

## ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ОРГАНОВ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ К ЦИСПЛАТИНУ

Заикина Е.В.<sup>1</sup>, Воловик В.Г.<sup>2</sup>, Енгибарян М.А.<sup>1</sup>, Кононенко В.И.<sup>2</sup>, Курбанова Л.З.<sup>1</sup>, Лысенко И.Б.<sup>1</sup>, Пандова О.В.<sup>1</sup>, Николаева Н.В.<sup>1</sup>, Касьяненко В.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: katherine\_bio@mail.ru;

<sup>2</sup> Муниципальное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 20 города Ростова-на-Дону»

В результате настоящей работы были получены три первичные клеточные линии рака слизистой оболочки органов ротовой полости от пациентов с продолженным ростом в подлежащие костные структуры. Полученные клеточные линии характеризовались неодинаковыми темпами роста, которые определялись степенью запущенности процесса у пациентов. Для клеточных линий, выделенных из опухолевых фрагментов пациентов № 1 (КК1) и № 2 (КК2), была показана меньшая агрессивность при росте *in vitro*. Для клеточной линии, полученной от донора № 3 (КК3), была показана большая скорость роста, что составило 48 млн/1,5 мл на 96-е сутки культивации в стандартных условиях. При определении чувствительности клеточных линий к цисплатину было выявлено, что наибольший процент клеточного ингибирования наблюдался в отношении КК2 при 45 мкг/мл, что составило 84,8% клеточного ингибирования (IC50 – 19,29 мкг/мл). Для КК1 и КК3 показатель IC50 был равен 19,89 мкг/мл и 24,72 мкг/мл соответственно. Таким образом, все три выделенные клеточные линии с продолженным ростом в нижнюю челюсть чувствительны к цисплатину в разной степени. Причем для клеточной линии, выделенной от пациента со стадией T3N2bM1, характерна большая устойчивость к цисплатину.

Ключевые слова: рак слизистой оболочки полости рта, первичная клеточная линия, доклиническое исследование, цисплатин, резистентность.

## EVALUATION OF SENSITIVITY OF PRIMARY CELL LINES OF CANCER OF THE MUCOUS OF THE ORAL CAVITY TO CIPLATIN

Zaikina E.V.<sup>1</sup>, Volovik V.G.<sup>2</sup>, Yengibaryan M.A.<sup>1</sup>, Kononenko V.I.<sup>2</sup>, Kurbanova L.Z.<sup>1</sup>, Lysenko I.B.<sup>1</sup>, Pandova O.V.<sup>1</sup>, Nikolaeva N.V.<sup>1</sup>, Kasyanenko V.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, e-mail: katherine\_bio@mail.ru;

<sup>2</sup> Municipal budgetary healthcare institution "City Hospital No. 20 of the city of Rostov-on-Don"

We obtained three primary cell cultures of oral mucosa cancer from patients with continued growth into the underlying bone structures. The cell cultures were characterized with different growth rates determined by the disease stage. Cell cultures isolated from the tumor fragments of patients 1 (CC1) and 2 (CC2) were less aggressive growing *in vitro*. The cell culture obtained from patient 3 (CC3) showed a more rapid growth rate: 48 million/1.5 ml by the 96th day of cultivation under standard conditions. The determination of the sensitivity of cell cultures to cisplatin demonstrated the highest percentage of cellular inhibition (84.8%) for CC2 at 45 mcg/ml (IC50 19.29 mcg/ml). The IC50 values for CC1 and CC3 were 19.89 mcg/ml and 24.72 mcg/ml, respectively. Thus, all three isolated cell lines with continued growth into the lower jaw were more or less sensitive to cisplatin. The cell culture isolated from the patient with T3N2bM1 disease stage showed greater resistance to cisplatin.

Keywords: oral mucosa cancer, primary cell culture, preclinical study, cisplatin, resistance.

Первичная культура клеток представляет собой клеточную линию, выделенную из интересующей родительской ткани. Главным преимуществом использования ПКК при проведении доклинических исследований (ДКИ) является большая схожесть с родительской тканью по сравнению с паспортизированными клеточными линиями, которые в результате многочисленных процедур субкультивирования приобретают отличные от родительской ткани молекулярно-генетические характеристики [1-3]. В ряде работ продемонстрированы

различия в результатах *in vitro* исследований цитотоксических эффектов известных препаратов в отношении стандартных культур опухолевых клеток различного происхождения [4-6]. Получение первичных клеточных линий для использования в ДКИ как на этапе *in vitro*, так и на этапе *in vivo* может рассматриваться в качестве стратегии повышения достоверности получаемых результатов.

