДРАВА РОССИИ

И. В. Межевова[✉], А. О. Ситковская, С. Ю. Филиппова, Т. В. Шамова, С. В. Тимофеева,
Н. В. Гненная, И. А. Новикова, Д. А. Харагезов, А. Г. Милакин, И. А. Лейман, О. Н. Статешный,
Э. Е. Росторгуев, Д. П. Атмачиди, Т. О. Лаптева, М. В. Волошин, К. С. Еремин, И. А. Сухарь

НМИЦ онкологии, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ Mezhevova88@gmail.com

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Тестирование новых химиотерапевтических агентов в трансляционной и биомедицине нуждается в исследованиях на immortalized клеточных линиях. Однако такие модели не всегда обладают биологическими свойствами опухоли *in situ*, в отличие от первичных культур клеток. Первичные культуры клеток рака легкого обладают близкими или идентичными опухолевым клеткам *in vivo* биологическими, гистологическими и молекулярными характеристиками. Получение коллекций первичных клеточных линий рака легкого является важной задачей в создании различных моделей для доклинических исследований.

Материалы и методы. В работе использовали послеоперационные образцы опухоли, полученные от 25 пациентов с впервые выявленным раком лёгкого без предварительного лечения. Для получения первичных культур использовали следующие методы: ферментативной диссоциации в растворе Хэнкса с добавлением 300 ед./мл коллагеназы I (Thermo Fisher Scientific, США), ферментативной диссоциации с использованием набора Brain Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия) и 150 ед./мл коллагеназы I, а также метод эксплантатов. Для удаления фибробластов использовали следующие методы: применение системы FibrOut™ (CHI Scientific, США), магнитная сепарация фибробластов с использованием Anti-Fibroblast MicroBeads (Miltenyi Biotec, Германия) и метод холодной трипсинизации.

Результаты. Получено 15 первичных клеточных культур рака легкого, прошедших нулевой пассаж. В данной работе наиболее эффективным оказался метод ферментативной диссоциации. Инкубирование образцов опухоли легкого с коллагеназой в течение 1 ч. сохраняет жизнеспособность и адгезивную способность клеток. Метод эксплантатов не показал своей эффективности в целях долгосрочного культивирования, отсутствовала миграция клеток опухоли на пластик. Магнитная сепарация, как метод удаления стромальных компонентов фибробластов, показала наибольшую эффективность, сохраняя жизнеспособность клеток опухоли.

Заключение. Полученные первичные клеточные культуры рака легкого могут быть использованы для многих задач экспериментальной онкологии: исследования биологических особенностей рака легкого, разработки доклинических моделей исследования новых химиотерапевтических препаратов.

Ключевые слова:

первичная клеточная культура, рак легких, механическая диссоциация, ферментативная диссоциация, коллагеназа, метод эксплантатов, удаление фибробластов

Для корреспонденции:

Межевова Ирина Валентиновна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация.

E-mail: mezhevova88@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>

SPIN: 3367-1741, AuthorID: 1011695

ResearcherID: AAI-1860-2019

Scopus Author ID: 57296602900

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования:

Межевова И. В., Ситковская А. О., Филиппова С. Ю., Шамова Т. В., Тимофеева С. В., Гненная Н. В., Новикова И. А., Харагезов Д. А., Милакин А. Г., Лейман И. А., Статешный О. Н., Росторгуев Э. Е., Атмачиди Д. П., Лаптева Т. О., Волошин М. В., Еремин К. С., Сухарь И. А. Опыт создания коллекции клеточных культур немелкоклеточного рака легкого в ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Южно-Российский онкологический журнал. 2022; 3(4): 14-25. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2022-3-4-2>

Статья поступила в редакцию 25.05.2022; одобрена после рецензирования 12.10.2022; принята к публикации 12.12.2022.

© Межевова И. В., Ситковская А. О., Филиппова С. Ю., Шамова Т. В., Тимофеева С. В., Гненная Н. В., Новикова И. А., Харагезов Д. А., Милакин А. Г., Лейман И. А., Статешный О. Н., Росторгуев Э. Е., Атмачиди Д. П., Лаптева Т. О., Волошин М. В., Еремин К. С., Сухарь И. А., 2022

PRACTICAL EXPERIENCE OF A LUNG CANCER PRIMARY CELL CULTURE COLLECTION CREATION AT THE NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTRE FOR ONCOLOGY

I. V. Mezheva[✉], A. O. Sitkovskaya, S. Yu. Filippova, T. V. Shamova, S. V. Timofeeva, N. V. Gnennaya, I. A. Novikova, D. A. Kharagezov, A. G. Milakin, I. A. Leiman, O. N. Stateshny, E. E. Rostorguev, D. P. Atmachidi, T. O. Lapteva, M. V. Voloshin, K. S. Eremin, I. A. Suhar

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ Mezheva88@gmail.com

ABSTRACT

Purpose of the study. Testing of new chemotherapeutic agents in translational and biology medicine needs studies on immortalized cell lines. However, such models do not always have the biological properties of a tumor *in situ*, in contrast to primary cell cultures. Primary cultures of lung cancer cells have biological, morphological and molecular characteristics close or identical to tumor cells *in vivo*. Obtaining collections of primary lung cancer cell lines is an important task in creating various models for preclinical studies.

Materials and methods. The materials are represented by postoperative tumor samples obtained from 25 patients with newly diagnosed lung cancer without prior treatment. The following methods were used to obtain primary cultures: enzymatic dissociation in Hanks' solution with the addition of 300 units/ml collagenase I (Thermo Fisher Scientific, USA), enzymatic dissociation using the Brain Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Germany) and 150 units/ml. ml of collagenase I, as well as the method of explants. The following methods were used to remove fibroblasts: the use of the FibrOut™ system (CHI Scientific, USA), magnetic separation of fibroblasts using Anti-Fibroblast MicroBeads (Miltenyi Biotec, Germany), and cold trypsinization.

Results. We have obtained 15 primary lung cancer cell cultures that have passed the zero order passage. In this work, the method of enzymatic dissociation turned out to be the most effective. Incubation of lung tumor samples with collagenase for 1 hour preserves the viability and adhesiveness of the cells. The explant method did not show its effectiveness for long-term cultivation, there was no migration of tumor cells to plastic. Magnetic separation, as a method of removing stromal components of fibroblasts, showed the greatest efficiency, while maintaining the viability of tumor cells.

