

Опыт создания первичных культур рака эндометрия и исследования в них клеток, обладающих фенотипом опухолевых стволовых клеток

С. Ю. Филиппова, И. В. Межевова, Т. В. Чембарова[✉], И. А. Новикова,
Е. В. Вереникина, О. Е. Женило, В. В. Половодова, А. В. Шапошников,
Е. В. Шалашная, А. А. Маслов, О. Г. Ишонина

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ tanyshamova@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучить возможность применения метода сфероидообразования в культуре для оценки содержания опухолевых стволовых клеток (ОСК) рака эндометрия (РЭ) в сложных образцах, содержащих различные клетки опухоли и микроокружения.

Материалы и методы. Первичные культуры получали из фрагментов опухолей, удаленных в ходе оперативного вмешательства, проводимого в качестве первого этапа по лечению РЭ в отделении онкогинекологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. После ферментативной дезагрегации ткани клеточную суспензию пассировали в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и 1 % гентамицина, для получения первичных двумерных культур. Для изучения способности клеток к сфероидообразованию первичную культуру снимали с культурального пластика и пассировали по $2,0 \times 10^4$ клеток на лунку 6-тилуночного планшета ($n = 6$) в среду DMEM, содержащую 0,35 % агарозы и факторы роста EGF (20 нг/мл) и FGF (20 нг/мл). Через две недели культивирования определяли средний размер, количество образующихся сфероидов и частоту сфероидообразования. Для тех культур, которые образовали сфероиды, было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание двумерной культуры на маркер CD133, после чего определяли частоту CD133+ клеток.

Результаты. Всего было получено девять первичных культур РЭ, из которых только пять образовали сфероиды спустя две недели культивирования в условиях, не поддерживающих адгезию. В этих культурах наибольшую связь со сфероидообразованием показали небольшие полигональные CD133+ клетки, с которыми ассоциировались наиболее крупные сфероиды (98–110 мкм в диаметре).

Заключение. В смешанных культурах РЭ присутствует большое количество клеток микроокружения, из которого часть клеток может экспрессировать CD133, в том числе нормальные стволовые клетки, также образующие сфероиды в мягком агаре. Требуется более подробное изучение клеточных субпопуляций РЭ в сравнении с нормальным эндометрием для установления связи между наблюдаемым разнообразием клеток в культуре и их способностью к сфероидообразованию и другими характеристиками ОСК.

Ключевые слова: рак эндометрия, первичные культуры, опухолевые стволовые клетки, клеточные сфероиды

Для цитирования: Филиппова С. Ю., Межевова И. В., Чембарова Т. В., Новикова И. А., Вереникина Е. В., Женило О. Е., Половодова В. В., Шапошников А. В., Шалашная Е. В., Маслов А. А., Ишонина О. Г. Опыт создания первичных культур рака эндометрия и исследования в них клеток, обладающих фенотипом опухолевых стволовых клеток. Южно-Российский онкологический журнал. 2024; 5(3): 16-30.
<https://doi.org/10.37748/2686-9039-2024-5-3-2>, <https://elibrary.ru/eyiruh>

Для корреспонденции: Чембарова Татьяна Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, д. 63
E-mail: tanyshamova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4555-8556>
SPIN: 5426-1873, AuthorID: 1051985
ResearcherID: AAR-3198-2021
Scopus Author ID: 57221303597

Соблюдение этических стандартов: в работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ред. 2013). Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (выписка из протокола заседания № 25 от 08.09.2022 г.). Информированное согласие получено от всех участников исследования

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

Статья поступила в редакцию 26.12.2023; одобрена после рецензирования 28.06.2024; принята к публикации 24.07.2024

© Филиппова С. Ю., Межевова И. В., Чембарова Т. В., Новикова И. А., Вереникина Е. В., Женило О. Е., Половодова В. В., Шапошников А. В., Шалашная Е. В., Маслов А. А., Ишонина О. Г., 2024

Experience in creating primary cultures of endometrial cancer and studying cells carrying phenotype of cancer stem cells

S. Yu. Filippova, I. V. Mezheva, T. V. Chembarova✉, I. A. Novikova, E. V. Verenikina, O. E. Zhenilo, V. V. Polovodova, A. V. Shaposhnikov, E. V. Shalashnaya, A. A. Maslov, O. G. Ishonina

National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation
✉ tanyshamova@mail.ru

ABSTRACT

Purpose of the study. Was to investigate the possibility of applying the method of spheroid formation in culture for assessment of the endometrial cancer (EC) tumor stem cells (TSC) content in complex samples containing various tumor cells and microenvironment.

Materials and methods. Primary cultures were obtained from fragments of tumors removed during surgery as a first stage of treatment at the Department of Gynecological Oncology, the National Medical Research Center for Oncology. After enzymatic disaggregation of tissue, cell suspension was passaged in DMEM medium containing 10 % fetal bovine serum and 1 % gentamicin to obtain primary two-dimensional cultures. To study the ability of cells to form spheroids, the primary culture was removed from the culture plate and passaged with 2.0×10^4 cells per well of a six-well plate ($n = 6$) in DMEM medium containing 0.35 % agarose and growth factors EGF (20 ng/ml) and FGF (20 ng/ml). After two weeks of cultivation, the average size, number of formed spheroids, and frequency of spheroid formation were determined. For those cultures that had formed spheroids, immunofluorescent staining of the two-dimensional culture for the marker CD133 was performed, after which the frequency of CD133+ cells was determined.

Results. A total of nine primary cultures of EC were obtained, five of which formed spheroids within two weeks of cultivation under non-adhesive conditions. In these cultures, small polygonal CD133+ cells showed the strongest association with spheroid formation, which were associated with the largest spheroids (98–110 μm in diameter).

Conclusion. There is a large number of microenvironmental cells in mixed cultures of CSC, some of which may express CD133, including healthy stem cells that also form spheroids in soft agar. A more detailed study of CSC subpopulations compared to normal endometrium is required to establish a link between the observed diversity of cells in culture and their ability to form spheroids and other characteristics of tumor stem cells.

Keywords: endometrial cancer, primary cell cultures, cancer stem cells, cell spheroids

For citation: Filippova S. Yu., Mezheva I. V., Chembarova T. V., Novikova I. A., Verenikina E. V., Zhenilo O. E., Polovodova V. V., Shaposhnikov A. V., Shalashnaya E. V., Maslov A. A., Ishonina O. G. Experience in creating primary cultures of endometrial cancer and studying cells carrying phenotype of cancer stem cells. South Russian Journal of Cancer. 2024; 5(3): 16-30. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2024-5-3-2>, <https://elibrary.ru/eyiruh>

For correspondence: Tatiana V. Chembarova – junior research fellow at the laboratory of cellular technologies, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation
Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation
E-mail: tanyshamova@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4555-8556>
SPIN: 5426-1873, AuthorID: 1051985
ResearcherID: AAR-3198-2021
Scopus Author ID: 57221303597

Compliance with ethical standards: the work followed the ethical principles set forth by World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ed. 2013. The study was approved by the Committee on Biomedical Ethics at the National Medical Research Centre for Oncology (extract from the minutes of the meeting No. 25 dated 09/08/2022). Informed consent has been obtained from all participants of the study

Funding: this work was not funded

Conflict of interest: the authors declare that there are no obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article

The article was submitted 26.12.2023; approved after reviewing 28.06.2024; accepted for publication 24.07.2024