В настоящее время известны две основные стратегии получения первичных клеточных линий. Главные отличия в протоколах относятся к методам дезинфекции фрагментов свежерезецированной опухолевой ткани и использованию различных питательных сред, оптимальных как для получения клеточной линии, так и для последующей культивации [7]. Использование метода прямой эксплантации активно применяется в экспериментах по получению клеточных линий рака слизистой оболочки щек и десен, однако трудности, связанные с обработкой многослойного образца, приводят к контаминации вирусными и бактериальными агентами и невозможности последующего использования при перевивке лабораторным животным [8]. Эффективность использования метода ферментативной сегрегации при получении первичной клеточной линии рака слизистой оболочки органов ротовой полости (РСООРП) была продемонстрирована Klingbeil M. и коллегами в 2009 году. В качестве критериев сравнительной оценки описанных методов авторами были использованы: формирование колоний, продолжительность жизни культивируемых клеток и время образования монослоя при культивации в сходных условиях. Было продемонстрировано, что ферментативный метод обеспечивает наилучшие результаты для первичной культуры кератиноцитов полости рта человека по сравнению с методом прямого эксплантата [9].

В условиях повышения роста заболеваемости и смертности РСООРП особое значение приобретает необходимость проведения ДКИ средств, потенциально обладающих противоопухолевым эффектом [10]. Резистентность к цисплатину, являющемуся препаратом первой линии химиотерапии, долгое время остается серьезной проблемой, препятствующей лечению больных РСООРП. Альтернативные методы медикаментозного лечения препаратами платины демонстрируют меньшую эффективность по сравнению с цисплатином в той же дозировке [11]. В связи с этим целью настоящего исследования явилось получение и характеристика чувствительности первичных клеточных линий РСООРП и характеристика их чувствительности в отношении цисплатина.

### **Материалы и методы исследования**

#### *Характеристика доноров опухолевого материала*

Для получения первичных клеточных линий проводили интраоперационный забор опухолевого материала от трех пациентов с поражением нижней челюсти в результате

продолженного роста РСООРП. От каждого пациента было получено письменное согласие на передачу биологического материала. Критериями исключения пациентов являлись начальная стадия без поражения подлежащих костных структур, наличие сопутствующих заболеваний вирусной этиологии, ВПЧ отрицательный статус.

Общая характеристика доноров представлена в таблице.

Характеристика доноров опухолевого материала

<i>Номер пациента</i>	<i>Пол</i>	<i>Возраст</i>	<i>Курение</i>	<i>Стадия</i>	<i>Точка взятия материала</i>	
<i>№ 1</i>	Муж	72	Нет	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	Распространение опухолевой инфильтрации по слизистой оболочке дна полости рта. Близость края опухоли к нижней челюсти	Граница пораженных костной и мягкой тканей. Альвеолярный отросток
<i>№ 2</i>	Муж	69	Нет	T <sub>3</sub> N <sub>1b</sub> M <sub>0</sub>	Распространение опухоли на альвеолярный отросток нижней челюсти с костной деструкцией	Мягкие ткани, окружающие альвеолярный отросток
<i>№ 3</i>	Муж	64	Да	T <sub>3</sub> N <sub>2b</sub> M <sub>1</sub>	Распространение опухоли на кость нижней челюсти с деструкцией	Мягкие ткани, окружающие тело нижней челюсти

Точкой сбора образцов для всех пациентов являлись мягкие ткани, окружающие пораженные участки кости. Объем донорского образца составлял 7\*7\*7 мм<sup>3</sup>. Свежерезецированный опухолевый материал помещали в 5 мл среды DMEM (Thermo Fisher Scientific, Gibco™), после чего приступали к процедуре выделения клеточных линий.

#### *Получение первичных клеточных линий*

Получение первичных клеточных линий проводили согласно стандартному протоколу. Для удаления сгустков крови и некротизированных тканей опухолевые фрагменты отмывали в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, Gibco™), после чего проводили обработку донорского материала путем инкубации в растворе стрептомицина (ОАО «Биохимик», Россия) в концентрации 100 мкг/мл. Среду удаляли и проводили измельчение ткани скальпелем до получения однородной массы. Процедуру ферментативной сегрегации проводили путем инкубации в присутствии трипсина при 37 °С в течение 1 часа при постоянном

перемешивании. Для разделения образовавшихся скоплений клеток использовали 0,25% трипсин-ЭДТА (Thermo Fisher Scientific, Gibco™). Для нейтрализации ферментативной активности использовали среду для культивации. Полученные клеточные суспензии культивировали в DMEM с 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Thermo Fisher Scientific, Gibco™) и 1% клатримидом («ДАЛЬХИМФАРМ», Россия). Инкубацию клеток осуществляли при 37 °С с содержанием CO<sub>2</sub> 5% (Thermo scientific, США). Смену среды для культивации осуществляли каждые 24 часа. Визуализацию полученных клеточных суспензий осуществляли с помощью инвертированного микроскопа (Leica, Германия). Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева согласно стандартному протоколу и окраске с помощью 0,4% трипанового синего (CORNING, USA).

#### *Оценка чувствительности к цисплатину*

Оценку ответа полученных клеточных линий на стандартные химиопрепараты проводили с помощью анализа метаболической активности клеток с помощью модифицированного метода Мосмана (МТТ-тест) [12]. В качестве тестового цитотоксического препарата использовали цисплатин (Pharmachemie, Нидерланды). Выбор препарата проводили в соответствии с «клиническими рекомендациями по лечению злокачественных образований полости рта от 2020 года» [13].