Conclusion. The obtained primary cell cultures of lung cancer can be used for many tasks of experimental oncology: studies of the biological characteristics of lung cancer, development of preclinical models for the studies on new chemotherapeutic drugs.

Keywords:

primary cell culture, lung cancer, mechanical dissociation, enzymatic dissociation, collagenase, explant method, fibroblast removal

For correspondence:

Irina V. Mezheva – junior research fellow at the laboratory of cellular technologies, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation.

E-mail: mezheva88@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>

SPIN: 3367-1741, AuthorID: 1011695

ResearcherID: AAI-1860-2019

Scopus Author ID: 57296602900

Funding: this work was not funded.

Conflict of interest: authors report no conflict of interest.

For citation:

Mezheva I. V., Sitkovskaya A. O., Filippova S. Yu., Shamova T. V., Timofeeva S. V., Gnennaya N. V., Novikova I. A., Kharagezov D. A., Milakin A. G., Leiman I. A., Stateshny O. N., Rostorguev E. E., Atmachidi D. P., Lapteva T. O., Voloshin M. V., Eremin K. S., Suhar I. A. Practical experience of a lung cancer primary cell culture collection creation at the National Medical Research Centre for Oncology. South Russian Journal of Cancer. 2022; 3(4): 14-25. (In Russ.). <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2022-3-4-2>

The article was submitted 25.05.2022; approved after reviewing 12.10.2022; accepted for publication 12.12.2022.

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний с высоким уровнем смертности как в Российской Федерации, так и в мире. В России заболеваемость раком легкого входит в тройку ведущих, при этом у мужчин занимает первое место и составляет 16,5 % от общего числа всех онкопатологий [1]. Являясь гетерогенным заболеванием, рак легкого включает в себя несколько подтипов, имеющих значение для клинического и патологического течения заболевания. Гистологически опухоли легких подразделяются на два основных гистотипа: мелкоклеточный рак (МРЛ) и немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Мелкоклеточный рак лёгкого составляет 15–20 % первичных опухолей легкого и является наиболее агрессивной формой злокачественных новообразований данной локализации. Немелкоклеточный рак легкого составляет около 80 % от общего количества опухолей легкого и подразделяется на четыре гистологических подтипа: аденокарцинома легкого, плоскоклеточный рак, крупноклеточный рак легкого и карциноидная опухоль бронхов [2]. Молекулярно-генетические подтипы НМРЛ определяются наличием или отсутствием мутаций в генах EGFR, KRAS, транслокаций в генах ALK, ROS1, что позволяет на основе этих данных принимать решения о назначении таргетной терапии, а экспрессия белка PD-L1 – об иммунотерапии [3]. Несмотря на все успехи в лечении рака легких, достигнутые благодаря применению лучевой, химиотерапии, а также иммунотерапии, прогнозы для пациентов остаются неутешительными: для МРЛ характерно раннее метастазирование, а общая пятилетняя выживаемость составляет около 5 %, НМРЛ имеет более благоприятный прогноз, однако учитывая тот факт, что чаще заболевание диагностируют на III–IV стадии, пятилетняя выживаемость остается низкой и составляет 15–19 % [4]. Поиск новых лекарственных средств включает в себя скрининг библиотек противоопухолевых соединений на первичных культурах и постоянных клеточных линиях рака [5]. Первичная культура представляет собой клетки опухоли, помещенные в среду культивирования после механической или ферментативной дисагрегации или в результате миграции из эксплантов. Первичная клеточная культура, прошедшая первый пассаж, т.е. прошедшая первый пересев после того, как выделенные из образца опухоли клетки при-

крепилась к культуральному пластику, называется клеточной линией. Постоянная клеточная линия – это трансформированная *in vitro* клеточная линия, преодолевшая так называемый предел Хейфлика – предельное количество делений, определяемое длиной теломера [6]. Постоянные клеточные линии рака легкого впервые были получены в 80-х годах XX века, на 25 лет позже создания первой линии клеток рака шейки матки (HeLa). После разработки бессывороточных сред, например, среды ACL4 и HITES, введение в культуру клеточных линий рака легкого достигло своего пика. В настоящее время известно более 200 постоянных клеточных линий этой нозологии [7; 8].

Использование постоянных клеточных линий позволяет оценить прямой цитотоксический и цитостатический эффекты, органоспецифическую токсичность тестируемых химических соединений и препаратов, определить их механизм действия, а также белки и гены – мишени [9]. Однако постоянная культура клеток *in vitro* после длительного субкультивирования не может демонстрировать гетерогенность исходной опухоли *in vivo*, которая возникает из-за наличия в клеточном составе первичной опухоли нескольких субклонов, генотипически отличных друг от друга, что характерно, в частности, для немелкоклеточного рака легкого. Гетерогенность рака легкого характеризуется различием в скорости роста клеток, их кариотипе, наличии рецепторов клеточной поверхности, продукции ферментов, экспрессии генов [10], чувствительности к различным цитостатикам [11]. Известно, что различия в биологических характеристиках клеток опухоли лежат в основе метастатического прогрессирования первичной опухоли, приобретения ею устойчивости к таргетной и химиотерапии, возникновению рецидивов. Игнорирование гетерогенности опухоли на ранних этапах доклинических исследований является одной из причин провала клинических испытаний новых противоопухолевых препаратов, что ведёт к большим экономическим тратам и замедлению прогресса в этой области [3; 12].

В связи с этим, более адекватным источником для создания клеточных моделей опухолевого роста являются первичные клеточные культуры, в которых воспроизводится гетерогенность опухоли на уровне её гистопатологических, молекулярных и генетических особенностей. Создание коллекций первичных культур рака лёгкого является распространённой практикой в различных научных учре-

ждениях по всему миру. Такие коллекции служат для воспроизведения популяционных особенностей заболевания [13], изучения ответа НМРЛ на химиотерапию [14] и исследования различных аспектов онкогенеза [15; 16].

