

Гетерогенность раковых стволовых клеток и сфероидные структуры в различных клеточных культурах злокачественных опухолей

Е.А. Коган¹, С.Т. Авраамова¹, Г.А. Меерович^{1,2}, С.Ш. Каршиева³, Г.И. Вдовина³, И.Г. Меерович⁴,
А.Д. Романовская¹, Е.Е. Щелокова¹, Н.В. Жарков¹, Т.А. Демура¹, И.В. Решетов¹

¹ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

² ФГБУН ФИЦ Институт общей физики имени А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Институт биомедицинской инженерии, Москва, Россия

⁴ ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии имени А.Н. Баха, Москва, Россия

Резюме. Введение. Высокая летальность, рецидивирование опухолей и устойчивость к терапии – важнейшие проблемы онкологии, во многом связанные с наличием в их составе особой популяции опухолевых клеток – раковых стволовых клеток. Они резистентны к воздействиям, способны к самообновлению и созданию дочерних клеток, дифференцировке и эпителиально-мезенхимальной трансформации. Остается нерешенным вопрос, существует в опухоли один тип раковых стволовых клеток или речь идет о возможной иерархии гетерогенных раковых стволовых клеток. Цель нашей работы – проанализировать гетерогенность раковых стволовых клеток по экспрессии маркеров стволовости и их связь со сфероидными структурами в разнообразных культурах опухолей (глиобластома U-251, глиобластома U-87, рак шейки матки – SiHa, HeLa, рак кожи вульвы A431 и аденокарцинома легкого A549). **Материалы и методы.** Исследование проводилось иммуноцитохимическим методом. В качестве маркеров раковых стволовых клеток применяли антитела к ALDH1, CD133, CD34.

Результаты. В изученных клеточных культурах предположительно обнаружены иерархии гетерогенных раковых стволовых клеток. В аденокарциноме легкого A549 преобладают ALDH1+ и CD34+, в культурах глиобластом U-251 и U-87 – CD133 и ALDH1, а в карциномах шейки матки HeLa, SiHa – все варианты раковых стволовых клеток. В раке вульвы A431 обнаружено наименьшее количество раковых стволовых клеток. Установлено, что в сфероидных структурах отмечаются скопления раковых стволовых клеток, что может соответствовать их нишам, описанным в опухолевой ткани.

Заключение. Понимание биологии раковых стволовых клеток открывает пути к разработке новых методов противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, гетерогенность, иерархия, пластичность, сфероидные структуры

Для корреспонденции: Анна Дмитриевна Романовская. E-mail: kukleva_msmu@mail.ru

Для цитирования: Коган Е.А., Авраамова С.Т., Меерович Г.А., Каршиева С.Ш., Вдовина Г.И., Меерович И.Г., Романовская А.Д., Щелокова Е.Е., Жарков Н.В., Демура Т.А., Решетов И.В. Гетерогенность раковых стволовых клеток и сфероидные структуры в различных клеточных культурах опухолей. Клини. эксп. морфология. 2026;15(4):22–32. DOI: 10.31088/CEM2026.15.4.22-32.

Данная статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Финансирование. Исследование Е.А. Коган, А.Д. Романовской, С.Т. Авраамовой, Г.А. Мееровича, И.В. Решетова выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-45-00020.

Статья поступила 20.03.2026. Получена после рецензирования 26.03.2026. Принята в печать 14.05.2026.

Cancer stem cell heterogeneity and spheroid structures in different tumor cell lines

Е.А. Коган¹, С.Т. Авраамова¹, Г.А. Меерович^{1,2}, С.Ш. Каршиева³, Г.И. Вдовина³, И.Г. Меерович⁴,
А.Д. Романовская¹, Е.Е. Щелокова¹, Н.В. Жарков¹, Т.А. Демура¹, И.В. Решетов¹

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

² A.M. Prokhorov General Physics Institute, Moscow, Russia

³ National University of Science and Technology “MISIS”, Institute of Biomedical Engineering, Moscow, Russia

⁴ Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology”, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow, Russia

Abstract. Introduction. High mortality, tumor recurrence, and resistance to therapy remain major challenges in oncology and are largely attributed to the presence of a distinct population of tumor cells known as cancer

stem cells. They are resistant to adverse conditions and capable of self-renewal daughter cell generation, differentiation, and epithelial–mesenchymal transition. It remains unclear whether tumors contain a single population of stem cells or multiple heterogeneous populations organized in a hierarchical manner. The purpose of our study was to analyze cancer stem cell heterogeneity by investigating marker expression and the association of these cells with spheroidal structures in several tumor cell lines: glioblastoma U-251 and U-87, cervical cancer SiHa and HeLa, vulvar squamous cell carcinoma A431, and lung adenocarcinoma A549.

Materials and methods. Immunocytochemical analysis was performed using antibodies against ALDH1, CD133, and CD34 as cancer stem cell markers.

Results. Hierarchies of heterogeneous cancer stem cells were presumably found in the studied tumor cell lines. ALDH1+ and CD34+ predominate in A549 lung adenocarcinoma; CD133 and ALDH1, in U-251 and U-87 glioblastoma cultures; and HeLa and SiHa, in cervical carcinomas. Vulvar squamous cell carcinoma A431 is characterized by the lowest number of cancer stem cells. Clusters of cancer stem cells were found in spheroidal structures, which may correspond to their niches identified in the tumor tissue.

Conclusion. Understanding cancer stem cell biology may contribute to the development of new therapeutic approaches.

Keywords: cancer stem cells, heterogeneity, hierarchy, plasticity, spheroid structures

Corresponding author: Anna D. Romanovskaya. E-mail: kukleva_msmu@mail.ru

For citation: Kogan E.A., Avraamova S.T., Meerovich G.A., Karshieva S.Sh., Vdovina G.I., Meerovich I.G., Romanovskaya A.D., Shchelokova E.E., Zharkov N.V., Demura T.A., Reshetov I.V. Cancer stem cell heterogeneity and spheroid structures in different tumor cell lines. Clin. exp. morphology. 2026;15(4)22–32 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2026.15.4.00-00.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0).

Funding. The study by E.A. Kogan, A.D. Romanovskaya, S.T. Avraamova, G.A. Meerovich, and I.V. Reshetov was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 24-45-00020.

Received 20.03.2026. **Received in revised form** 26.03.2026. **Accepted** 14.05.2026.