Полученные первичные клеточные линии РСООРП высевали в 96-луночные планшеты плотностью  $5 \times 10^3$  клеток/лунка и культивировали в клеточном инкубаторе в течение 24 часов при 37 °С с содержанием CO<sub>2</sub> 5%. К клеткам добавляли цисплатин и проводили дальнейшую инкубацию (5% CO<sub>2</sub>, при 37 °С) в течение 24 часов. После чего в лунки добавляли 50 мкл раствора МТТ (2 мг/мл), и планшеты дополнительно инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. Измерение поглощения проводили с помощью анализатора (Thermo Scientific Varioskan Flash, USA) при 540 нм.

Процент ингибирования клеточного роста рассчитывали по следующей формуле:

$$\% \text{ клеточного ингибирования} = 100 - [(At - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100,$$

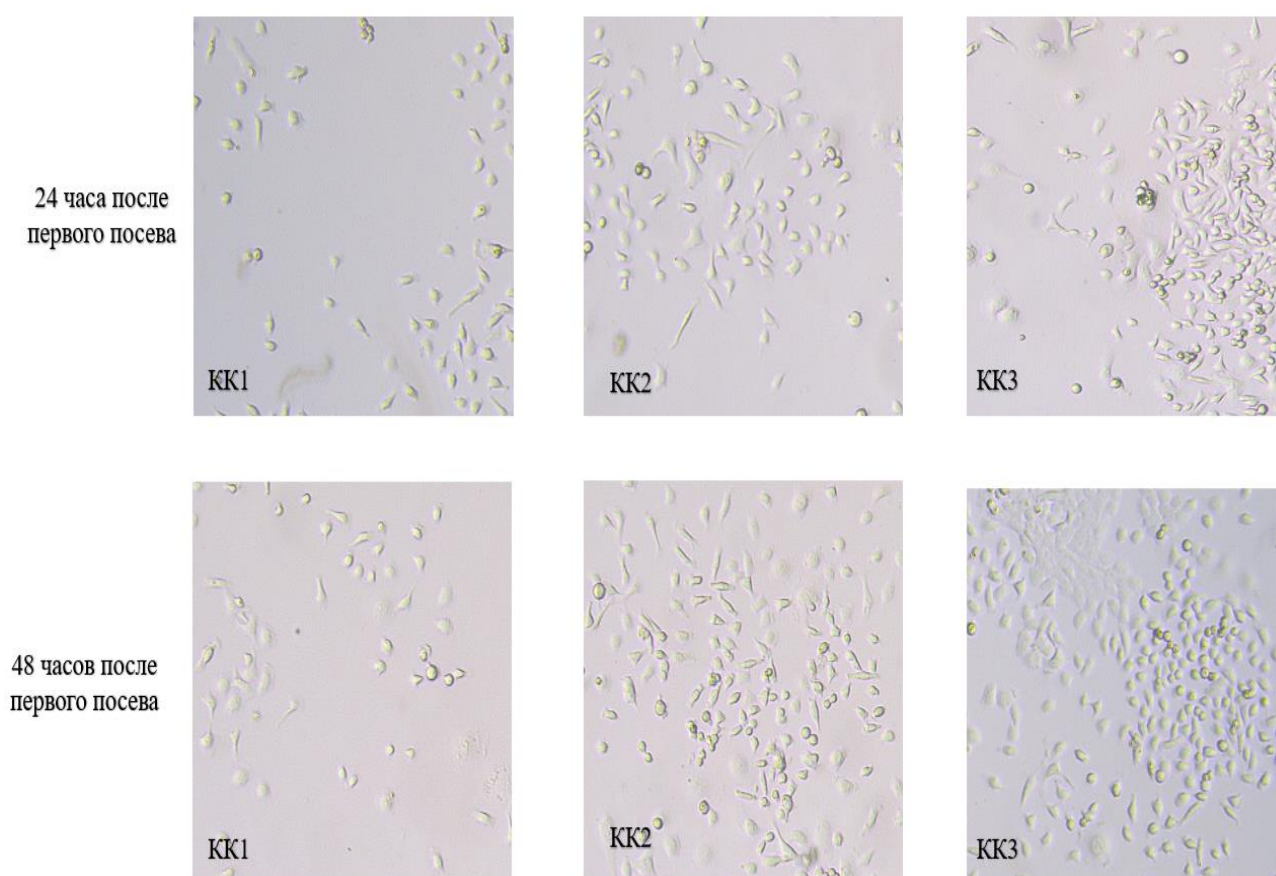
где At = значение абсорбции тестируемого соединения, Ab = значение абсорбции холостого опыта (в качестве значения холостой пробы рассматривали оптическую плотность среды) и Ac = значение абсорбции контроля (в качестве значения контрольного образца рассматривали оптическую в лунках с клетками, не обработанными препаратом).