Существует множество методов получения первичных клеточных культур, которые исследователи постоянно оптимизируют в зависимости от особенностей опухолевого материала и целей, стоящих перед исследованием. Ключевым этапом в процессе создания клеточной культуры является получение в ходе ферментативной или механической дезагрегации ткани пула жизнеспособных опухолевых клеток, по составу, приближенному к гетерогенному клеточному составу исходной опухоли. Для опухолей с плотной структурой, к которым относится и рак лёгкого, предпочтительным является метод ферментативной диссоциации, при этом состав и жизнеспособность получаемых клеток прямо зависят от используемых реагентов и условий ферментирования [17]. Одним из наиболее популярных компонентов смесей для ферментативной диссоциации ткани плотных опухолей является коллагеназа I, которая обладает высокой специфичностью по отношению к волокнам коллагена – основного белка внеклеточного матрикса, – оставляя нетронутыми белки клеточных мембран, что важно для сохранения жизнеспособности и биологических особенностей выделенных клеток [18]. Коллагеназа I часто используется и при получении первичных клеточных линий рака лёгкого, как в чистом виде [19], так и в смеси с другими ферментами (трипсином) [13]. В качестве альтернативы диссоциации ткани применяют метод эксплантатов, в основе которого лежит миграция неповрежденных клеток на культуральный пластик из небольших фрагментов опухоли. Преимуществом такого подхода является высокая выживаемость клеток при наиболее полном сохранении гетерогенности их состава, однако эффективность получения клеточной линии ограничена подвижностью клеток опухоли [6; 14].

Получение первичных культур является довольно сложным процессом в связи с небольшим количеством исходных опухолевых клеток, а также с частичной потерей жизнеспособности клеток после резекции опухоли и применения методов дезагрегации материала [17].

Независимо от способа получения первичной культуры рака лёгкого, как и других злокачествен-

ных новообразований с выраженным фиброзным компонентом, большую проблему представляет контаминация клетками стромы, из которых самыми многочисленными являются фибробласты, которые в условиях *in vitro* быстро переходят к делению и за счёт этого способны подавить клетки опухоли. Существует целый ряд способов борьбы с фибробластами в культуре, которые можно разделить на три группы: 1) применение цитостатиков, специфичных для фибробластов; 2) использование свойств дифференциальной адгезии клеток первичной культуры и 3) клеточный сортинг. Каждый из этих методов обладает своими достоинствами и недостатками [20].

Цель исследования: оценить эффективность различных методов выделения опухолевых клеток при создании коллекции клеточных культур немелкоклеточного рака легкого.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с марта по сентябрь 2021 г. для исследований был отобран опухолевый материал 25 пациентов с немелкоклеточным раком легкого (аденокарцинома легкого), из которых 20 образцов были получены из первичного очага и 5 образцов – из метастаза в головной мозг.

Больные проходили лечение в отделении торакальной хирургии и в отделении нейроонкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в 2021 г. Гистологический диагноз подтверждали в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России. Пациенты были осведомлены об участии в научном исследовании и подписывали информированное согласие на сбор биологического материала. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России протокол № 6/1 от 10 февраля 2020 г.

Образцы из операционной передавали в растворе Хенкса (HBSS, Gibco, США) с добавлением 1 % пенициллина-стрептомицина (Биолот, Россия) при температуре +4–8 °C в Лабораторию клеточных технологий ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России в промежутке не более 20 мин. после удаления опухолевого препарата. Для отработки методики получения жизнеспособных клеток нами были выбраны несколько вариантов протоколов ферментативной диссоциации, а также метод эксплантатов. В 15 случаях нами применялась процедура ферментативной

диссоциации с использованием чистой коллагеназы I в случае с первичным очагом ($n = 10$) и с использованием комбинации коллагеназы I и ферментов для диссоциации ткани мозга в случае с образцами, полученными из метастазов ($n = 5$). В 10 случаях для получения клеточной культуры из первичного очага применяли метод эксплантатов. Схематическое изображение использованных в работе протоколов и методов представлено на рисунке 1. Во всех случаях для выращивания первичных клеточных линий использовали стандартную среду культивирования, представляющую собой среду DMEM (Gibco, США) с добавлением 10 % FBS (HyClone, США), 1 % инсулина-трансферрина-селенита натрия (Биолот, Россия), 10 нг/мл FGF-2 (Miltenyi Biotec, Германия), 10 нг/мл EGF (Miltenyi Biotec, Германия), 1 % NEAA (Gibco, США).

Визуальное исследование морфологии клеток и фотофиксацию проводили при помощи инвертированного микроскопа Axio Vert. A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Протокол № 1. Ферментативная диссоциация в растворе Хэнкса и коллагеназы I (Thermo Fisher Scientific, США). Применяемый протокол соответствует обычной практике ферментативной обработки ткани опухолей лёгкого [19]. Фрагменты опухоли помещали в чашку Петри ($d = 35$ мм) (Eppendorf, Германия) с раствором Хэнкса (с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+}) (Gibco, США) и фрагментировали образцы скальпелем до размера 1–2 мм³, после чего добавляли 300 ед./мл коллагеназы I (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 1 час в термостате при 37 °C и 5 % CO_2 . По окончании культивирования образец ресуспендировали, пропуская через пластиковый наконечник несколько раз, в результате чего получали однородную клеточную суспензию. Далее вносили 3 мл стандартной среды культивирования, центрифугировали 5 мин при 300g и декантировали супернатант. К клеточному осадку вносили 5 мл питательной среды DMEM (Gibco, USA) и ресуспендировали, после чего суспензию опухолевых клеток пропускали через стерильный нейлоновый фильтр ($d = 70$ нм) (Becton Dickinson, США). Подсчёт, определение жизнеспособности клеток проводили в камере Горяева с 0,4 % раствором трипанового синего (Биолот, Россия). Образцы, в зависимости от количества клеток, пассировали во флаконы с площадью культуральной поверхности 25 см², либо 75 см² (Thermo Fisher Scientific NUNC™ EasYFlask™, Дания) в питательной среде для первичных клеточных линий Primary Cancer Culture System (PromoCell®,

Германия) и помещали в CO_2 -инкубатор для дальнейшего культивирования при 37 °C и 5 % CO_2 . На 3 сутки культивирования добавляли 2 мл свежей питательной среды Primary Cancer Culture System. Далее замену питательной среды производили раз в три дня. Через месяц культивирования питательную среду для первичных клеточных линий заменяли на стандартную среду культивирования.