ВВЕДЕНИЕ

Рак эндометрия (РЭ) является шестым по распространенности видом рака у женщин. За последние 30 лет общая заболеваемость РЭ выросла на 132 %, что отражает увеличение распространенности факторов риска, в частности, ожирения и старения населения [1]. В России РЭ занимает 2-е ранговое место в структуре онкологических заболеваний женских половых органов. Общее количество пациенток с РЭ достигло показателя 195,6 на 100 тыс. населения в 2022 г., что на 31,8 % больше, чем в 2012 г. [2]. Таким образом, по-прежнему существует необходимость в разработке новых терапевтических подходов для значительного улучшения прогноза у женщин с рецидивирующим РЭ или на поздних стадиях заболевания. В этом контексте опухолевые стволовые клетки (ОСК) рака эндометрия, способные к самообновлению и дифференцировке в зрелые опухолевые клетки, а также способствующие рецидивированию опухолей, их метастазированию, гетерогенности, множественной лекарственной и радиационной устойчивости, представляют собой потенциальную мишень для разработки лекарственных препаратов [3].

ОСК впервые были идентифицированы у пациентов с острым миелоидным лейкозом в 1994 г. и с тех пор считаются потенциальными терапевтическими мишенями в лечении онкологических заболеваний, в том числе солидных опухолей [4]. Впервые ОСК в РЭ были описаны Hubbard в 2009 г. [5]. Открытие эндометриальных ОСК радикально изменило взгляды на изучение биологии РЭ и разработку подходов к лечению этого заболевания. Как правило, ОСК РЭ идентифицируют по экспрессии специфических антигенов, по признаку слабого накопления ядерного красителя Hoechst 33342 (так называемая *side population* – «побочная популяция»), по способности образовывать колонии в условиях пониженной адгезии и инициировать рост опухоли, содержащей ОСК и происходящие от них дифференцированные клетки с тем же фенотипом, что и «родительские», у мышей с иммунодефицитом [3].

В РЭ был исследован целый ряд маркеров, ассоциированных с ОСК солидных опухолей. Альдегиддегидрогеназа 1 (Aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1) является одним из 19 различных ферментов, участвующих в окислении альдегида. Этот фермент проявляет высокую активность на ранних стадиях

дифференцировки стволовых клеток. Атипичные клетки РЭ, имеющие высокий уровень экспрессии ALDH1, более туморогенны, инвазивны и устойчивы к цисплатину, чем клетки с низким уровнем экспрессии ALDH1. Также высокий уровень экспрессии ALDH1 коррелирует с худшим прогнозом у пациентов с РЭ [6]. Рецепторная тирозинкиназа c-Kit или CD117 является рецептором фактора стволовых клеток (Stem Cell Factor, SCF) и при активации запускает ряд внутриклеточных сигнальных каскадов, регулирующих выживание, миграцию и пролиферацию клеток, в том числе ОСК [7]. При исследовании клеточного состава РЭ было показано, что CD117⁺ клетки, выделенные из культур РЭ Ishikawa и MFE280, проявляют большую пролиферативную способность, а также способность к образованию колоний в мягком агаре в присутствии SCF. Высокий уровень экспрессии CD117 также был признан независимым прогностическим фактором, коррелирующим с прогрессированием РЭ [8]. Антиген CD55 представляет собой фактор ускорения распада комплемента и экспрессируется на высоком уровне в ОСК эндометриоидного рака яичников и РЭ. Было показано, что CD55⁺ клетки способны регулировать самообновление клеток и их резистентность к цисплатину в большей степени, чем CD55⁻ клетки [9]. Связь с ОСК была также установлена для трансмембранного гликопротеина CD44, играющего роль молекулы адгезии. Клетки, сверхэкспрессирующие CD44, обладают такими характеристиками ОСК, как способность к самообновлению и эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП), а также устойчивость к химио- и лучевой терапии [10]. Вероятно, к ОСК РЭ этот маркер также имеет отношение, так как онкосферы, получаемые на мягком агаре от клеток культур РЭ со свойствами стволовых, являются CD44 положительными [3]. Кроме того, в ряде работ отмечается совместная экспрессия CD44 и другого маркера ОСК CD133 в ткани РЭ [11, 12]. Трансмембранный гликопротеин клеточной поверхности промиллин-1 или CD133 привлек значительное внимание из-за того, что его экспрессия часто наблюдается в различных субпопуляциях соматических стволовых клеток. Обычно данный гликопротеин наблюдают в области различных микроворсинок и выпячиваний плазматической мембраны, где CD133 может действовать как регулятор липидного состава мембран или участвовать в механизмах клеточной полярности и миграции [13]. В исследовании Rutella

и соавт. (2009) субпопуляции клеток с фенотипом CD133⁺/CD44⁺, выделенные из постоянных клеточных линий рака эндометрия, проявили способность к формированию опухолевых сфер, повышенную химиорезистентность и были способны инициировать образование опухоли с тем же фенотипом, что и у исходной опухоли, при трансплантации иммунодефицитным мышам [14]. В работе Gao (2012) также исследовали линию AN 3CA и показали, что клетки CD133⁺ экспрессируют маркеры стволовости, демонстрируют большую подвижность и инвазионную способность, чем CD133⁻ клетки [15]. В работе Friel исследовали экспрессию CD133 в клетках первичных опухолей РЭ и механизм контроля экспрессии данного маркера в них [16]. Авторы показали, что CD133⁺ клетки составляли 5,7–27,4 % от общей популяции опухолевых клеток в проанализированных первичных опухолях. Эти клетки обладали повышенной туморогенностью в иммунодефицитных мышах, что говорит в пользу того, что эти клетки относятся к ОСК. Сходные результаты были получены в работе Sun (2017), где для CD133⁺CD44⁺ клеток была показана более сильная связь со всеми классическими свойствами ОСК, чем для других исследованных в работе маркеров, таких как CD24, CD47, CD29, CXCR4, SSEA3 и SSEA4. Эффективность образования сфероидов в мягком агаре составила 11,7 % для CD133⁺ клеток и 1,7 % для CD133⁻ клеток [17]. Кроме того, в клетках CD133⁺CD44⁺ была отмечена повышенная по сравнению с другими субпопуляциями экспрессия факторов транскрипции стволовых клеток Мус, Sox-2, Nanog и Oct4 [16], для которых установлена прямая связь со степенью злокачественности эндометриоидной карциномы [18].

Несмотря на установленную в целом ряде исследований связь между CD133 и ОСК РЭ, данные о связи экспрессии этого маркера с прогнозом течения заболевания остаются противоречивыми. Так, в работе Elbasateeny (2016) указывают на более выраженную связь экспрессии CD133 с ранней стадией опухоли (I–II) и на снижение экспрессии данного маркера на более поздних стадиях заболевания. Авторы предположили, что CD44 и CD133 могут участвовать в развитии рака эндометрия на ранних стадиях, а их сверхэкспрессия может способствовать ранней диагностике рака эндометрия [11]. Поддерживают эти результаты и данные, полученные в работе Mansebo (2017), в которой авторы установили, что опухоли, в которых экспрессия CD133

была высокой, с меньшей вероятностью имели сосудистую инвазию и с большей вероятностью были высоко дифференцированными, а также были ассоциированы с более высокой общей и безрецидивной выживаемостью [19]. Тем не менее, имеются и противоположные данные. Так, в работе Nakamura (2010) показали отрицательную корреляцию между экспрессией CD133 в ткани опухоли и продолжительностью жизни без рецидива [20]. Негативный прогноз течения РЭ при повышенной экспрессии CD133 в ткани опухоли был подтвержден и в работе Park в 2019 г. [12]. Наблюдаемые расхождения в данных разных авторов могут быть связаны с тем, что экспрессия CD133 наблюдается не только в ОСК РЭ, но и в нормальных клетках железистого эпителия эндометрия [21]. Таким образом, CD133 в ткани эндометрия может выступать одновременно как маркер эпителиальной дифференцировки и как маркер ОСК.