Введение

Злокачественные новообразования остаются одной из ведущих причин смертности в мире, несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении. Рецидивирование опухолей и их устойчивость к терапии связаны с наличием в их составе особой популяции раковых стволовых клеток (РСК). Эти клетки обладают уникальными свойствами: инициацией опухолевого роста даже при крайне малом количестве, резистентностью к различным воздействиям в дормантном состоянии, способностью к самообновлению, дифференцировке, созданию дочерних пролиферирующих клеток и эпителиально-мезенхимальной трансформации [1]. Остается окончательно не решенным вопрос, существует ли в одной опухоли одна РСК или речь идет о возможном существовании гетерогенных РСК, что делает опухоль динамичной и адаптивной системой, а также осложняет их изучение [2]. К универсальным маркерам детекции РСК относят разнообразные молекулы: ALDH1, CD44, CD133, Nanog, Oct4, Sox2 и т.д., однако ни одна из них не является на 100% специфичной для РСК в разных опухолях в связи с экспрессией этих маркеров нормальными стволовыми клетками. Не все РСК зависят от одних и тех же молекулярных путей, поэтому их маркерный профиль может варьировать. Разные субпопуляции РСК могут экспрессировать разные комбинации маркеров [3, 4].

Зависимость типа РСК от вида опухоли отмечена многими специалистами [5–9]. Лишь точное знание

маркеров позволяет создавать органоспецифичные терапевтические стратегии.

В литературе обсуждается вопрос о локализации РСК в сфероидных структурах, которые наиболее подробно были изучены при цервикальной интраэпителиальной неоплазии шейки матки [10]. Сфероидные клеточные структуры впервые описаны при культивировании нормальных [11–14] и раковых клеток молочной железы [15], толстой кишки [16], предстательной железы [17].

Цель исследования – проанализировать гетерогенность РСК в различных клеточных культурах злокачественных опухолей по экспрессии маркеров стволовости и их связь со сфероидными структурами.

Материалы и методы

Исследование выполнено на шести культурах раковых клеток – глиобластомы U-251, глиобластомы U-87 (НТВ-14TM), рака шейки матки SiHa (НТВ-35TM) и HeLa (CRM-CCL-2TM), рака кожи вульвы A431 (CRL-1555TM), аденокарциномы легкого A549 (CRM-CCL-185TM). Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия), раствор пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия), с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (Biowest, Франция) при 37°C и 5% CO₂. Для проведения иммуноцитохимического анализа клетки рассаживали по 10⁶ клеток в 1 мл ростовой среды на стерильные предметные

стекла с полилизинным покрытием StarFrost (Knittel Glass, Германия), помещенные в 15 см чашки Петри, помещали в CO₂-инкубатор и инкубировали в стандартных условиях. Через 24 часа клетки отмывали от среды фосфатно-солевым буфером, затем фиксировали в холодном 96% растворе этанола в течение 30 минут и высушивали при комнатной температуре.

Морфологическое исследование проводилось на стеклах, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммуногистохимические (ИГХ) реакции ставили на стеклах, покрытых полилизин, по общепринятому протоколу [18]. В качестве первичных применялись антитела к ALDH1 (Huabio, KHP, Polyclonal Rabbit Antibody, разведение 1:200), CD133 (Huabio, KHP, Polyclonal Rabbit Antibody, разведение 1:500), CD34 (Huabio, KHP, Polyclonal Rabbit Antibody, разведение 1:2000), маркер пролиферации Ki67 (readytouse, Novocastra/Leica Biosystems, Великобритания), маркер апоптоза CASP3 (readytouse, Novocastra/Leica Biosystems, Великобритания). Выбор маркеров РСК основывался на универсальности их экспрессии в исследованных нами клеточных культурах [3–9]. В качестве вторичных использовали антитела к антимышным и антикроличьим иммуноглобулинам, ставили положительные (к ALDH1 на срезах ткани печени, к CD133 на срезах ткани почки, к CD34 на срезах ткани маточной трубы) и отрицательные контроли (ИГХ реакция без внесения соответствующего антитела). Оценка результатов реакций проводилась морфометрически путем подсчета процента клеток опухоли со специфическим окрашиванием ядра и/или цитоплазмы на 3000 клеток опухоли, выраженного в процентах.

Определялось также количество сфероидных структур (СФС) путем подсчета 3000 клеток с расчетом их среднего количества на 1000 клеток. Мы оценивали их количество, размеры и клеточный состав с расчетом коэффициента корреляции Пирсона с процентным содержанием разных типов РСК и пролиферативной активности [19]. Статистическая обработка данных выполнялась на персональном компьютере с использованием электронных таблиц Microsoft Excel. Все полученные качественные, количественные, клинические данные обрабатывали с помощью метода вариационной статистики. В описательной статистике использовались минимальные и максимальные значения, средние арифметические значения, средние квадратические отклонения. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Культура клеток аденокарциномы легкого (A549). В препаратах культура клеток представлена пластом атипичных клеток цилиндрической и полигональной формы с полиморфными ядрами и СФС, в среднем восемь в поле зрения при $\times 200$, размерами от 50 до 100 мкм и содержащих примерно от 30 до 70 клеток (рис. 1 А).

При ИГХ исследовании выявлена различная частота РСК по изученным маркерам стволовости, содержащимся в цитоплазме опухолевых одноядерных и многоядерных клеток ALDH1 (25% раковых клеток), CD34 (30%), CD133 (10%), сосредоточенных в основном в СФС в разных количествах (рис. 2 А, 3 А, 4 А, табл.). Кроме того, СФС содержали и раковые клетки, не имевшие изученных нами маркеров РСК.

Клеточные культуры глиобластомы U-251 и U-87 представлены пластами отростчатых клеток с полиморфными ядрами, гигантскими многоядерными клетками от трех до пяти в поле зрения, отдельными СФС небольших размеров (от 30 до 40 мкм), в количестве в среднем до четырех в поле зрения при $\times 200$ (рис. 1 В, С). При ИГХ исследовании выявлена различная частота РСК по изученным маркерам стволовости содержащимся в цитоплазме опухолевых одноядерных и многоядерных клеток, а также в клетках сфероидных структур: для U-251 – ALDH1 (25%), CD133 (40%), CD34 (7%) (рис. 2 В, 3 В, 4 В, табл.); для U-87 – наибольшее количество CD133 (18%), меньше – ALDH1 (10%) и наименьшее количество CD34 (2%) (рис. 2 С, 3 С, 4 С, табл.).

Культуры клеток плоскоклеточного рака шейки матки SiHa и аденокарциномы шейки матки HeLa представлены пластами атипичных клеток веретеновидной и полигональной формы с полиморфными ядрами, единичными гигантскими многоядерными клетками с формированием в среднем шести СФС (культура SiHa) и семи СФС (культура HeLa) разных размеров (от 25 до 70 мкм) в поле зрения при $\times 200$ (рис. 1 D, E). При ИГХ исследовании выявлена различная частота РСК по изученным маркерам стволовости, содержащимся в цитоплазме опухолевых одноядерных и многоядерных клеток, а также в клетках сфероидных структур: для SiHa – ALDH1 (40%), CD133 (20%), CD34 (25%) (рис. 2 D, 3 D, 4 D, табл.); для HeLa – ALDH1 (30% раковых клеток), CD133 (45%), CD34 (40%) (рис. 2 E, 3 E, 4 E, табл.).