Начальное состояние живых клеток определяли оптической плотностью контрольных скважин. Кривые пролиферации клеток, зависящие от времени и плотности, были построены с использованием пакета Excel Microsoft (2019). Для определения показателя IC<sub>50</sub> – полулетальной ингибирующей концентрации – использовали онлайн-калькулятор «Биоквест ААТ» (aatbio.com). Для оценки статистической значимости различий сравниваемых групп

использовали тест ANOVA с применением критерия Тьюки для равных выборок. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

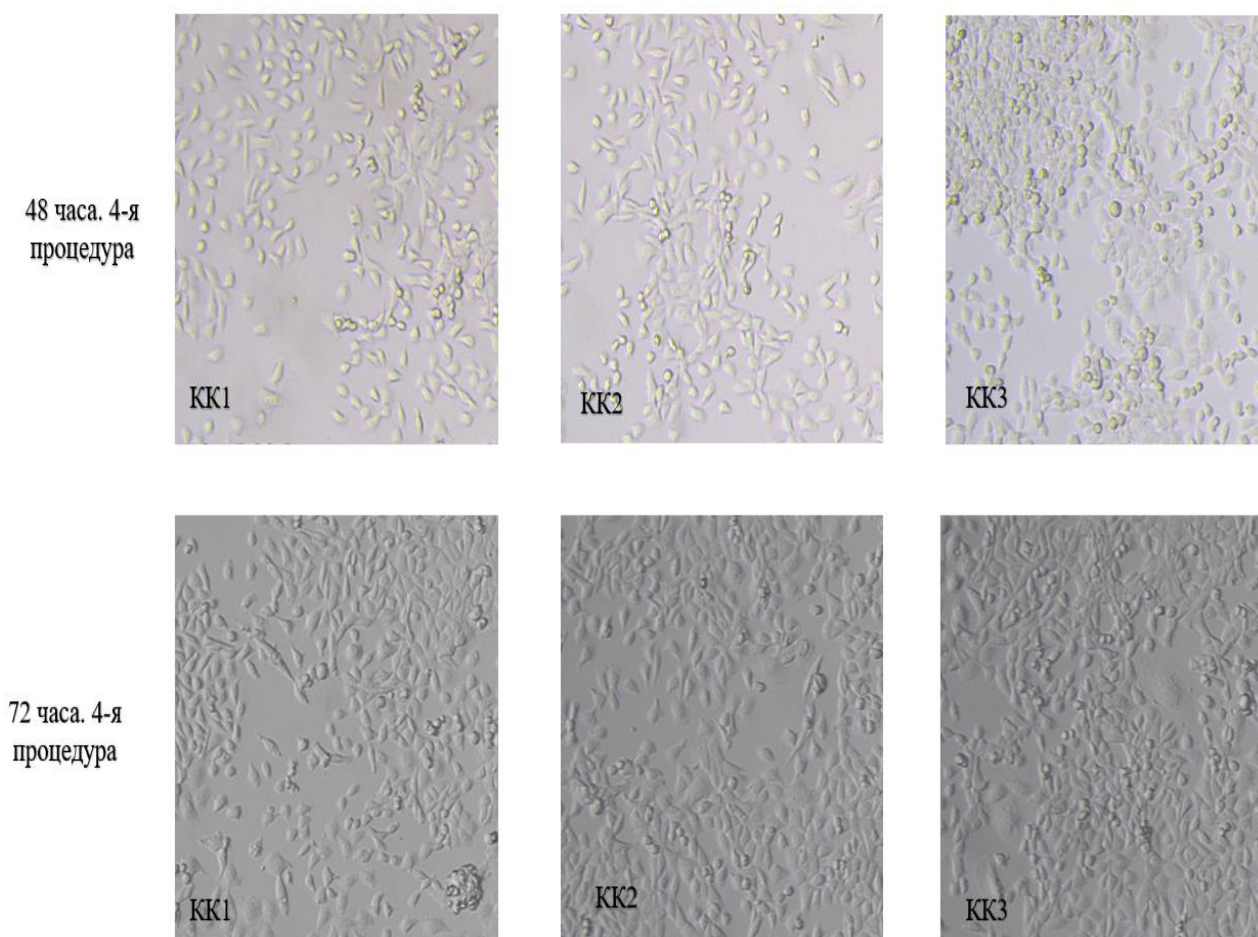
В настоящей работе с помощью метода ферментативной сегрегации были выделены первичные клеточные линии, полученные от трех больных раком слизистой оболочки дна полости рта с поражением подлежащих структур лицевого отдела черепа, в частности нижней челюсти. Полученные клеточные суспензии культивировали, регистрируя количество адгезированных и делящихся клеток. Результаты культивации на 24 и 48 часов после посева выделенных клеточных суспензий из свежерезецированных опухолевых фрагментов представлены на рисунке 1.



*Рис. 1. Рост полученных клеток рака слизистой оболочки дна полости рта на 24 и 48 час*

Примечание: KK1 – клеточная линия, полученная от донора № 1; KK2 – клеточная линия, полученная от донора № 2; KK3 – клеточная линия, полученная от донора № 3.

При определении темпов роста и формирования клеточного монослоя на этапе первого пересева культуры клеток отмечали тенденцию к снижению темпов роста после 48 часов культивации. Для оптимизации роста клеточных линий проводили процедуру 3-кратного пересева. Результаты четвертой процедуры пересева полученных клеточных линий РСООРП на 48 и 72 часа представлены на рисунке 2.