Чтобы изучать динамику, функционирование и регуляцию стволовых клеток, необходимы экспериментальные методы, позволяющие четко различать стволовые клетки и их потомство. Из-за отсутствия уникальных маркеров клеточной поверхности, характерных только для стволовых клеток, и отчетливого морфологического фенотипа стволовые клетки обычно идентифицируют на основе функциональных критериев. Стволовые клетки из различных тканей обычно культивируют *in vitro* в виде сфероидов в условиях, исключающих адгезию [22]. По литературным данным, исследование ОСК в РЭ осуществляется методом подсчета сфероидов в условиях, не поддерживающих клеточную адгезию, как на простых образцах, полученных после сортировки по какому-либо маркеру [14, 17], так и в цельных образцах первичной культуры РЭ [23]. В последнем случае количественный анализ сводился к измерению размеров сфероидов, оценка же количественного содержания ОСК и установление связи с клинико-патологическими характеристиками образца не проводилась.

Цель исследования: изучить возможность применения метода сфероидообразования в культуре для оценки содержания ОСК РЭ в сложных образцах, содержащих различные клетки опухоли и микроокружения. Для достижения поставленной цели мы сравнили морфологические характеристики первичных культур РЭ в условиях адгезионного роста и в мягком агаре, а также изучили экспрессию маркера CD133 в двумерных культурах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Девять первичных культур РЭ было получено из фрагментов опухолей, удаленных в ходе оперативного вмешательства, проводимого в качестве первого этапа по лечению РЭ. Больные РЭ проходили лечение в отделении онкогинекологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации в 2023 г. Гистологический диагноз подтверждали в патологоанатомическом отделении ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Пациенты были осведомлены об участии в научном исследовании и подписывали информированное согласие на сбор биологического материала. Патологоанатомом в течение 20 минут после извлечения препарата выделялся фрагмент 0,5 см³, соответствующий злокачественному компоненту опухоли, и помещался в раствор Хэнкса (Gibco, США), содержащий 1 % гентамицина (Биолот, Россия). Далее образец фрагментировали скальпелем до размера 1–2 мм³, после чего добавляли 300 ед/мл коллагеназы I (Thermo Fisher Scientific, США) в среде DMEM (Биолот, Россия) и инкубировали в течение часа при температуре 37 °C при постоянном перемешивании. По окончании ферментации образец дополнительно измельчали пипетированием и пропускали через стерильный нейлоновый фильтр (d = 70 мкм) (Beckton Dickinson, США). Полученную суспензию дважды отмывали в фосфатном буфере и пассировали на культуральный флакон в среде DMEM, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Биолот, Россия) и 1 % гентамицина и культивировали в стандартных условиях при 37 °C и 5,0 % CO₂.

Для изучения способности клеток к сфероидообразованию двумерную культуру снимали с культурального пластика по стандартной методике при помощи 0,1 % раствора трипсина (Биолот, Россия). Полученную суспензию клеток смешивали с 0,35 % раствором агарозы в среде DMEM без сыворотки с добавлением инсулина-трансферина и факторов роста EGF (20 нг/мл) и FGF (20 нг/мл) и наслаивали на основу из 0,7 % агарозы в такой же среде. Всего таким способом вносили по $2,0 \times 10^4$ клеток на лунку 6-луночного планшета. Для каждой культуры было заложено по 6 повторов. Планшеты с клет-

ками культивировали 2 недели, в течение этого времени проводили фотографирование сфероидов. По окончании культивирования проводили определение среднего размера и подсчет сфероидов в лунке на имиджере Lionheart FX (BioTek, США) с использованием встроенного программного обеспечения. Частоту сфероидообразования подсчитывали как отношение количества сфероидов размером более 40 мкм в диаметре к общему количеству клеток, пассированных в лунку планшета.

Для проведения иммунофенотипирования на CD133 первичные культуры высаживали на покровные стёкла. После образования клеточного монослоя стёкла фиксировали в 4 % растворе параформальдегида в течение 15 минут при комнатной температуре, после чего проводили пермеабиллизацию в 0,5 % растворе Triton X-100 на фосфатном буфере в течение 10 минут. После отмывки стёкла блокировали в течение часа в растворе 5 % нормальной сыворотки козы (Gibco, США) в фосфатном буфере, после чего выдерживали ночь при 4 °C в растворе первичного поликлонального кроличьего антитела к CD133 (ab19898, Abcam, США) в фосфатном буфере (разведение 1/100) с добавлением 1 % сыворотки козы. После трехкратной отмывки стёкла в течение часа выдерживали при комнатной температуре в растворе вторичного козьего антитела, конъюгированного с Alexa Fluor®594 (ab150080, Abcam, США) (разведение 1/500), после чего отмывали фосфатным буфером, доокрашивали в растворе ядерного красителя DAPI (ab228549, Abcam, США) и монтировали на предметные стёкла в среде Anti-Fade Fluorescence Mounting Medium (ab104135, Abcam, США). Долю CD133 положительных клеток определяли на имиджере Lionheart FX (BioTek, США) с использованием встроенного программного обеспечения. Для каждой культуры было исследовано по 3 стекла.

Значения диаметра сфероидов, частоты сфероидообразования и доли CD133⁺ клеток приведены как выборочное среднее $\pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами было получено 9 первичных культур РЭ от 9 пациенток, проходивших лечение в отделении онкогинекологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации в 2023 г. Результаты патологоанатомического ис-

следования показали, что 2 опухоли принадлежали к гистологическому типу высокодифференцированных (G1), 6 – к умеренно дифференцированным (G2) и одна опухоль – к низкодифференцированному типу G3 эндометриоидных аденокарцином. При этом в трех случаях была выявлена лимфоваскулярная инвазия, однако ни у одной из пациенток не было обнаружено метастазов в регионарных лимфоузлах. Все случаи были отнесены к I-II стадии заболевания.

Все первичные клеточные культуры на 3 день культивирования в условиях, поддерживающих адгезию, образовывали монослой. Клетки РЭ в монослойной культуре имели относительно небольшие размеры и полигональную форму, часто образовывали «острова» и «розетки», которые располагались среди клеток стромы более вытянутой формы, предположительно, фибробласты. При культиви-

ровании в условиях, не поддерживающих адгезию клеток, на агарозе в среде для ОСК в 5 из 9 культур, начиная с 5-х суток культивирования, отмечалось формирование сфероидов. В 4 других культурах сфероиды не образовались даже спустя 2 недели культивирования. Не образовали сфероиды одна культура, полученная из высокодифференцированной опухоли, и 3 культуры – из умеренно дифференцированных опухолей. Таким образом, не наблюдалось явной связи частоты сфероидообразования со степенью дифференцировки опухоли. Для культур, которые образовали сфероиды в мягком агаре, было проведено дополнительное окрашивание двумерной культуры на маркер CD133.