A431 – культура клеток плоскоклеточного рака кожи вульвы – представлена пластом атипичных клеток веретеновидной и полигональной формы с полиморфными ядрами и единичными сфероидными структурами, в среднем четыре в поле зрения при $\times 200$, размерами от 50 до 70 мкм (рис. 1 F). При ИГХ исследовании выявлена различная частота РСК по изученным маркерам стволовости, содержащимся в цитоплазме опухолевых одноядерных и многоядерных клеток, ALDH1 (8%), CD133 (6,5%), CD34 (2%) (рис. 2 F, 3 F, 4 F, табл.).

Нами проведен расчет коэффициента корреляции Пирсона между двумя массивами данных: количеством сфероидов на 1000 опухолевых клеток во всех культурах клеток и степенью экспрессии маркеров РСК, выраженной в процентах (рис. 5). Коэффициент корреляции массивов данных «CD34-сфероиды» составил 0,921 (сильная корреляционная зависимость признаков), «CD133-сфероиды» – 0,070 (слабая кор-

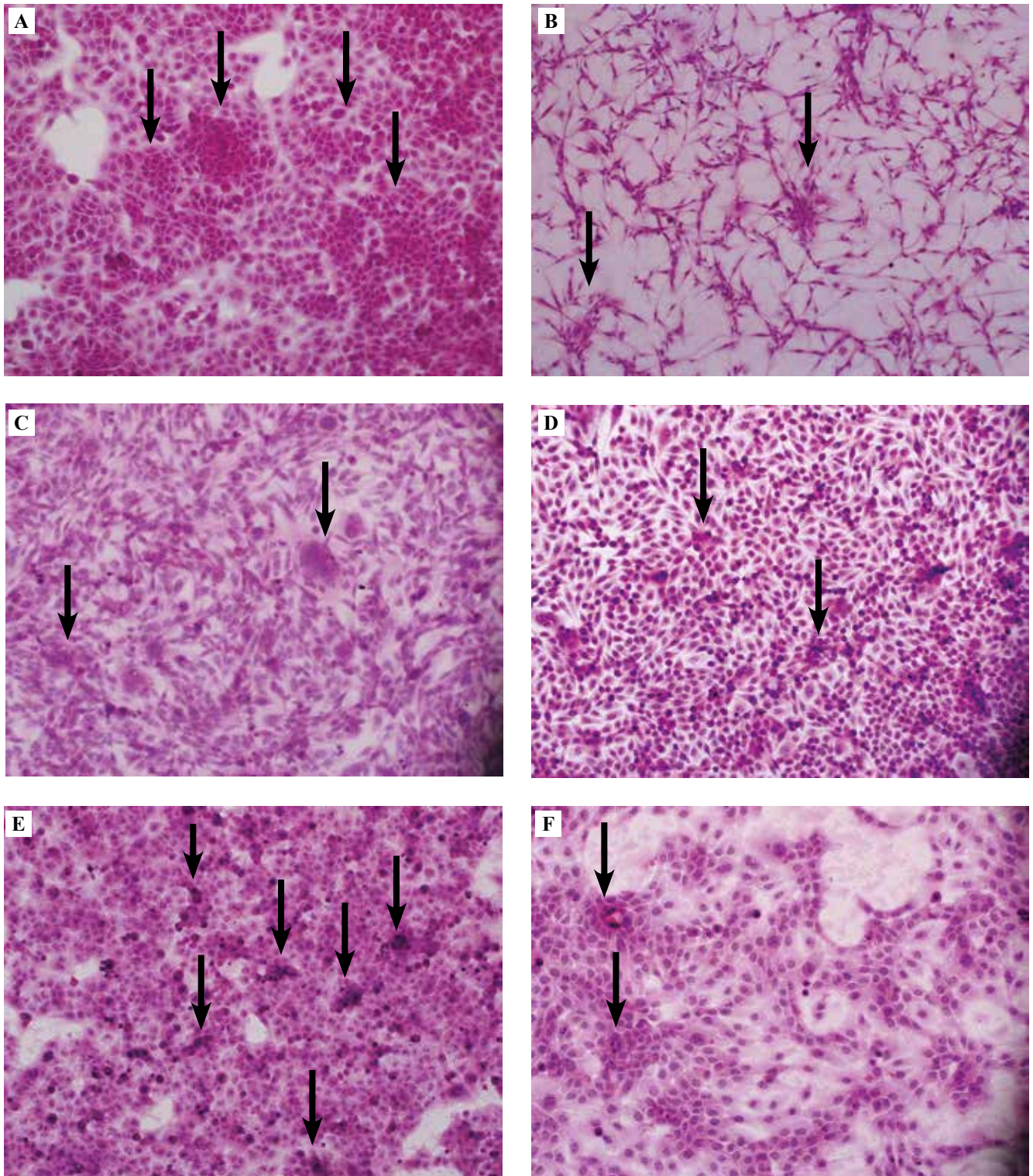


Рис. 1. Опухолевые одноядерные и многоядерные клетки, а также СФС (стрелки).

А – РСК в культуре аденокарциномы легкого A549, В – РСК в культуре глиобластомы U-251, С – РСК в культуре глиобластомы U-87, D – РСК в культуре плоскоклеточного рака шейки матки SiHa, E – РСК в культуре аденокарциномы шейки матки HeLa, F – РСК в культуре плоскоклеточного рака кожи вульвы A431. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 1. Tumor mono- and multinuclear cells, spheroid structures (arrows).