Протокол № 2. Ферментативная диссоциация при совместном использовании Brain Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия) и 150 ед./мл коллагеназы I (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы измельчали скальпелями до размера 1–2 мм³. Для ферментативной диссоциации использовали набор Brain Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Германия) согласно инструкциям производителя. Культивировали 2 часа в CO_2 -инкубаторе (Binder, Германия) при 37 °C и 5 % CO_2 на механической мешалке, программируя прибор по инструкции к набору. Далее к суспензии ферментов и опухолевых фрагментов вносили 150 ед./мл коллагеназы I и инкубировали ещё 18 ч при +4...+8 °C. По истечении времени инкубации, образец отмывали, фильтровали, производили подсчёт и пассаж клеток, как указано в протоколе 1.

Протокол № 3. Метод эксплантатов. Опухолевый материал фрагментировали скальпелем до 2 мм в чашке Петри диаметром 35 мм (Eppendorf, Германия) с 5 мл питательной среды для культивирования первичных клеточных линий Primary Cancer Culture System (PromoCell®, Германия), после чего полученные эксплантаты культивировали в инкубаторе при 37 °C, 5 % CO_2 . Через несколько недель культивирования неадгезированные эксплантаты переносили из чашки Петри, измельчали пипетированием и далее отмывали, фильтровали, производили подсчёт и пассаж клеток, как указано в протоколе 1.

Удаление фибробластов из первичной культуры проводили несколькими методами, широко применяемыми в практике получения клеточных линий из солидных опухолей [20].

Метод № 1. Удаление фибробластов с помощью системы FibrOut™ (CHI Scientific, США). Во флаконы с первичными культурами клеток рака лёгкого вносили систему FibrOut™ из расчёта 1 мл системы к 500 мл питательной среды культивирования. Далее клетки культивировали 3–5 суток до полного открепления фибробластов, после чего заменяли среду стандартной средой культивирования.

Метод № 2. Магнитная сепарация клеток с использованием набора Anti-Fibroblast MicroBeads (Miltenyi

Biotec, Германия). На первом этапе проводили снятие первичных культур с помощью раствора трипсина – версена (1:1) (Биолот, Россия) при температуре 37 °С, затем фибробласты из клеточной суспензии сепарировали на магнитной колонке согласно инструкции производителя. Отрицательную фракцию, обеднённую фибробластами, пассировали в стандартной среде культивирования и помещали в CO₂-инкубатор для дальнейшего культивирования при 37 °С и 5 % CO₂.

Метод № 3. Холодная трипсинизация. Из культуральных флаконов с первичными культурами

декантировали отработанную питательную среду, после чего вносили охлаждённый раствор трипсина – версена (1:1) (Биолот, Россия) (+4...+8 °С) и инкубировали 3 мин при комнатной температуре, наблюдая в микроскоп процесс открепления клеток от дна флакона. Отделившиеся от дна флакона фибробласты аккуратно отмывали средой DMEM, содержащей 5 % FBS, и удаляли из флакона. Затем во флакон с оставшимися клетками вносили стандартную среду культивирования и помещали в CO₂-инкубатор для дальнейшего культивирования при 37 °С и 5 % CO₂.

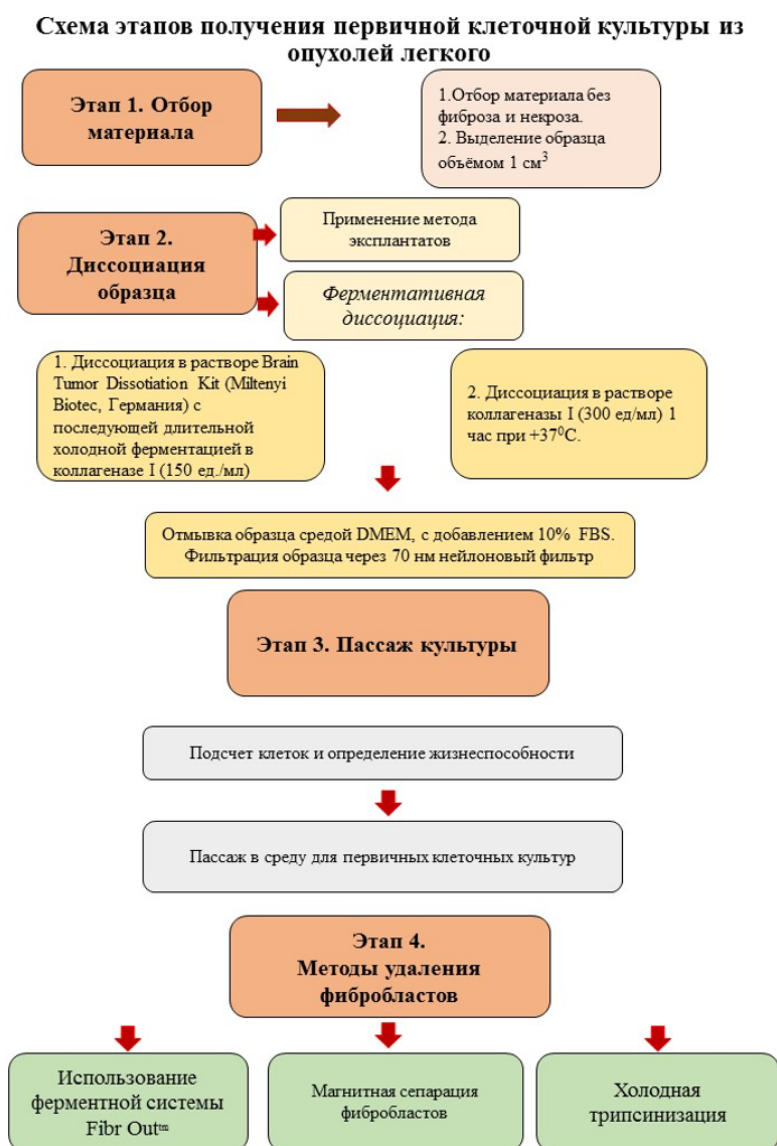


Рис. 1. Схема этапов получения первичных клеточных линий рака лёгкого.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во всех случаях при ферментативной диссоциации материала нам удалось получить суспензию с долей жизнеспособных клеток около 90 %. Причем, жизнеспособность не была снижена даже в образцах, полученных из метастазов, несмотря на их продолжительную инкубацию при пониженной температуре (+4...+8 °C). На 2 сутки после воздействия ферментов наблюдали небольшое количество прикрепившихся клеток, при этом опухолевые клетки образовывали кластеры, а фибробласты наблюдались в виде единичных веретеновидных клеток (рис. 2А). По мере увеличения времени культивирования количество адгезированных клеток росло, фибробласты занимали всю поверхность флакона, а клетки опухоли образовывали единичные кластеры округлой формы (рис. 2Б). Первую замену питательной среды осуществляли на 5 сут.