Культура РЭ № 1. Высокодифференцированная эндометриоидная аденокарцинома G1 без признаков сосудистой инвазии. В первичной культуре наблюдались единичные крупные клетки полиго-

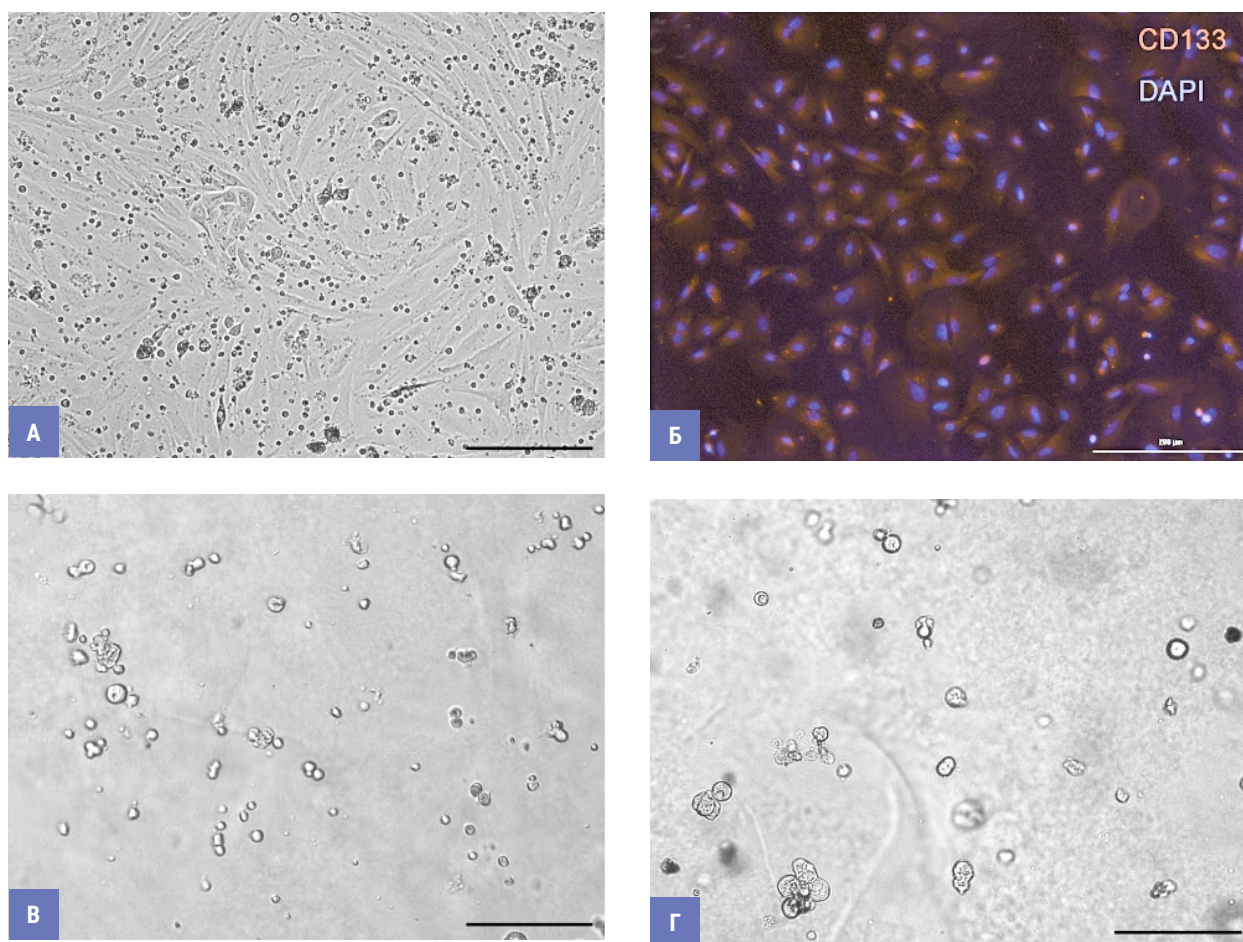


Рис. 1. Первичная культура рака эндометрия № 1. А – общий вид монослойной культуры; Б – окрашивание монослойной культуры на CD133; В – вид клеточных сфероидов в агарозе на 5-е сутки культивирования; Г – вид клеточных сфероидов в агарозе на 14-е сутки культивирования. Размер масштабной линейки 200 мкм

нальной или округлой формы среди многочисленных вытянутых клеток, предположительно, фибробластов (рис. 1А).

Экспрессия CD133 слабая, наблюдаются редкие гранулы маркера во всех клетках (рис. 1Б). Частота CD133⁺ клеток составила от 0,2 до 1,0 % ($0,8 \pm 0,15$ %). В культуре в агарозе наблюдался очень медленный рост клеточных сфероидов из единичных крупных клеток. На пятый день культивирования сфероиды еще не обнаруживались (рис. 1В), а через две недели образовались небольшие сфероиды из 4–8 клеток (рис. 1Г). Частота сфероидообразования на 14-е сутки составила от 0,1 до 0,7 % ($0,5 \pm 0,1$ %).

Культура РЭ № 2. Низкодифференцированная эндометриоидная аденокарцинома G3 без признаков сосудистой инвазии. В условиях культивирования, поддерживающих клеточную адгезию, клетки первичной

культуры образовали монослой из двух типов клеток, по своему внешнему виду похожий на культуру РЭ № 3 (рис. 3А): мелкие полигональные клетки, объединенные в островки среди более крупных и вытянутых клеток, похожих на фибробласты (рис. 2А).

При этом островки полигональных клеток могли образовывать сфероидоподобные структуры, внутри которых наблюдалась повышенная экспрессия CD133. Также среди монослоя встречались отдельные крупные клетки, экспрессирующие CD133 выше общего уровня (рис. 2Б). Частота CD133⁺ клеток составила от 2,7 до 8,0 % ($4,8 \pm 1,5$ %). На пятый день культивирования в условиях, не поддерживающих адгезию, в среде для ОСК культура РЭ № 3 образовывала небольшие клеточные сфероиды из 4–8 клеток с частотой примерно 15 % (рис. 2В). Далее часть из клеточных сфероидов продемонстрировала быстрый рост и спустя две