A – CSC in the A549 adenocarcinoma cell line, B – CSC in the U-251 glioblastoma U-251 cell line, C – CSC in the U-87 glioblastoma cell line, D – CSC in the SiHa squamous cell carcinoma of the cervix cell line, E – CSC in the HeLa cervical adenocarcinoma cell line, F – CSC in the A431 squamous cell carcinoma of the vulva cell line. H&E stain, $\times 200$

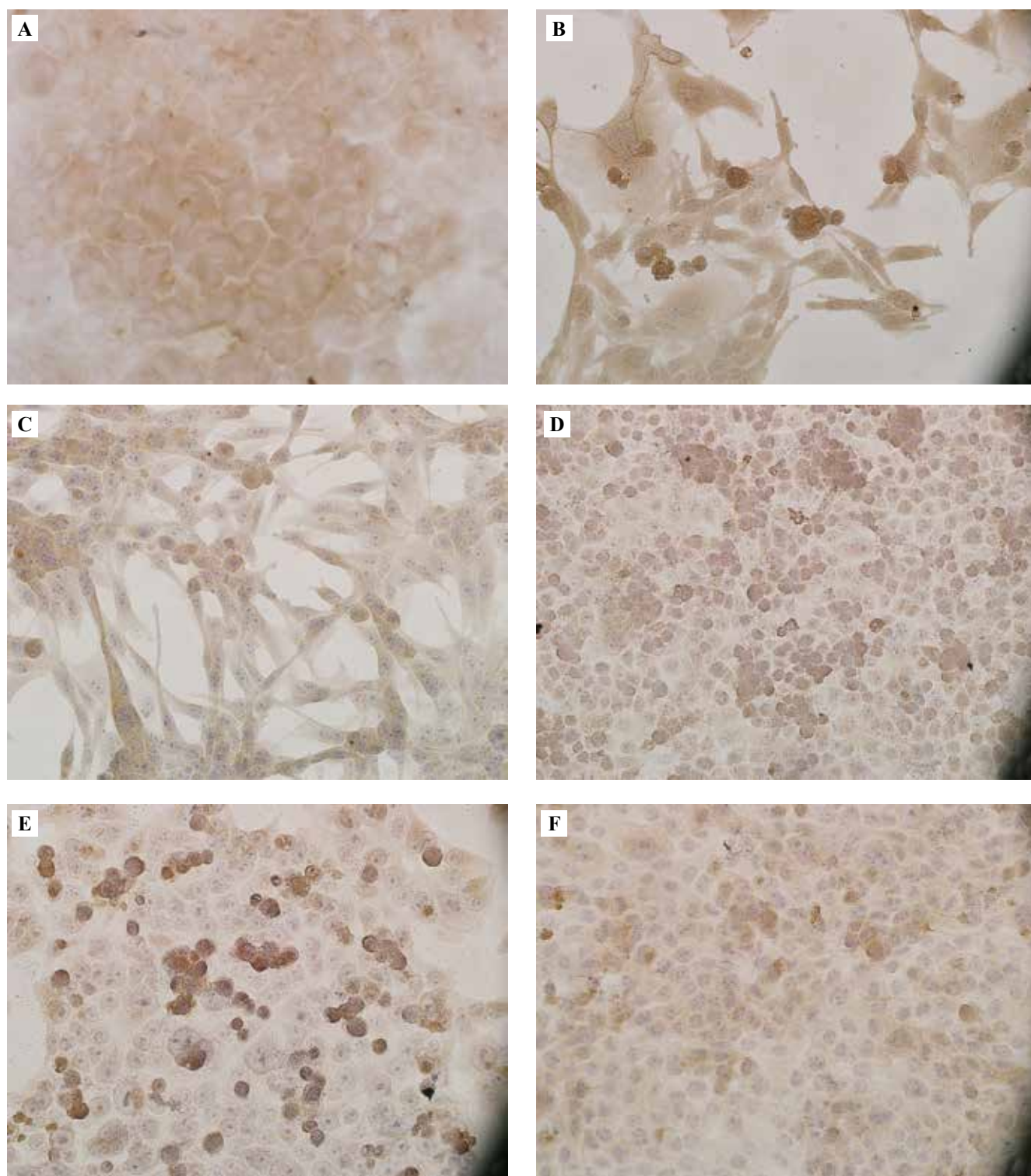


Рис. 2. Экспрессия маркера ALDH1 в опухолевых одноядерных и многоядерных клетках, а также в клетках сфероидных структур.

А – РСК в культуре аденокарциномы легкого А549, В – РСК в культуре глиобластомы U-251, С – РСК в культуре глиобластомы U-87, D – РСК в культуре плоскоклеточного рака шейки матки SiHa, E – РСК в культуре аденокарциномы шейки матки HeLa, F – РСК в культуре плоскоклеточного рака кожи вульвы A431. ИГХ с диаминбензидином (ДАБ).
А – $\times 600$, В–Е – $\times 200$, F – $\times 400$

Fig. 2. ALDH1 expression in mono- and multinuclear tumor cells and in the cells of spheroid structures.

А – CSC in the A549 adenocarcinoma cell line, B – CSC in the U-251 glioblastoma cell line, C – CSC in the U-87 glioblastoma cell line, D – CSC in the SiHa squamous cell carcinoma of the cervix cell line, E – CSC in the HeLa cervical adenocarcinoma cell line, F – CSC in the A431 squamous cell carcinoma of the vulva cell line. IHC with DAB stain. A – $\times 600$, B–E – $\times 200$, F – $\times 400$