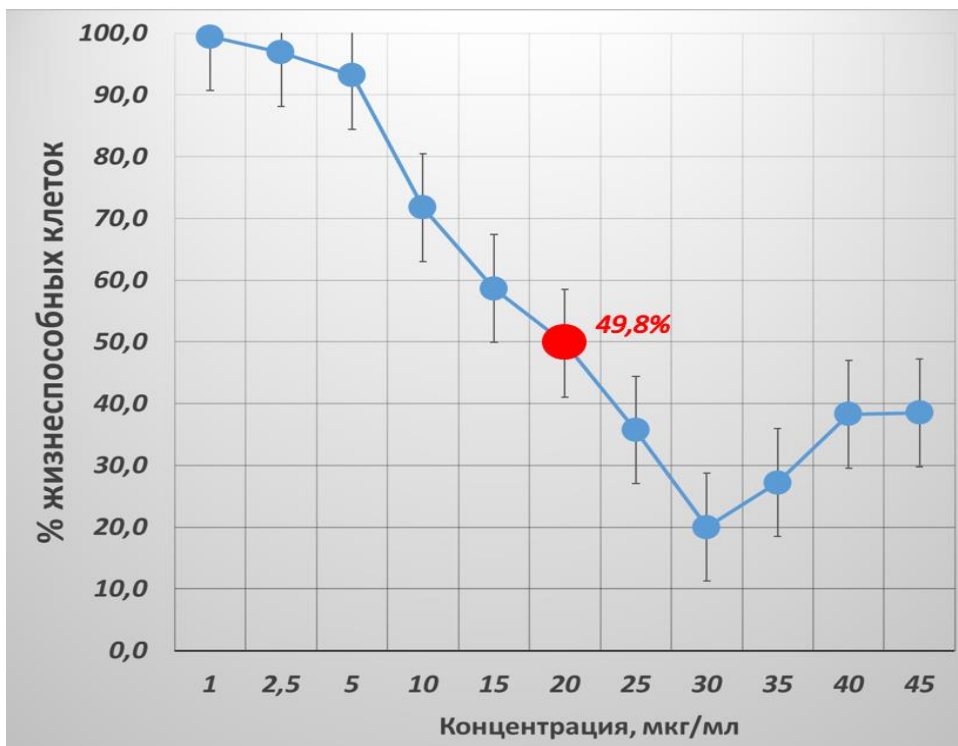


*Рис. 2. Рост полученных клеточных линий рака слизистой оболочки дна полости рта на 48 и 72 час. 4-я процедура*

При проведении оценки темпов роста полученных клеточных линий было выявлено, что КК3 характеризуется наиболее быстрым ростом и формированием монослоя. Как показано на рисунке 2, как на 48 часов, так и на 72 часа после процедуры пересева КК3 отличается большим процентом зарастания поля зрения по сравнению с КК1 и КК2. Причем темпы роста КК1 и КК2 были соизмеримы. Так, при проведении подсчета клеток в камере Горяева на 96-е сутки после пересева концентрация клеток КК3 составила 48 млн/1,5 мл против 29 млн/1,5 мл КК1 и 33 млн/1,5 мл КК2.

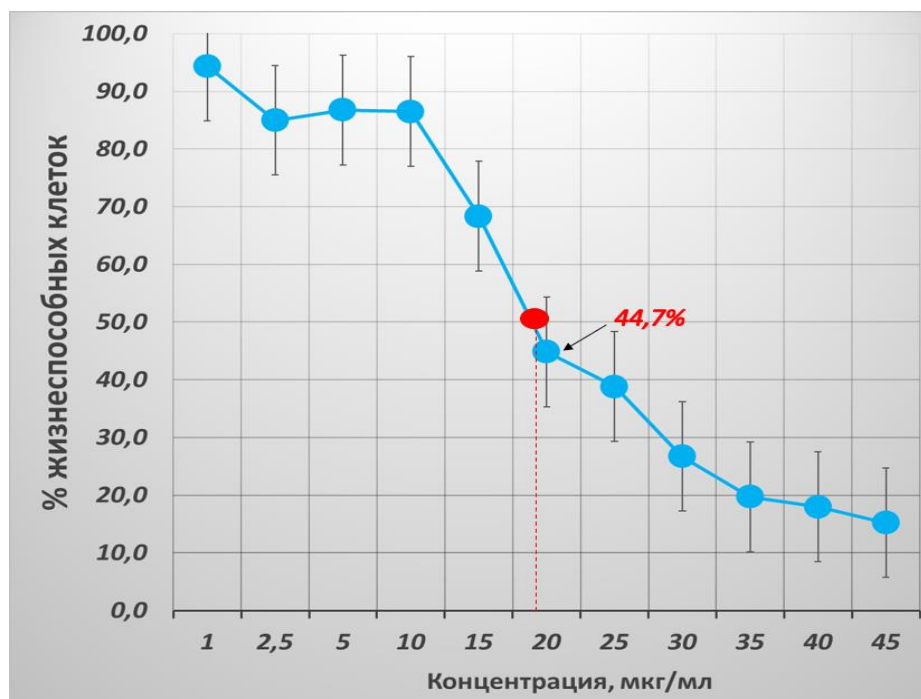
При изучении чувствительности КК1 к цисплатину в концентрациях от 1 до 30 мкг/мл наблюдался выраженный дозозависимый цитотоксический эффект, с наибольшим процентом клеточного ингибирования 77%. Однако в концентрациях от 35 до 45 мкг/мл наблюдалось статистически значимое повышение процента жизнеспособных клеток. Причем в наибольшей концентрации препарата процент клеточного ингибирования составил 61,5%. При определении показателя IC50 для цисплатина в отношении КК1 было выявлено, что в концентрации 20 мкг/мл процент жизнеспособных клеток составил 49,8%. В связи с этим был проведен анализ с помощью онлайн-калькулятора Quest Graph с использованием