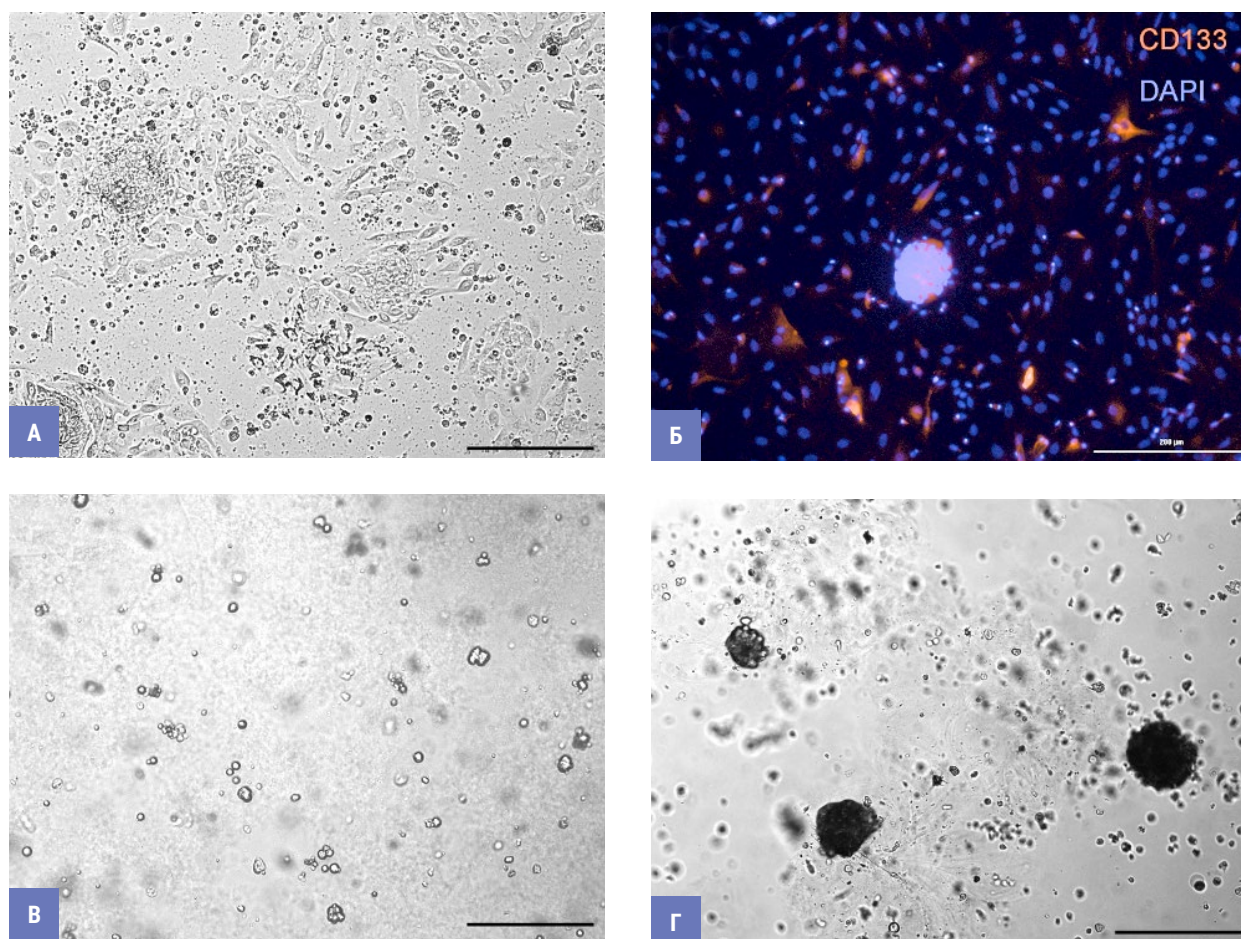


Рис. 2. Первичная культура рака эндометрия № 2. А – общий вид монослойной культуры; Б – окрашивание монослойной культуры на CD133; В – вид клеточных сфероидов в агарозе на 5-е сутки культивирования; Г – вид клеточных сфероидов в агарозе на 14-е сутки культивирования. Размер масштабной линейки 200 мкм

недели культивирования достигла 80–150 мкм в диаметре ($110,3 \pm 32,7$ мкм). Частота сфероидообразования на 14-е сутки составила от 0,3 до 2,5 % ($1,5 \pm 0,8$ %) (рис. 2Г).

Культура РЭ № 3. Умеренно дифференцированная эндометриоидная аденокарцинома G2 с признаками сосудистой инвазии. Культура в монослое имела выраженное деление на мелкие полигональные клетки, объединенные в островки среди более крупных и вытянутых клеток, похожих на фибробласты (рис. 3А).

Иммунофлуоресцентное окрашивание показало повышенное содержание маркера CD133 именно в мелких полигональных клетках, при этом отдельные клетки показывали особенно яркую метку (рис. 3Б). Частота CD133⁺ клеток составила от 5,8 до 16,9 % ($11,2 \pm 5,2$ %). При выращивании на агарозе в среде для ОСК на 5-й день в культуре около 15 %

клеток образовали сфероиды 5–30 мкм в диаметре (рис. 3В). Спустя две недели культивирования в агарозе отдельные клеточные сфероиды увеличились в размерах до 30–150 мкм в диаметре, остальные сфероиды деградировали ($98,3 \pm 51,4$ мкм). Частота сфероидообразования на 14-е сутки составила от 0,3 до 10,1 % ($5,7 \pm 4,1$ %) (рис. 3Г).

Культура РЭ № 4. Умеренно дифференцированная эндометриоидная аденокарцинома G2 без признаков сосудистой инвазии. В монослойной культуре наблюдались отдельные или собранные в небольшие группы крупные полигональные клетки на фоне вытянутых клеток различных размеров (рис. 4А).

При окрашивании на маркер ОСК РЭ CD133 положительную реакцию показали не только крупные полигональные клетки и их скопления, но и многочисленные мелкие вытянутые клетки. Также в препарате обнаруживались положительные на CD133