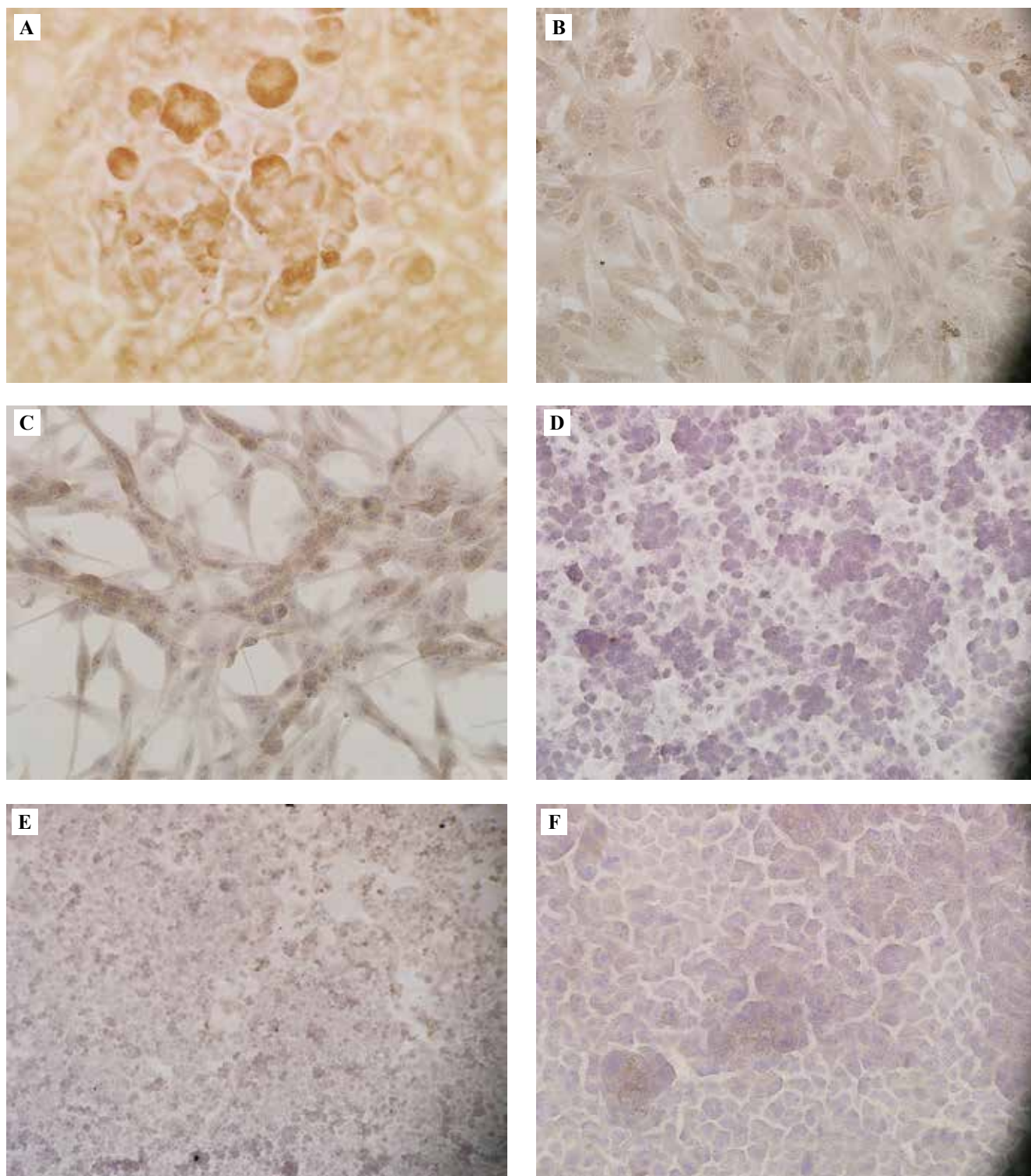


Рис. 3. Экспрессия маркера CD133 в опухолевых одноклеточных и многоклеточных клетках, а также клетках сфероидных структур. А – РСК в культуре аденокарциномы легкого A549, В – РСК в культуре глиобластомы U-251, С – РСК в культуре глиобластомы U-87, D – РСК в культуре плоскоклеточного рака шейки матки SiHa, E – РСК в культуре аденокарциномы шейки матки HeLa, F – РСК в культуре плоскоклеточного рака кожи вульвы A431. ИГХ с ДАБ. А – $\times 600$, В–Е – $\times 200$, F – $\times 400$

Fig. 3. CD133 expression in mono- and multinuclear tumor cells and in the cells of spheroid structures. А – CSC in the A549 lung adenocarcinoma cell line, В – CSC in the U-251 glioblastoma cell line, С – CSC in the U-87 glioblastoma cell line, D – CSC in the SiHa squamous cell carcinoma of the cervix cell line, E – CSC in the culture of HeLa cervical adenocarcinoma cell line, F – CSC in the A431 squamous cell carcinoma of the vulva cell line. IHC with DAB stain. А – $\times 600$, В–Е – $\times 200$, F – $\times 400$

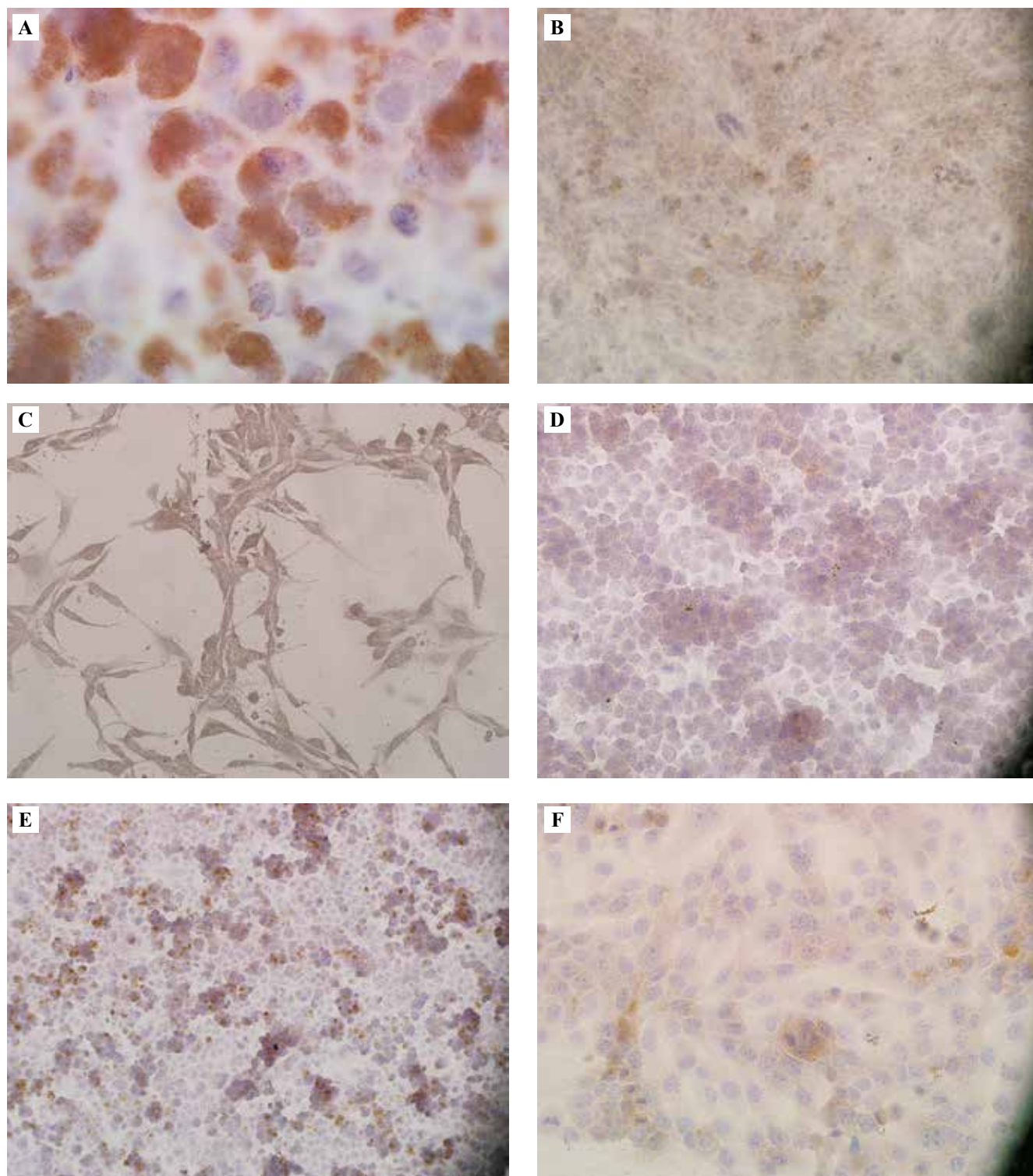


Рис. 4. Экспрессия маркера CD34 в опухолевых одноядерных и многоядерных клетках, а также клетках сфероидных структур. А – РСК в культуре аденокарциномы легкого A549, В – РСК в культуре глиобластомы U-251, С – РСК в культуре глиобластомы U-87, D – РСК в культуре плоскоклеточного рака шейки матки SiHa, E – РСК в культуре аденокарциномы шейки матки HeLa, F – РСК в культуре плоскоклеточного рака кожи вульвы A431. ИГХ с ДАБ. А – $\times 600$, В–Е – $\times 200$, F – $\times 400$