четырёхпараметрической модели логистической регрессии. Полученный показатель IC50 составил 19,89 мкг/мл. Для визуализации характера наблюдаемых изменений показателя жизнеспособности КК1 в зависимости от концентрации цисплатина была построена кривая, представленная на рисунке 3.



*Рис. 3. Процент жизнеспособности опухолевых клеток линии КК1 после 24-часовой инкубации с цисплатином*

При изучении чувствительности КК2 к цисплатину было выявлено дозозависимое снижение показателя жизнеспособности клеток в концентрации от 10 до 45 мкг/мл, причем наибольший процент клеточного ингибирования наблюдался в концентрации 45 мкг/мл, что составило 84,8%. В концентрациях менее 10 мкг/мл статистически значимого угнетения жизнеспособности КК2 обнаружено не было. При определении показателя IC50 для цисплатина в отношении КК2 было выявлено, что наиболее близкой точкой (44,7% жизнеспособности клеток) является концентрация 20 мкг/мл. В связи с этим также был проведен анализ с помощью онлайн-калькулятора Quest Graph. Полученный показатель IC50 составил 19,29 мкг/мл. Для визуализации характера наблюдаемых изменений показателя жизнеспособности КК2 в зависимости от концентрации цисплатина была построена кривая, представленная на рисунке 4.



*Рис. 4. Процент жизнеспособности опухолевых клеток линии КК2 после 24-часовой инкубации с цисплатином*

При изучении чувствительности КК3 к цисплатину во всех изучаемых концентрациях наблюдался наиболее выраженный дозозависимый цитотоксический эффект, с наибольшим процентом клеточного ингибирования 82,9% при 45 мкг/мл. При определении показателя IC50 для цисплатина в отношении КК3 было выявлено, что наиболее близкой точкой (48,6% жизнеспособности клеток) является концентрация 25 мкг/мл. Полученный показатель IC50 для цисплатина в отношении КК3 составил 24,72 мкг/мл. Для визуализации характера наблюдаемых изменений показателя жизнеспособности КК3 в зависимости от концентрации цисплатина была построена кривая, представленная на рисунке 5.



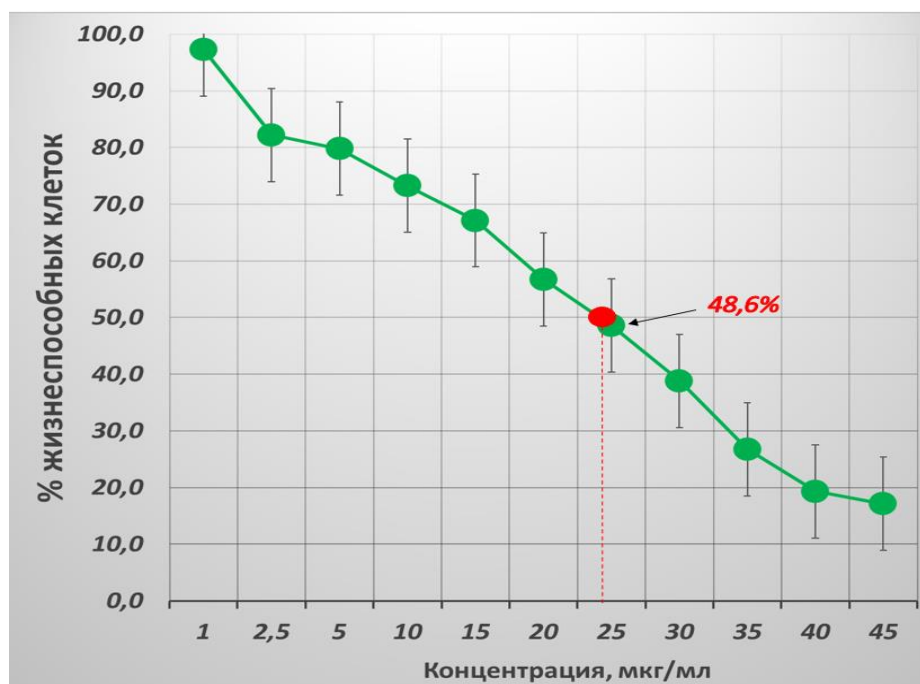


Рис. 5. Процент жизнеспособности опухолевых клеток линии КК3 после 24-часовой инкубации с цисплатином