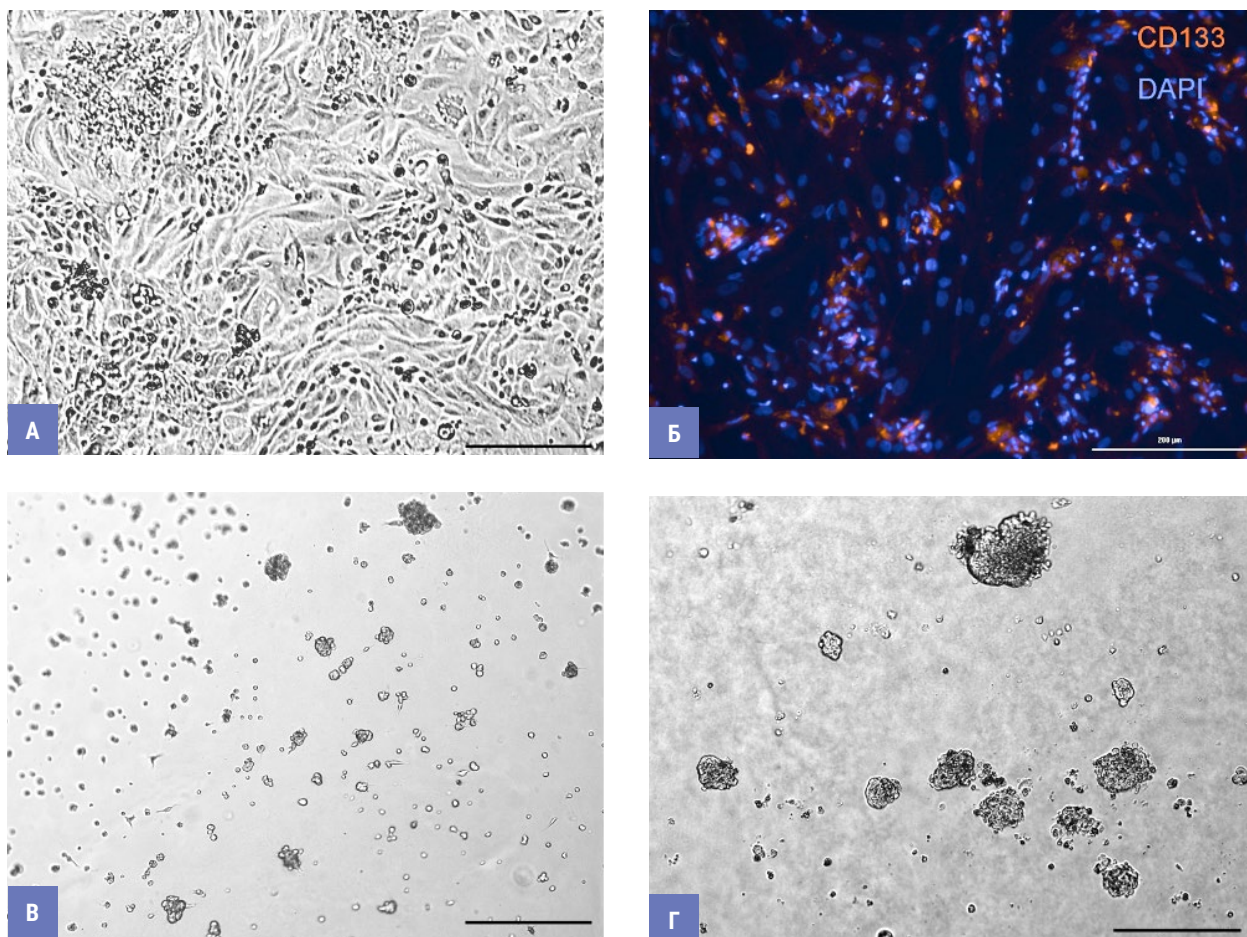


Рис. 3. Первичная культура рака эндометрия №3. А – общий вид монослойной культуры; Б – окрашивание монослойной культуры на CD133; В – вид клеточных сфероидов в агарозе на 5-е сутки культивирования; Г – вид клеточных сфероидов в агарозе на 14-е сутки культивирования. Размер масштабной линейки 200 мкм

крупные многоядерные клетки (рис. 4Б). Частота CD133⁺ клеток составила от 40,1 до 65,2 % (среднее $52,2 \pm 10,2$ %). Спустя пять суток культивирования в агарозе примерно 5–10 % клеток культуры образовали небольшие рыхлые сфероиды из 4–16 клеток (рис. 4В), через две недели сфероиды увеличились до 20–80 мкм в диаметре ($54,7 \pm 28,4$ мкм), частота сфероидообразования на 14-е сутки составила от 2,1 до 8,4 % ($5,1 \pm 2,7$ %) (рис. 4Г).

Культура РЭ № 5. Умеренно дифференцированная эндометриоидная аденокарцинома G2 без признаков сосудистой инвазии. В монослойной культуре среди вытянутых клеток стромального происхождения встречались островки довольно крупных полигональных клеток эпителиальной морфологии (рис. 5А).

Реакция на CD133 была схожа с культурой РЭ № 2, а именно, положительное окрашивание

демонстрировали отдельные крупные клетки вытянутой или эпителиальной морфологии с определенной группой мелких вытянутых клеток, которые благодаря окрашиванию выделяются на фоне более крупных вытянутых клеток, отрицательных по CD133 (рис. 5Б). Частота CD133⁺ клеток составила от 22,4 до 51,2 % ($35,5 \pm 12,7$ %). На пятый день культивирования в условиях, не поддерживающих адгезию, культура РЭ № 5 образовывала небольшие клеточные сфероиды из 2–4 клеток с частотой, примерно, 5 % (рис. 5В). Далее часть из клеточных сфероидов продемонстрировала быстрый рост и достигла 30–80 мкм в диаметре спустя две недели культивирования (среднее $55,4 \pm 25,1$ мкм). Частота сфероидообразования на 14-е сутки составила от 0,5 до 2,8 % ($1,8 \pm 0,9$ %) (рис. 5Г).

Характеристики первичных культур РЭ объединены в таблице (табл. 1).

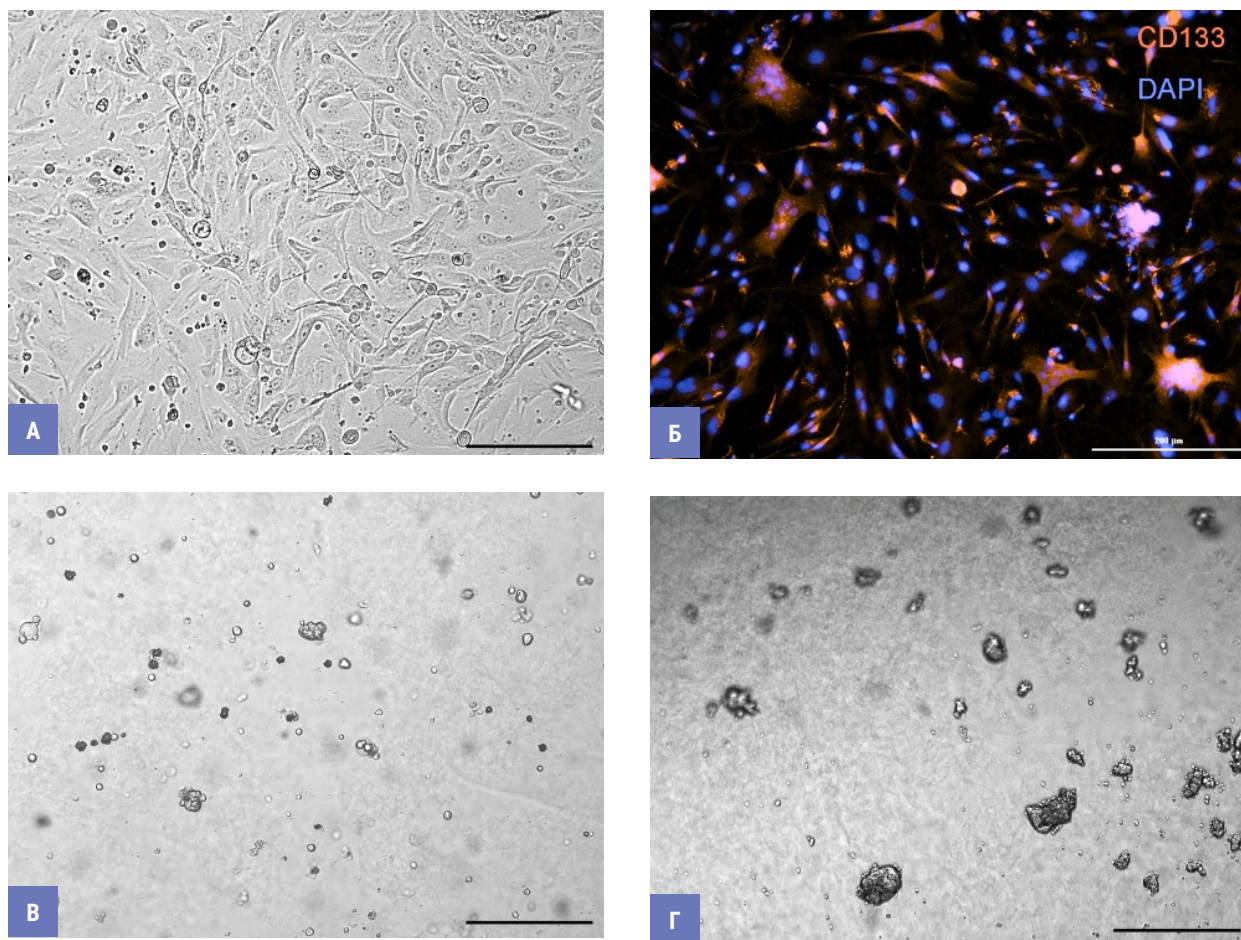


Рис. 4. Первичная культура рака эндометрия № 4. А – общий вид монослойной культуры; Б – окрашивание монослойной культуры на CD133; В – вид клеточных сфероидов в агарозе на 5-е сутки культивирования; Г – вид клеточных сфероидов в агарозе на 14-е сутки культивирования. Размер масштабной линейки 200 мкм