Fig. 4. CD34 expression in mono- and multinuclear tumor cells and in the cells of spheroid structures. А – CSC in the A549 adenocarcinoma cell line, В – CSC in the U-251 glioblastoma cell line, С – CSC in the U-87 glioblastoma cell line, D – CSC in the SiHa squamous cell carcinoma of the cervix cell line, E – CSC in the HeLa cervical adenocarcinoma cell line, F – CSC in the A431 squamous cell carcinoma of the vulva cell line. IHC with DAB stain. А – $\times 600$, В–Е – $\times 200$, F – $\times 400$

Таблица | Table

Количество сфероидов на 1000 опухолевых клеток и экспрессия РСК в культурах раковых клеток, % | Spheroid count per 1,000 tumor cells and CSC expression in cancer cell lines, %

	ALDH1	CD133	CD34	CASP3	Ki-67	Сфероиды Spheroid structures
A549	25±1,05	10±1,63	30±2,35	3±0,94	83±1,67	8
U-251	25±3,40	40±4,01	7±0,57	7±0,88	83±2,44	4
U-87	10±0,81	18±7,25	2±0,94	16±2,50	12±0,94	3
SiHa	40±3,86	20±2,08	25±2,92	20±1,12	40±1,48	6
HeLa	30±0,36	45±0,97	40±1,33	25±2,59	25±2,26	7
A431	8±0,44	6,5±0,08	2±0,32	5±0,18	5±0,29	4



Рис. 5. Корреляционная зависимость количества сфероидов и степени экспрессии маркеров РСК и пролиферации
Fig. 5. Correlation between the spheroid number and the degree of CSC and proliferation marker expression

реляция), «ALDH-сфероиды» – 0,635 (средняя корреляция). Также рассчитана корреляционная зависимость между степенью экспрессии различных маркеров РСК: «ALDH-CD34» (сильная корреляция, $r=0,734$), «ALDH-CD133» (средняя корреляция, $r=0,440$), «CD133-CD34» (слабая корреляция, $r=0,363$).

Обсуждение

В результате проведенного исследования мы предполагаем вероятное существование гетерогенности РСК внутри опухоли во всех изученных нами культурах рака. При этом спектр гетерогенности РСК индивидуален по количеству и определенным видам опухолевых культур.

В культуре аденокарциномы легкого A549 преобладают ALDH1+ и CD34+ РСК, что подтверждается и данными литературы. В частности, повышение экспрессии ALDH1 предположительно коррелирует с резистентностью к противоопухолевой терапии [20]. В своем предыдущем исследовании [21] мы описали возможное существование гетерогенности РСК в аденокарциномах человека и повышение количества ALDH1, CD133 и CD34 на стадии метастазирования в операционном материале. Полученные данные по

CD34 также могут иметь значение с прогрессией опухоли и совпадают с результатами исследования S. Kapoor et al. [22] и P. Radu et al. [23], которые связывают наличие CD34+ РСК в опухоли с эпителиально-мезенхимальным переходом и метастазированием, так как CD34 – это маркер неоангиогенеза.

В культурах глиобластом U-251 и U-87 преобладают РСК CD133+ и РСК ALDH1+. По данным литературы, одним из первых выявленных маркеров РСК глиобластомы был CD133, однако он не может являться универсальным маркером только для данной опухоли [24]. Следовательно, крайне важно установление дополнительных маркеров стволовости для выявления РСК глиобластомы, что требует дальнейшего изучения.

В карциномах шейки матки HeLa, SiHa все варианты РСК присутствовали в относительно большом количестве. Число ALDH+ РСК варьировало в этих культурах от 30 до 40%, в зависимости от культуры клеток. Наши результаты находят подтверждение и в литературе: культуры клеток рака шейки матки SiHa и HeLa также высоко экспрессируют маркер ALDH, и ALDH+ РСК ассоциированы с более высокой онкогенностью и устойчивостью к противоопухолевой терапии [25]. В РСК культуры клеток HeLa обнаружена высокая экспрессия CD133, что тоже коррелирует с информацией из литературы: исследователи связывают CD133+ РСК с развитием устойчивости к терапии карциномы шейки матки [26].

Полученные нами данные о возможном существовании гетерогенности РСК в одной и той же опухоли подтверждаются работами других авторов. Вероятнее всего, гетерогенная иерархия РСК может коррелировать с резистентностью к противоопухолевой терапии при высоком содержании в опухоли CD133+ РСК и ALDH+ РСК [5–7] и являться результатом прогрессии опухоли при высоком содержании CD34+ РСК [8, 9].

СФС в опухолевой ткани наиболее вероятно выполняют функцию ниш РСК, что было описано нами ранее [10, 21]. Как показало исследование, РСК не только обнаруживаются в пласте опухолевых клеток, но и сконцентрированы в СФС различных размеров

и в разных количествах. Установлены вероятные корреляционные взаимоотношения между количеством сфероидных структур и процентным содержанием разных типов РСК, что подтверждает особенности локализации РСК в сфероидных структурах клеточных культур, которые могут считаться гипотетически эквивалентами ниш РСК в тканях. Корреляционный анализ между типами РСК и количеством СФС подтверждает возможное существование индивидуальной гетерогенности РСК в изученных нами опухолях, что предположительно может не только отражать стадию опухолевой прогрессии, но и влиять на резистентность их к противоопухолевой терапии, а также определять прогноз для пациента.

Проведенное исследование и анализ данных литературы показывают необходимость преодоления традиционного взгляда на существование в опухоли одного типа РСК.

Учитывание иерархии гетерогенных РСК в одной опухоли открывает путь к более точной стратификации пациентов, разработке эффективной комбинированной терапии, прорыву в лечении рецидивирующих и метастатических форм рака. В дальнейшем необходимо проведение морфологического исследования различных видов опухолей с расширенной панелью ИГХ-антител (включая CD44, SOX2, Nanog, Oct4) с целью оценки существования гетерогенности с участием и других типов РСК, ответственных за неблагоприятный прогноз, метастазирование и опухолевую прогрессию. Ранее мы проводили исследование на эффективность фотодинамической терапии с использованием бактериохлоринов на культуру рака легкого A549 и установили уничтожение ALDH1+ и CD34+ РСК в новообразовании [27]. Понимание гетерогенности РСК в отдельных опухолях позволит врачам клинических специальностей своевременно подбирать таргетную терапию, направленную на различные типы РСК, что в целом будет способствовать улучшению прогноза и выживаемости пациентов со злокачественными опухолями.