Использование первичных клеточных линий для моделирования злокачественного процесса представляется оптимальным в связи с более точной имитацией особенностей клинического течения заболевания у человека. Схожесть первичной клеточной линии с родительской тканью позволяет создавать модели, подходящие для проведения оценки цитотоксических эффектов как стандартных препаратов, так и новых субстанций, потенциально обладающих противоопухолевым действием [14]. Вариабельность темпов и характера роста первичных клеточных линий рака при субкультивации *in vitro* является серьезной проблемой использования для проведения ДКИ. В настоящей работе было проведено выделение трех клеточных линий РСООРП от пациентов с поражением нижней челюсти. При культивации в стандартных условиях для трех клеточных линий были показаны статистически значимые отличия темпов роста. Так, клеточная линия КК3, полученная от донора со стадией Т3N2bM1, характеризовалась агрессивным ростом *in vitro* по сравнению с линиями, выделенными из опухолевого материала пациентов со стадиями Т3N0M0 и Т3N1bM0.

Стандартной методикой описания чувствительности клеток и их метаболических особенностей является МТТ-тест. Первичные линии способны отражать резистентность к химиопрепаратам, встречающуюся при проведении медикаментозной терапии и не наблюдаемую при проведении исследований на паспортизованных культурах *in vitro*. Так, для цисплатина, являющегося широко используемым химиотерапевтическим средством, показан рост резистентности. Однако механизм устойчивости к цисплатину, проявляющейся в ряде случаев РСООРП, остается неясным [15]. Нами было показано, что выделенные клеточные

линии характеризуются чувствительностью к цисплатину, но степень чувствительности была различной. Наибольшей чувствительностью к цисплатину в концентрации 45 мкг/мл обладала КК2. В то же время для КК1 был показан наибольший процент клеточного ингибирования при воздействии 30 мкг/мл цисплатина в течение 24 часов, что составило 77%. Дозозависимый цитотоксический эффект цисплатина был характерен только для КК3. При этом при определении показателя IC50 наиболее чувствительной являлась КК2, что составило 19,29 мкг/мл.

В работах Nakamura M. и коллег, напротив, были созданы две первичные клеточные линии плоскоклеточной карциномы слизистой полости рта, одна из которых обладала резистентностью к цисплатину [16]. Клеточная линия, характеризовавшаяся чувствительностью к препарату, демонстрировала процент клеточного ингибирования, отличный от значения, полученного в проведенном нами исследовании. Так, было выявлено, что значение IC50 для чувствительной линии составило  $\approx 1$  мкг/мл. Полученное Nakamura M. значение в 19,3 раза меньше значения IC50, найденного для наиболее чувствительной из выделенных нами линий – КК2. Причем для резистентной линии, полученной авторами, полулетальная ингибирующая концентрация составила  $\approx 6,5$  мкг/мл, что статистически значимо отличается от значений, полученных в настоящем исследовании. Таким образом, выделенные нами клеточные линии характеризуются меньшей чувствительностью к цисплатину по сравнению с резистентной линией РСООРП, выделенной Nakamura M. и коллегами.

В работе тех же авторов также был проведен аналогичный эксперимент по получению первичной клеточной линии РСООРП, однако материалом для получения клеточных культур являлись образцы умеренно дифференцированной плоскоклеточной карциномы нижней десны [17]. Авторами также были созданы две клеточные линии, одна из которых обладала меньшей чувствительностью к цисплатину. Так, значение IC50 для чувствительной линии составило 0,58 мкг/мл против 4,4 мкг/мл для резистентной линии, устойчивость которой к цисплатину была в 7,5 раз выше. Данные, полученные в результате проведенного нами исследования, также отличаются от полученных Nakatani K. и коллегами. Чувствительность выделенной в настоящей работе КК2 отличается от резистентной линии Nakatani K. в 4,4 раза.

Однако цитотоксическое действие цисплатина, оказываемое в отношении выделенных первичных клеточных линий, было сходно с паспортизованными линиями злокачественных образований других нозологий. Так, в работе Mirmalek S.A. и соавторов был изучен эффект цисплатина на клеточную линию рака молочной железы MCF-7 и показаны результаты, сходные с полученными в настоящем исследовании [18]. При определении цитотоксического действия цисплатина на жизнеспособность MCF-7 авторами было выявлено, что LD50 для

цисплатина при воздействии в течение 24 часов составило 20 мкг/мл, что статистически значимо не отличается от полученных нами результатов. Наблюдаемое сходство значений может быть связано с тем, что для клеточных линий КК1, КК2 и КК3 и МСF-7 родительской тканью являлись опухоли, характеризующиеся продолженным ростом в окружающие ткани и метастазированием в лимфатические узлы. Происхождение данных линий и агрессивность течения заболевания у доноров опухолевого материала являются причиной меньшей чувствительности клеточных линий к цисплатину по сравнению с линиями, полученными в работах Nakamura M. и Nakatani K., для которых донорами являлись больные РСООРП с локализованным злокачественным процессом.