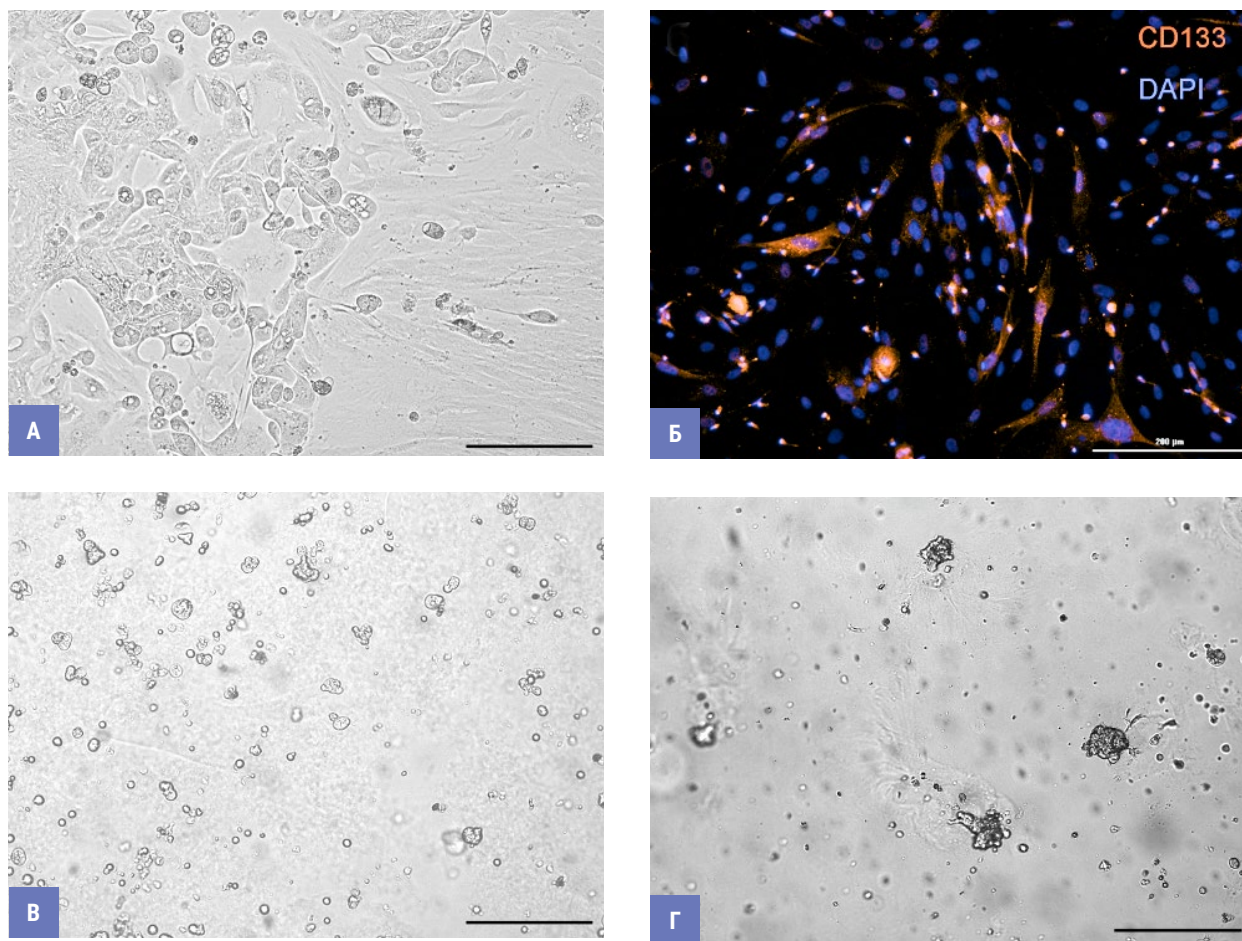


Рис. 5. Первичная культура рака эндометрия № 5. А – общий вид монослойной культуры; Б – окрашивание монослойной культуры на CD133; В – вид клеточных сфероидов в агарозе на 5-е сутки культивирования; Г – вид клеточных сфероидов в агарозе на 14-е сутки культивирования. Размер масштабной линейки 200 мкм

Таблица 1. Сводная характеристика первичных культур рака эндометрия

№ культуры	Степень дифф-ки	Лимфо-васк. инвазия	Реакция на CD133, доля CD133 ⁺ клеток, среднее $\pm$ SD %	Частота сфероидов ≥ 40 мкм на 14 сут, среднее $\pm$ SD, %	Диаметр сфероидов на 14 сут, среднее $\pm$ SD, мкм
№ 1	G1	нет	$0,8 \pm 0,15$ %, слабая реакция в некоторых крупных стромальных клетках, единичные полигональные клетки с яркой окраской	$0,5 \pm 0,1$	20 ± 10
№ 2	G3	нет	$4,8 \pm 1,5$ %, мелкие полигональные клетки в плотных колониях, отдельные стромальные клетки	$1,5 \pm 0,8$ %	$110,3 \pm 32,7$
№ 3	G2	есть	$11,2 \pm 5,2$ %, мелкие полигональные клетки в плотных колониях	$5,7 \pm 4,1$ %	$98,3 \pm 51,4$
№ 4	G2	нет	$52,2 \pm 10,2$ %, полигональные отростчатые крупные многоядерные клетки, стромальные мелкие вытянутые клетки	$5,1 \pm 2,7$ %	$54,7 \pm 28,4$
№ 5	G2	нет	$35,5 \pm 12,7$ %, отдельные крупные и мелкие стромальные клетки вытянутой формы, отдельные крупные полигональные клетки	$1,8 \pm 0,9$ %	$55,4 \pm 25,1$

Наименьшая частота сфероидообразования, как и наименьшая частота CD133⁺ клеток, наблюдались в культуре, полученной из высокодифференцированной опухоли.

ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех полученных первичных культурах отмечается присутствие стромального компонента, представленного вытянутыми клетками разных размеров, демонстрирующими от отрицательной (№ 1, № 2, № 3) до средней и высокой экспрессии CD133 (№ 4, № 5). Кроме того, в культурах отмечаются клетки полигональной формы, которые встречаются в виде островков среди стромальных клеток. Их размеры различаются между культурами, и по этому признаку культуры можно разделить на две группы – включающие мелкие полигональные клетки, которые собираются в плотные колонии-«купола» (культуры № 1 и № 2), и включающие более крупные полигональные клетки, которые могут образовать плоские острова разных размеров (культуры № 1, № 4 и № 5). Экспрессия маркера CD133 в этих клетках достаточно выражена, особенно на фоне слабо окрашенного стромального компонента, состоящего из крупных клеток (культуры № 4 и № 5).