Заключение

В культурах раковых клеток, изученных нами, гипотетически обнаружено существование гетерогенности раковых стволовых клеток по поверхностным маркерам стволовости ALDH1, CD34 и CD133. Описан индивидуальный спектр гетерогенности раковых стволовых клеток в разных опухолевых культурах: в аденокарциноме легкого A549 преобладают ALDH1+ и CD34+, в культурах глиобластом U-251 и U-87 – CD133 и ALDH1, а в карциномах шейки матки HeLa, SiHa все варианты раковых стволовых клеток присутствовали в относительно большом количестве. В плоскоклеточном раке вульвы A431 обнаружено наименьшее количество раковых стволовых клеток. Сфероидные структуры в клеточных культурах, вероятно, могут считаться аналогами ниш раковых стволовых клеток в ткани опухоли, поскольку в клеточных культурах раковые стволовые

клетки в основном сконцентрированы в сфероидных структурах различных размеров и в разных количествах. Корреляционный анализ между типами раковых стволовых клеток и количеством сфероидных структур также косвенно подтверждает существование индивидуальной гетерогенности раковых стволовых клеток в изученных нами опухолях, что гипотетически может не только отражать стадию опухолевой прогрессии, но и влиять на резистентность их к противоопухолевой терапии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.А. Коган, Г.А. Меерович, И.В. Решетов.

Сбор и обработка материала – С.Т. Аврамова, Е.А. Коган, А.Д. Романовская, И.Г. Меерович, Г.А. Меерович, С.Ш. Каршиева, Г.И. Вдовина, Е.Е. Щелокова, Н.В. Жарков.

Написание текста – Е.А. Коган, С.Т. Аврамова, А.Д. Романовская, Т.А. Демура.

Редактирование – Е.А. Коган, Т.А. Демура, А.Д. Романовская.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.A. Kogan, G.A. Meerovich, I.V. Reshetov.

Collected the data and performed the analysis – S.T. Avraamova, E.A. Kogan, A.D. Romanovskaya, I.G. Meerovich, G.A. Meerovich, S.Sh. Karshieva, G.I. Vdovina, E.E. Shchelokova, N.V. Zharkov.

Wrote the paper – E.A. Kogan, S.T. Avraamova, A.D. Romanovskaya, T.A. Demura.

Edited the manuscript – E.A. Kogan, T.A. Demura, A.D. Romanovskaya.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование Е.А. Коган, А.Д. Романовской, С.Т. Аврамовой, Г.А. Мееровича, И.В. Решетова выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-45-00020.

Funding. The study by E.A. Kogan, A.D. Romanovskaya, S.T. Avraamova, G.A. Meerovich, and I.V. Reshetov was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 24-45-00020.

Ограничения исследования. Ограничения проведения исследования связаны с тем, что ИГХ не позволяет точно определить гибридные компоненты иерархии РСК. Для этого планируется использовать мультиплексную ИГХ и конфокальную микроскопию.

Limitations of the study. The limitations of the study are related to the fact that the IHC study does not allow us to accurately determine the hybrid components of the RSC hierarchy. Thus, future studies will use multiplex IHC and confocal microscopy.

Литература/References

1. Valeri P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(11):767–75. DOI: 10.1038/nrc3368.
2. Capp JP. Cancer stem cells: from historical roots to a new perspective. *J Oncol*. 2019;2019:5189232. DOI: 10.1155/2019/5189232.
3. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks

- SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res.* 2009;69(8):3382–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4418.
4. Liou GY. CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019;106:1–7. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.10.013.
 5. Ahmed SI, Javed G, Laghari AA, Bareeqa SB, Farrukh S, Zahid S et al. CD133 expression in glioblastoma multiforme: a literature review. *Cureus.* 2018;10(10):e3439. DOI: 10.7759/cureus.3439.
 6. Luo M, Brooks M, Wicha MS. Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance. *Curr Pharm Des.* 2015;21(10):1301–10. DOI: 10.2174/1381612821666141211120604.
 7. Althobiti M, El Ansari R, Aleskandarany M, Joseph C, Toss MS, Green AR et al. The prognostic significance of ALDH1A1 expression in early invasive breast cancer. *Histopathology.* 2020;77(3):437–48. DOI: 10.1111/his.14129.
 8. Ma L, Dong L, Chang P. CD44v6 engages in colorectal cancer progression. *Cell Death Dis.* 2019;10(1):30. DOI: 10.1038/s41419-018-1265-7.
 9. Kim YJ, Kang DH, Song GJ, Ahn TS, Son MW, Lee MS et al. Clinical relevance of Lgr5 expression in colorectal cancer patients. *Korean J Clin Oncol.* 2018;14(2):76–82. DOI: 10.14216/kjco.18014.
 10. Kogan EA, Namiot VA, Demura TA, Fajzullina NM, Sukhikh GT. Reparative and neoplastic spheroid cellular structures and their mathematical model. *Biophysics.* 2014;59(3):436–42. DOI: 10.1134/S0006350914030129.
 11. Lord EM, Penney DP, Sutherland RM, Cooper RA Jr. Morphological and functional characteristics of cells infiltrating and destroying tumor multicellular spheroids *in vivo*. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1979;31(2):103–16. DOI: 10.1007/BF02889928.
 12. Sutherland RM, Durand RE. Radiation response of multicell spheroids – an *in vitro* tumour model. *Curr Top Radiat Res Q.* 1976;11(1):87–139. PMID: 128440.
 13. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature.* 1977;267(5611):531–2. DOI: 10.1038/267531a0.
 14. Bierwolf J, Lutgehetmann M, Feng K, Erbes J, Deichmann S, Toronyi E et al. Primary rat hepatocyte culture on 3D nanofibrous polymer scaffolds for toxicology and pharmaceutical research. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(1):141–50. DOI: 10.1002/bit.22924.
 15. Kuch V, Schreiber C, Thiele W, Umansky V, Sleeman JP. Tumorigenic properties of breast cancer and melanoma cells *in vivo* are not invariably reflected by spheroid formation *in vitro*, but can be increased by long-term culturing as adherent monolayers. *Int J Cancer.* 2013;132(3):E94–105. DOI: 10.1002/ijc.27785.
 16. Wei B, Han XY, Qi CL, Zhang S, Zheng ZH, Huang Y et al. Coaction of spheroid-derived stem-like cells and endothelial progenitor cells promotes development of colon cancer. *PLoS One.* 2012;7(6):e39069. DOI: 10.1371/journal.pone.0039069.
 17. Kurioka D, Takagi A, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Watanabe M. Multicellular spheroid cultures models: applications in prostate cancer research and therapeutics. *J Cancer Sci Ther.* 2011;3:060. DOI: 10.4172/1948-5956.1000059.
 18. Мавликеев М.О., Архипова С.С., Чернова О.Н., Титова А.А., Певнев Г.О., Шафигуллина А.К. и др. Краткий курс гистологической техники: Учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет, 2020. 107 с.
Mavlikeev MO, Arkhipova SS, Chernova ON, Titova AA, Pevnev GO, Shafigullina AK et al. A short course in histological techniques: A study guide. Kazan: Kazan University, 2020. 107 p. (In Russ.).
 19. Лукашевский В.Г. Основы прикладной статистики. Москва: Академический проект, 2010. 336 с.
Lukashevskii VG. Fundamental of applied statistics. Moscow: Akademicheskii proekt, 2010. 336 p. (In Russ.).
 20. Lei HM, Zhang KR, Wang CH, Wang Y, Zhuang GL, Lu LM et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 confers erlotinib resistance via facilitating the reactive oxygen species-reactive carbonyl species metabolic pathway in lung adenocarcinomas. *Theranostics.* 2019;9(24):7122–39. DOI: 10.7150/thno.35729.
 21. Коган Е.А., Щелокова Е.Е., Демур Т.А., Жарков Н.В., Кичигина О.Н., Ковязина Н.В. и др. ALDH1-, CD133-, CD34-позитивные раковые стволовые клетки в аденокарциноме легкого у пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию SARS-CoV2. Архив патологии. 2024;86(5):5–14. DOI: 10.17116/patol2024860515.
Kogan EA, Shchelokova EE, Demura TA, Zharkov NV, Kichigina ON, Kovyazina NV et al. ALDH1, CD133, CD34-positive cancer stem cells in lung adenocarcinoma in patients who had a new coronavirus infection and retained the persistence of viral proteins in the lung tissue. *Russian Journal of Archive of Pathology.* 2024;86(5):5–14 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol2024860515.
 22. Kapoor S, Shenoy SP, Bose B. CD34 cells in somatic, regenerative and cancer stem cells: developmental biology, cell therapy, and omics big data perspective. *J Cell Biochem.* 2020;121(5-6):3058–69. DOI: 10.1002/jcb.29571.
 23. Radu P, Zurzu M, Paic V, Bratucu M, Garofil D, Tigora A et al. CD34 – structure, functions and relationship with cancer stem cells. *Medicina (Kaunas).* 2023;59(5):938. DOI: 10.3390/medicina59050938.
 24. Wang J, Sakariassen PØ, Tsinkalovsky O, Immervoll H, Bøe SO, Svendsen A et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer.* 2008;122(4):761–8. DOI: 10.1002/ijc.23130.
 25. Ortiz-Sánchez E, Santiago-López L, Cruz-Domínguez VB, Toledo-Guzmán ME, Hernández-Cueto D, Muñiz-Hernández S et al. Characterization of cervical cancer stem cell-like cells: phenotyping, stemness, and human papilloma virus co-receptor expression. *Oncotarget.* 2016;7(22):31943–54. DOI: 10.18632/oncotarget.8218.
 26. He L, Qian H, Seyiti A, Yang C, Shi N, Chen C et al. CD133⁺/ABCC5⁺ cervical cancer cells exhibit cancer stem cell properties. *Heliyon.* 2024;10(17):e37066. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e37066.
 27. Meerovich G, Kogan E, Romanishkin I, Zharkov N, Avraamova S, Shchelokova E et al. Potential of photodynamic therapy using polycationic photosensitizers in the treatment of lung cancer patients with SARS-CoV-2 infection and bacterial complications: our recent experience. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2025;51:104447. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2024.104447.

Информация об авторах

Евгения Алтаровна Коган – доктор медицинских наук, профессор Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

София Таризловна Аврамова – кандидат медицинских наук, доцент Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Геннадий Александрович Меерович – кандидат физико-математических наук, научный сотрудник Института кластерной онкологии имени профессора Л.Л. Левшина Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), старший научный сотрудник лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН.

Саида Шамильевна Каршиева – кандидат биологических наук, ведущий эксперт Института биомедицинской инженерии НИТУ «МИСиС».

Галина Ильинична Вдовина – лаборант-исследователь Института биомедицинской инженерии НИТУ «МИСиС».

Ирина Геннадьевич Меерович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории физической биохимии Института биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ биотехнологии РАН.

Анна Дмитриевна Романовская – кандидат медицинских наук, ассистент Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Елена Евгеньевна Щелокова – врач-патологоанатом централизованного патологоанатомического отделения Клинического центра Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Николай Владимирович Жарков – кандидат биологических наук, биолог централизованного патологоанатомического отделения Клинического центра Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Татьяна Александровна Демур – доктор медицинских наук, профессор, директор Института клинической морфологии и цифровой патологии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Игорь Владимирович Решетов – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор Института кластерной онкологии имени профессора Л.Л. Левшина Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Author information

Evgeniya A. Kogan – Dr. Sci. (Med.), Professor, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-1107-3753>

Sofya T. Avramova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-9704-5915>

Gennady A. Meerovich – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Researcher, Professor L.L. Levshin Institute of Cluster Oncology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Senior Researcher, Laser Biospectroscopy Laboratory, A.M. Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences.

<https://orcid.org/0000-0002-2046-5492>

Saida Sh. Karshieva – Cand. Sci. (Biol.), Leading Expert, Institute of Biomedical Engineering, National University of Science and Technology “MISIS”.

<https://orcid.org/0000-0003-2469-2315>

Galina I. Vdovina – Research Assistant, Institute of Biomedical Engineering, National University of Science and Technology “MISIS”.

<https://orcid.org/0009-0006-2047-5267>

Irina G. Meerovich – Cand. Sci. (Chem.), Senior Researcher, Laboratory of Physical Biochemistry, A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”.

<https://orcid.org/0000-0001-9732-8149>

Anna D. Romanovskaya – Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-6690-3347>

Elena E. Shchelokova – Pathologist, Central Anatomic Pathology Department, Clinical Center, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-5030-0429>

Nikolay V. Zharkov – Cand. Sci. (Biol.), Biologist, Central Anatomic Pathology Department, Clinical Center, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-7183-0456>

Tatiana A. Demura – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of the Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-6946-6146>

Igor V. Reshetov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the Professor L.L. Levshin Institute of Cluster Oncology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-0909-6278>