культивирования, затем каждые 3 сут. Элиминация эритроцитов и клеточного детрита из питательной среды происходила в процессе декантирования отработанной среды.

Эксплантаты приклеплялись ко дну флакона на 2 сутки. В образцах эксплантатов после прикрепления к поверхности чашки Петри наблюдали лишь небольшое количество мигрировавших клеток, у которых к тому же отсутствовали признаки пролиферации даже спустя несколько недель культивирования. Пользуясь тем, что фрагменты ткани опухоли после длительного пребывания в питательной среде стали рыхлыми, остатки эксплантатов подвергали механической диссоциации. Полученный осадок клеток пропускали через 70 нм нейлоновый фильтр и пассировали в культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см². Доля жизнеспособных клеток при таком способе получения первичной культуры рака лёгкого составляла 70–80 %. Через

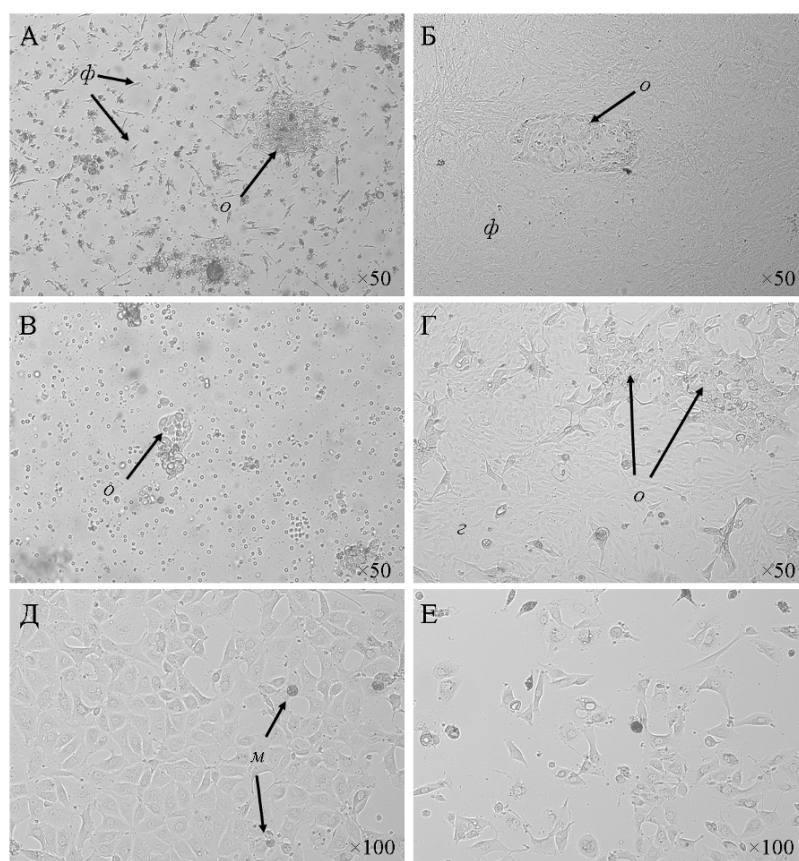


Рис. 2. Вид первичных клеточных линий рака лёгкого. А – клетки после ферментативной диссоциации на 2 сутки культивирования. Б – пролиферация клеток через 7 суток культивирования. В – пролиферация клеток из эксплантата после дезагрегации. Г – первичная культура рака лёгкого, полученная из метастаза в головной мозг. Д – пролиферирующая первичная культура эпителиоподобной морфологии, прошедшая нулевой пассаж. Е – деградация клеточной линии: вакуолизация клеток опухоли. Обозначения: о – клетки опухоли, φ – фибробласты, г – глиальные клетки, м – митозы.

2 суток клетки прикрепились к поверхности флакона, а уже через 7 сут. культивирования наблюдали их пролиферацию (рис. 2В).

Работая с образцами метастазов рака легкого в мозг, зачастую отмечали контаминацию клетками морфологически схожими с глиальными, имеющими веретеновидную форму и полупрозрачные отростки, образующие сеть (рис. 2Г). В отличие от фибробластов, эти клетки не пролиферировали, их пул истощался после каждого пассажа первичных клеточных линий. При большом количестве глиальных клеток проводили дополнительно механическую очистку образца при помощи скрепера под контролем в инвертированном микроскопе в ламинарном боксе.

Во всех культурах, полученных из образцов местнораспространенного рака легкого, наблюдали контаминацию фибробластами (рис. 2Б), для элиминации которых использовали несколько методов очищения. Систему FibrOut™ использовали в 7 образцах. Во всех случаях помимо открепления фибробластов, наблюдали также потерю адгезии и гибель клеток опухоли, что, возможно, было связано с их низкой конfluентностью (не более 20 %) на поверхности культурального флакона. Используя системы для таргетной элиминации фибробластов необходимо учитывать их возможное токсическое влияние на опухолевые клетки и строго выдерживая концентрацию, подбирать безопасные дозировки и время инкубации. Магнитную сепарацию фибробластов с применением Anti-Fibroblast MicroBeads использовали в 7 случаях. После магнитной сепарации сохранялись жизнеспособные опухолевые клетки, которые быстро прикреплялись к поверхности флакона и в дальнейшем активно пролиферировали. Тем не менее,

удаление фибробластов было неполным, и через некоторое время снова наблюдался их рост, что требовало неоднократного проведения повторных сепараций. При использовании холодной трипсинизации (6 образцов) наблюдали наименее полное удаление фибробластов с поверхности флакона, так как время выдержки с трипсином было строго ограниченным из-за высокой вероятности потери опухолевых клеток. Для поддержания низкого содержания фибробластов требовалось повторное проведение процедуры холодной трипсинизации, которая проводилась в итоге чаще, чем процедура магнитной сепарации фибробластов. Сравнительная характеристика методов удаления фибробластов из первичной культуры рака лёгкого представлена в таблице 1.