### **Заключение**

В результате настоящего исследования были получены три первичные клеточные линии рака слизистой оболочки органов ротовой полости от трех пациентов с III стадией заболевания и различной степенью поражения подлежащих структур. При определении чувствительности клеточных линий была выявлена различная степень чувствительности к цисплатину. Причем для клеточной линии, выделенной от пациента с наиболее распространенным процессом (Т3N2bM1), была характерна большая устойчивость к препарату при IC50, равной 24,72 мкг/мл.

### **Список литературы**

1. Belfiore L., Aghaei B., Law A. M., Dobrowolski J. C., Raftery L. J., Tjandra A. D., Yee C., Piloni A., Volkerling A., Ferris C. J., Engel M. Generation and analysis of 3D cell culture models for drug discovery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021. Т. 163. С. 105876.
2. Kit O.I., Shikhlyarova A.I., Maryanovskaya G.Y., Barsukova L.P., Kuzmenko T.S., Zhukova G. V., Maschenko N.M. Theory of health: successful translation into the real life. *General biological prerequisites. Cardiometry*. 2015. № 7. С. 11.
3. Patel A.K., Ghosh S., Das S., Das C., Das K., Sarkar A., Thatikonda V., Pal B., Remani A.S.N., Arora N., Parihar M., Vijayakumar M.V., Bhat M. K., Boppana R., Bhattacharjee S., Biswas N. K., Arun P., Sharan R., Singh S. Two novel cell culture models of buccal mucosal oral cancer from patients with no risk-habits of tobacco smoking or chewing. *Oral Oncology*. 2021. Т. 113. С. 105131.
4. He Y., Chen D., Yang L., Hou Q., Ma H., Xu X. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. *Stem cell research & therapy*. 2018. Т. 9. № 1. С. 1-7.

5. Avanesov A.M., Gvozdikova E.N., Tarasova T.V., Ali H.D., Vinogradova A.A., Zaharkin I.A. The influence of the quality of individual oral hygiene on the severity of post-radiation mucositis in patients with squamous cell carcinoma of the oropharyngeal region. *South Russian Journal of Oncology*. 2020. T. 1. № 2.
6. He Y., Zhu Q., Chen M., Huang Q., Wang W., Li Q., Huang Y., Di W. The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: A pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016. T. 7. № 43. C. 70803.
7. Bryja A., Popis M., Borowiec B., Dyszkiewicz-Konwińska M., Kocherova I., Angelova-Volponi A., Mehr K., Bruska M., Nowicki M., Kempisty B. Overview of the different methods used in the primary culture of oral mucosa cells. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2019. T. 33. C 397-401.
8. Rosas R.R., Nachbor K.M., Handley N., Mathison G., Wuertz B.R., Ba'th F., Ondrey F.G. Preclinical evidence for pioglitazone and bexarotene combination in oral cancer chemoprevention. *Head & neck*. 2022. T. 44. № 3. C. 661-671.
9. Klingbeil M. F., Herson M. R., Cristo E. B., dos Santos Pinto D. Jr., Yoshito D., Mathor M. B. Comparison of two cellular harvesting methods for primary human oral culture of keratinocytes. *Cell and tissue banking*. 2009. T. 10. № 3. C. 197-204.
10. Su Y. F., Chen Y. J., Tsai F. T., Li W. C., Hsu M. L., Wang D. H., Yang C. C. Current Insights into Oral Cancer Diagnostics. *Diagnostics*. 2021. T. 11. № 7. C. 1287.
11. Qiao X., Zhu L., Song R., Shang C., Guo Y. METTL3/14 and IL-17 signaling contribute to CEBPA-DT enhanced oral cancer cisplatin resistance. *Oral Diseases*. 2021.
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983. T. 65. № 1-2. C. 55-63.
13. Научный совет Министерства Здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации. Злокачественные новообразования полости рта. 2020. С. 24-25.
14. Wilding J. L., Bodmer W. F. Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer research*. 2014. T. 74. № 9. C. 2377-2384.
15. Meng X., Lou Q. Y., Yang W. Y., Wang Y. R., Chen R., Wang L., Xu T., Zhang L. The role of non-coding RNAs in drug resistance of oral squamous cell carcinoma and therapeutic potential. *Cancer Communications*. 2021. T. 41. № 10. C. 981-1006.
16. Nakamura M., Nakatani K., Uzawa K., Ono K., Uesugi H., Ogawara K., Shiiba M., Bukawa H., Yokoe H., Wada T., Fujita S. Tanzawa H. Establishment and characterization of a cisplatin-

resistant oral squamous cell carcinoma cell line, H-1R. *Oncology reports*. 2005. V. 14. № 5. P. 1281-1286.

17. Nakatani K., Nakamura M., Uzawa K., Wada T., Seki N., Tanzawa H., Fujita S. Establishment and gene analysis of a cisplatin-resistant cell line, Sa-3R, derived from oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2005. V. 13. № 4. P. 709-714.

18. Mirmalek S. A., Azizi M. A., Jangholi E., Yadollah-Damavandi S., Javidi M. A., Parsa Y., Parsa T., Salimi-Tabatabaee S. A., Ghasemzadeh kolagar H., Alizadeh-Navaei R. Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of *Hypericum perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cancer cell international*. 2015. V. 16. № 1. P. 1-9.