По результатам исследования были получены 25 первичных клеточных культур рака легкого, из которых только 15 прошли нулевой пассаж и были криоконсервированы на 1, 2 и 4 пассажах. Клетки успешных линий были распластаны в монослое (конfluентность – 100 %) по дну флаконов, имели преимущественно полигональную форму, соответствующую эпителиальной морфологии, наблюдались единичные митозы (рис. 2Д). В остальных линиях наблюдали в течение 21 дня постепенную деградацию клеток: вакуолизацию и открепление от адгезионной поверхности (рис. 2Е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс создания первичных клеточных культур из опухолей легких сопровождается некоторыми сложностями, по сравнению с другими типами эпителиальных тканей, и вероятность успешного выхода первичных культур клеток рака легких

Таблица 1. Сравнение методов удаления фибробластов из первичной культуры рака лёгкого

	FibrOut™	Anti-Fibroblast MicroBeads	Холодная трипсинизация
Сокращение доли фибробластов, %	100 %	80 %	40 %
Влияние на жизнеспособность клеток опухоли	Оказывает токсическое воздействие на клетки опухоли. Необходим подбор оптимального времени культивирования.	Не оказывало влияния на жизнеспособность клеток опухоли.	Не оказывало влияния на жизнеспособность клеток опухоли.
Оптимальная частота процедуры для достижения эффекта	Культивирование совместно с системой FibrOut™ в течении 3–5 дней. Повтор процедуры не требуется.	Для полного разделения опухолевых клеток и фибробластов необходимо проводить 2–3 процедуры магнитной сепарации.	Для полной элиминации фибробластов необходимо проводить 3–4 процедуры.

составляет не более 40 % [21], что соответствует и нашему опыту. Другие авторы отмечают многоядерность клеток и вакуолизацию цитоплазмы [22], постепенную деградацию опухолевых клеток в ходе длительного культивирования [19].

В данной работе мы применяли методики ферментативной диссоциации с коллагеназой I как наиболее эффективные для получения первичных клеточных линий [19]. Коктейли ферментов активно используются исследователями для получения сфероидов и органоидов рака легкого, имеющих аналогичные свойства и генетические мутации, что и у исходной опухоли [22]. Коллагеназа I постепенно расщепляет коллагеновые фибриллы, при этом становятся доступными новые участки волокна для взаимодействия с ферментом. Деградация коллагена и внеклеточного матрикса приводит к высвобождению клеток из опухолевой ткани [23]. В своей работе мы также подтвердили, что инкубирование образца рака легкого с коллагеназой в течение 1 ч. не угнетает другие клетки, сохраняет их жизнеспособность, адгезивную и пролиферативную способность.

Эксплантаты являются эффективной моделью для тестирования лекарственных препаратов для многих нозологий солидного рака [24]. В частности, в работе Karekla с соавт. эксплантаты немелкоклеточного рака легкого использовались в качестве *ex vivo* модели для оценивания ответа на терапию цисплатином [14]. В нашей работе предполагалось долгосрочное культивирование, в ходе которого, как мы полагали, опухолевые клетки начнут выходить из эксплантата, что наблюдалось в нашей практике ранее при работе с глиальными опухолями [25] и раком предстательной железы, когда миграция клеток опухоли на пластик происходила в течение недели [26]. Однако в настоящей работе во всех случаях длительное культивирование не привело к выходу достаточного количества клеток опухоли из эксплантата на культуральный пластик. Какие биологические особенности рака лёгкого лежат в основе низкой подвижности клеток опухоли в первичной культуре, ещё предстоит установить.

Важным аспектом работы с опухолевым материалом, полученным из ткани лёгких, является удаление фибробластов, в большом количестве присутствующих в данном типе ткани. Известно, что фибробласты являются источником целого ряда сигнальных воздействий, регулирующих пролиферацию и подвижность клеток опухоли как *in situ* [27], так и в культуре [28]. Несмотря на то, что фибро-

бласты могут поддерживать рост клеток опухоли в культуре [29], их чрезмерное разрастание приводит к ограничению пролиферации опухолевых клеток, так как фибробласты в условиях *in vitro* делятся быстрее и постепенно вытесняют клетки опухоли из флакона. В связи с этим тактика регулярного «прореживания» фибробластов с применением методов холодной трипсинизации и магнитного клеточного сортирования, которую мы реализовали в своей работе, является наиболее удачной для образцов с небольшим количеством опухолевых клеток, так как позволяет сохранить сигнальные функции фибробластов при сдерживании их чрезмерного размножения. Однако на более поздних этапах, когда опухолевые клетки достигнут необходимой для успешного культивирования клеточной плотности, а также в образцах с количеством клеток опухоли, изначально достаточным для создания необходимого контактного взаимодействия, поддерживающего их жизнеспособность и пролиферацию, может быть рекомендован переход к более радикальным методам удаления фибробластов, например, к применению коммерческих систем FibrOut™ (CHI Scientific, США) или Genetecin™ (Thermo Fisher Scientific, США), предназначенных для таргетного подавления этого типа клеток.

Наконец, решающим фактором, определяющим успех культивирования первичных клеточных линий, является выбор питательной среды. В своей работе мы не ставили цель подбора оптимальной среды для введения в культуру клеток рак лёгкого, а воспользовались готовыми коммерческими решениями и опытом других авторов. На первом пассаже мы использовали среду Primary Cancer Culture System (PromoCell®, Германия) для первичных клеточных линий с добавками производителя. Используемая нами на более поздних сроках культивирования среда была приготовлена на основе питательной среды DMEM – одной из наиболее распространенных и широко используемых сред при культивировании различных опухолевых клеток, в том числе с высокой скоростью пролиферации [30]. В состав среды также входила фетальная бычья сыворотка (10 %), смесь инсулина-трансферрина-селенита натрия (1 %), 10 нг/мл FGF-2, 10 нг/мл EGF и раствор незаменимых аминокислот (1 %). Сыворотка, незаменимые аминокислоты и добавка инсулина-трансферрина-селенита являются необходимыми компонентами для поддержания жизнедеятельности клеток, проходящих адаптацию к условиям *in vitro* [31; 32].

Наличие факторов роста, таких как фактор роста фибробластов и эпидермальный фактор роста, необходимо для избирательной стимуляции деления злокачественных клеток опухоли, добавление этих факторов в питательную среду культивирования обусловлено небольшими концентрациями их в сыворотке и является популярным приёмом для повышения эффективности получения первичных клеточных линий рака лёгкого. При этом концентрация факторов роста в среде культивирования в различных работах колеблется от 10 нг/мл [16] до 20 нг/мл [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы были получены 15 первичных клеточных линий рака лёгкого. Наи-

более эффективным методом получения первичной культуры рака лёгкого оказалась ферментативная диссоциация в коллагеназе I с последующим удалением фибробластов с помощью магнитной сепарации. Полученные клеточные линии могут быть использованы для решения широкого круга исследовательских задач в области экспериментальной онкологии. Первичные культуры клеток рака легкого, в отличие от иммортализованных клеточных линий, претерпевающих генетические aberrации с увеличением числа пассажей, имеют биологические характеристики опухолевых клеток близких или идентичным таковым *in vivo*, что делает их идеальными моделями для доклинических исследований новых лекарственных препаратов, исследования биологических особенностей рака лёгкого, создания ксенографтных моделей и др.

Список источников

1. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021, 252 с. Доступно по: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/11/zis-2020-elektronnayaversiya.pdf>, Дата обращения: 29.10.2022.
2. Saab S, Zalzal H, Rahal Z, Khalifeh Y, Sinjab A, Kadara H. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. *Front Immunol.* 2020;11:159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00159>
3. Leitão de Sousa VM, Carvalho L. Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology.* 2018;85(1–2):96–107. <https://doi.org/10.1159/000487440>
4. Knight SB, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol.* 2017 Sep;7(9):170070. <https://doi.org/10.1098/rsob.170070>
5. Li PJ, Roose JP, Jablons DM, Kratz JR. Bioinformatic Approaches to Validation and Functional Analysis of 3D Lung Cancer Models. *Cancers (Basel).* 2021 Feb 9;13(4):701. <https://doi.org/10.3390/cancers13040701>
6. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2010, 691 с.
7. Le H, Seitlinger J, Lindner V, Olland A, Falcoz PE, Benkirane-Jessel N, et al. Patient-Derived Lung Tumors—An Emerging Technology in Drug Development and Precision Medicine. *Biomedicines.* 2022 Jul 12;10(7):1677. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071677>
8. Gazdar AF, Girard L, Lockwood WW, Lam WL, Minna JD. Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Sep 8;102(17):1310–1321. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq279>
9. Галимова Э. С., Галагудза М. М. Двухмерные и трехмерные модели культур клеток опухолей *in vitro*: преимущества и недостатки. Бюллетень сибирской медицины. 2018;17(3):188–196.
10. Кутилин Д. С., Айрапетова А. Г., Анистратов П. А., Пыльцин С. П., Лейман И. А., Карнаухов Н. С. и др. Изменение копийности генов в опухолевых клетках и внеклеточной ДНК у больных аденокарциномой легкого. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019;167(6):731–738.
11. Passaro A, Malapelle U, Del Re M, Attili I, Russo A, Guerini-Rocco E, et al. Understanding EGFR heterogeneity in lung cancer. *ESMO Open.* 2020 Oct;5(5):e000919. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2020-000919>
12. Fidler IJ. Biological heterogeneity of cancer: implication to therapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2012 Aug;8(8):1141–1142. <https://doi.org/10.4161/hv.19643>
13. Zheng C, Sun Y hua, Ye X lei, Chen H quan, Ji H bin. Establishment and characterization of primary lung cancer cell lines from Chinese population. *Acta Pharmacol Sin.* 2011 Mar;32(3):385–392. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.214>

14. Karekla E, Liao WJ, Sharp B, Pugh J, Reid H, Quesne JL, et al. Ex Vivo Explant Cultures of Non-Small Cell Lung Carcinoma Enable Evaluation of Primary Tumor Responses to Anticancer Therapy. *Cancer Res.* 2017 Apr 15;77(8):2029–2039. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1121>
15. Herreros-Pomares A, Zhou X, Calabuig-Fariñas S, Lee SJ, Torres S, Esworthy T, et al. 3D printing novel in vitro cancer cell culture model systems for lung cancer stem cell study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021 Mar;122:111914. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111914>
16. Herreno A, Sanchez M, Rey L, Mejía J, Cañas A, Moreno O, et al. Primary lung cancer cell culture from Transthoracic needle biopsy samples. *Cogent Medicine.* 2018 Jul 23;5:1503071. <https://doi.org/10.1080/2331205X.2018.1503071>
17. Mitra A, Mishra L, Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends in Biotechnology.* 2013 Jun;31(6):347–354. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.006>
18. Филиппова С. Ю., Ситковская А. О., Сагакянц А. Б., Бондаренко Е. С., Ващенко Л. Н., Кечеджиева Э. Э. и др. Выделение опухолевых стволовых клеток рака молочной железы с применением коллагеназы. *Современные проблемы науки и образования.* 2019;(6):147.
19. Seo J, Park SJ, Kim J, Choi SJ, Moon SH, Chung HM. Effective method for the isolation and proliferation of primary lung cancer cells from patient lung tissues. *Biotechnol Lett.* 2013 Aug;35(8):1165–1174. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1189-3>
20. Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology.* 2009 Jan;59(1):31–44. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9190-3>
21. Dai Y, Guo S, Huang S, Zhang J, Zhang Z. Summary of primary culture of human lung cancer cells. *Austin J Cancer Clin Res.* 2018;5(1):1083.
22. Boucherit N, Gorvel L, Olive D. 3D Tumor Models and Their Use for the Testing of Immunotherapies. *Front Immunol.* 2020;11:603640. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603640>
23. Green ML, Breite AG, Beechler CA, Dwulet FE, McCarthy RC. Effectiveness of different molecular forms of C. histolyticum class I collagenase to recover islets. *Islets.* 2017 Nov 2;9(6):177–181. <https://doi.org/10.1080/19382014.2017.1365996>
24. Powley IR, Patel M, Miles G, Pringle H, Howells L, Thomas A, et al. Patient-derived explants (PDEs) as a powerful preclinical platform for anti-cancer drug and biomarker discovery. *Br J Cancer.* 2020 Mar;122(6):735–744. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0672-6>
25. Шамова Т. В., Ситковская А. О., Росторгуев Э. Е., Кузнецова Н. С., Кавицкий С. Э. Получение первичных клеточных линий глиальных опухолей. *Пермский медицинский журнал.* 2020;37(5):79–89.
26. Межева И. В., Шамова Т. В., Ситковская А. О., Шевченко А. Н., Швырев Д. А., Филатова Е. В. и др. Опыт создания первичной культуры рака предстательной железы in vitro. *Современные проблемы науки и образования.* 2020;5:91.
27. Gentles AJ, Hui ABY, Feng W, Azizi A, Nair RV, Bouchard G, et al. A human lung tumor microenvironment interactome identifies clinically relevant cell-type cross-talk. *Genome Biol.* 2020 May 7;21(1):107. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02019-x>
28. Serebriiskii I, Castelló-Cros R, Lamb A, Golemis EA, Cukierman E. Fibroblast-derived 3D matrix differentially regulates the growth and drug-responsiveness of human cancer cells. *Matrix Biol.* 2008 Jul;27(6):573–585. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2008.02.008>
29. Xu Y, Hu YD, Zhou J, Zhang MH. Establishing a lung cancer stem cell culture using autologous intratumoral fibroblasts as feeder cells. *Cell Biol Int.* 2011 May;35(5):509–517. <https://doi.org/10.1042/CBI20100473>
30. Yan X, Zhou L, Wu Z, Wang X, Chen X, Yang F, et al. High throughput scaffold-based 3D micro-tumor array for efficient drug screening and chemosensitivity testing. *Biomaterials.* 2019 Apr;198:167–179.
31. Wu R. Growth of Human Lung Tumor Cells in Culture. 2005, 1–21 p. <https://doi.org/10.1002/0471722782.ch1>
32. Tiran V, Lindenmann J, Brcic L, Heitzer E, Stanzer S, Tabrizi-Wizsy NG, et al. Primary patient-derived lung adenocarcinoma cell culture challenges the association of cancer stem cells with epithelial-to-mesenchymal transition. *Sci Rep.* 2017 Aug 30;7(1):10040. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09929-0>

Информация об авторах:

Межева Ирина Валентиновна [✉] – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>, SPIN: 3367-1741, AuthorID: 1011695, ResearcherID: AAI-1860-2019, Scopus Author ID: 57296602900

Ситковская Анастасия Олеговна – к.б.н., заведующая лабораторией клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>, SPIN: 1659-6976, AuthorID: 791081, ResearcherID: E-7496-2018, Scopus Author ID: 56381527400

Филиппова Светлана Юрьевна – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>, SPIN: 9586-2785, AuthorID: 878784, ResearcherID: AAN-4408-2020, Scopus Author ID: 57189618843

Шамова Татьяна Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4555-8556>, SPIN: 5426-1873, AuthorID: 1051985, ResearcherID: AAR-3198-2021, Scopus Author ID: 57221303597

Тимофеева Софья Владимировна – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5945-5961>, SPIN: 5362-1915, AuthorID: 1064599, ResearcherID: AAN-4834-2020, Scopus Author ID: 57243356500

Гненная Надежда Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. <https://orcid.org/0000-0002-3691-3317>, SPIN: 9244-2318, AuthorID: 900758, ResearcherID: V-5582-2018, Scopus Author ID: 57214806863

Новикова Инна Арнольдовна – к.м.н., заместитель генерального директора по науке, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>, SPIN: 4810-2424, AuthorID: 726229, ResearcherID: E-7710-2018, Scopus Author ID: 57202252773

Харагезов Дмитрий Акимович – к.м.н., врач-онколог, заведующий отделением торакальной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0640-2994>, SPIN: 5120-0561, AuthorID: 733789, ResearcherID: AAZ-3638-2021, Scopus Author ID: 56626499300

Милакин Антон Григорьевич – врач-онколог отделения торакальной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2589-7606>, SPIN: 7737-4737, AuthorID: 794734, Scopus Author ID: 57192109933

Лейман Игорь Александрович – к.м.н., врач-онколог отделения торакальной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2572-1624>, SPIN: 2551-0999, AuthorID: 735699, Scopus Author ID: 57225151943

Статешный Олег Николаевич – врач-онколог отделения торакальной онкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4513-7548>, SPIN: 9917-1975, AuthorID: 1067071

Росторгуев Эдуард Евгеньевич – д.м.н., заведующий отделением нейроонкологии, врач-нейрохирург, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2937-0470>, SPIN: 8487-9157, AuthorID: 794808, Scopus Author ID: 57196005138

Атмачиди Дмитрий Панаетович – к.м.н., врач-нейрохирург отделения нейроонкологии, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3937-8003>, SPIN: 6800-1457, AuthorID: 794785, Scopus Author ID: 57189576376

Лаптева Татьяна Олеговна – заведующая патологоанатомическим отделением, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6544-6113>, SPIN: 2771-3213, AuthorID: 849370, Scopus Author ID: 55895197300

Волошин Марк Витальевич – врач-патологоанатом патоморфологического отделения, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2302-3542>, SPIN: 6122-4084, AuthorID: 969003, ResearcherID: C-5601-2018, Scopus Author ID: 57221474658

Еремин Константин Станиславович – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9331-3353>, SPIN: 9865-0123, AuthorID: 1150930, ResearcherID: AIE-7050-2022

Сухарь Ирина Александровна – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1282-4811>, SPIN: 8387-1938, AuthorID: 1147554

Вклад авторов:

Межевова И. В. – обработка материала, написание статьи;

Ситковская А. О. – идея, научное редактирование;

Филиппова С. Ю. – написание статьи, научное и графическое редактирование текста;

Шамова Т. В. – сбор материала;

Тимофеева С. В. – сбор материала;

Гненная Н. В. – сбор материала;

Новикова И. А. – научное редактирование текста;

Харагезов Д. А. – получение опухолевого материала;

Милакин А. Г. – получение опухолевого материала;

Лейман И. А. – получение опухолевого материала;

Статешный О. Н. – получение опухолевого материала;

Росторгуев Э. Е. – получение опухолевого материала;

Атмачиди Д. П. – получение опухолевого материала;

Лаптева Т. О. – гистологическая верификация;

Волошин М. В. – нарезка опухолевого материала;

Еремин К. С. – нарезка опухолевого материала;

Сухарь И. А. – нарезка опухолевого материала.