Наличие в первичных культурах РЭ клеток вытянутой или отростчатой формы, напоминающих фибробласты и способных образовывать сфероиды в условиях, не поддерживающих клеточную адгезию, отмечалось также в работе Helweg (2022) [23]. Полученная нами картина состава клеточных культур по морфологии клеток похожа также на результаты, полученные в работе Chan и соавт. (2004) [24]. В данном исследовании авторы изучили поведение в культуре различных клеток нормального эндометрия человека, выделенных из эпителиального и базального слоев [24]. По данным авторов, эпителиальный слой давал две группы полигональных клеток – мелкие, собирающиеся в тесные колонии клетки с высокой способностью к пролиферации, и более крупные клетки, образующие более рыхлые колонии на культуральном пластике. Стромальный компонент ткани эндометрия состоял из двух типов вытянутых клеток: крупные неплотно лежащие клетки и мелкие тесно лежащие, дающие завитки в монослое, клетки. Стромальные клетки эндометрия человека, кроме того, положительно окрашивались на маркеры фибробластов (CD90, 5B5, коллаген типа I), что подтверждает родство этих клеток

с фибробластами и, возможно, миофибробластами, которые экспрессируют маркеры как фибробластов, так и гладкомышечных клеток. Таким образом, по картине двумерной культуры, полученной в нашей работе, невозможно однозначно выделить, какие клетки относятся к ОСК, так как внешне они мало отличимы от нормальных клеток эндометрия.

Экспрессия маркера ОСК CD133 в полученных нами культурах составила от 0,8 до 52,2 % в среднем. Полученные данные выходят за диапазон 5,7–27,4 %, который указывают другие авторы [16, 17]. Также выявлена нелинейная связь экспрессии CD133 и степени дифференцировки опухоли – как высокая, так и низкая дифференцировка ассоциировались сниженной по сравнению со средней дифференцировкой иммунореактивностью на CD133. Не было установлено какой-либо связи между уровнем экспрессии CD133, степенью дифференцировки и другими клинико-патологическими характеристиками опухоли также в работе Nakamura [20]. Известно, что CD133 встречается в нормальных дифференцированных клетках эндометрия. Таким образом, на основании существующих данных нельзя определить, в какой мере экспрессия CD133 отражает степень злокачественности клеток в первичных культурах РЭ и уровень их дифференцировки. Для решения этой проблемы требуются более масштабные исследования, включающие сравнение нормальной ткани эндометрия и РЭ.

Частота сфероидообразования в наших культурах составила от 0,5 до 5,7 % в среднем. Известно, что частота клеток, обладающих свойствами СК, в нормальном эндометрии составляет 0,02–0,1 % [24]. Не будет слишком большим допущением принять эти уровни как ориентировочные для оценки частоты сфероидообразования в культурах нормального эндометрия. В научной литературе нами не было обнаружено данных о частоте образования сфероидов в условиях, не поддерживающих клеточную адгезию, в цельных культурах РЭ, так как обычно объектом исследования становятся отдельные субпопуляции, очищенные по признаку экспрессии маркера или удержания ядерного красителя. Однако, принимая во внимание тот факт, что частота сфероидообразования является наибольшей среди CD133⁺ клеток РЭ и составляет в этой субпопуляции 11,7 % [17], а также то, что общее содержание этих клеток в РЭ колеблется в пределах от 5,7 до 27,4 % [16], мы можем путем перемножения этих показателей получить примерную частоту сферо-

идообразования в смешанной культуре РЭ, которая составит в этом случае 0,7–3,2 %. Таким образом, полученные нами результаты лежат в диапазоне, соответствующем известным данным по РЭ, следовательно, основная часть сфероидов в наших культурах предположительно образована именно злокачественными клетками с фенотипом ОСК.

Наши данные показывают, что в культурах РЭ общая реакция на CD133 не демонстрирует явной связи с частотой сфероидообразования. Так, в культурах № 4 и № 5 частота сфероидообразования на порядок меньше, чем содержание CD133⁺ клеток. В связи с этим возникает вопрос о том, какие клетки являются источниками сфероидов в культурах РЭ? Сопоставление с морфологическими особенностями и фенотипом нормального эндометрия [21, 24, 25], указывает на ряд закономерностей. Так, в культуре № 1, полученной из высокодифференцированной опухоли, в монослое мы видим крупные клетки, похожие на ограниченно делящиеся клетки-предшественники стромального и эпителиального компонентов нормального эндометрия [24]. Экспрессия маркера CD133 в этих клетках очень слабая, при этом данная культура с частотой менее 1 % образовывала на мягком агаре небольшие лимфоидные (рыхлые) сфероиды. Лимфоидные колонии в условиях, не поддерживающих адгезию, могут образовывать иммунные клетки, а именно, Т-лимфоциты и НК в присутствии специфических цитокинов, таких как ИЛ-2, ИЛ-15 или ИЛ-7 [26]. Надежным отличием лимфоцитов от других клеток, тем не менее, можно считать их характерный внешний вид – даже в стимулированном состоянии это некрупные клетки (6–15 мкм) с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением [27]. В нашем случае клетки в колониях имеют более крупные размеры (около 40 мкм в диаметре), а значит, с высокой вероятностью не являются лимфоцитами. Вместе с тем, сфероиды культуры № 1 похожи на лимфоидные колонии, которые получили из ткани РЭ в работе Tabuchi [28]. В культуре № 2, полученной из низкодифференцированной опухоли (G3), также содержатся CD133⁺ фибробластоподобные клетки, однако на их фоне хорошо выделяется субпопуляция мелких полигональных клеток, демонстрирующих яркую иммунореактивность на CD133, которая по морфологии больше всего похожа на клетки, обладающие свойствами стволовых, в работе Chan и соавт. [24]. Также в этой культуре при выращивании на мягком агаре на-

блюдались крупные (около 90 мкм в диаметре) сфероиды, хоть и с небольшой частотой (около 1,5 %). Несмотря на то, что специальной селекции по маркеру не проводилось, небольшим допущением будет принять, что именно эти CD133⁺ клетки образуют сфероиды, коль скоро крупные фибробластоподобные CD133⁺ клетки не давали похожих крупных сфероидов в культуре № 1. Подтверждением этого предположения может быть и тот факт, что культура № 3, по фенотипу похожая на культуру № 2, с четко выделяющейся на фоне слабо окрашенного стромального компонента субпопуляцией мелких образующих плотные колонии CD133⁺ клеток, также образовывала крупные (около 115 мкм в диаметре) сфероиды в мягком агаре с частотой около 10 %. Еще одним источником сфероидов могут быть мелкие ярко окрашенные на CD133 веретеновидные клетки, обнаруженные в культурах № 5 и № 4. Морфологические особенности этих клеток соответствует тканевым стволовым клеткам, из которых CD133 экспрессируют, например, эпителиальные или эндотелиальные СК, которые в норме присутствуют в эндометрии [30, 31]. Согласно литературным данным, размеры и внешний вид колоний, образуемых на мягком агаре такими нормальными стволовыми клетками, не отличаются от сфероидов, полученных из ОСК [31]. Наконец, для субпопуляции относительно крупных полигональных CD133⁺ клеток, которые присутствуют в культурах № 4 и № 5, связь со сфероидами проследить нельзя, хотя эти клетки можно уверенно отнести к злокачественному компоненту, коль скоро в них иногда наблюдаются признаки многоядерности. Нельзя утверждать также, что отрицательные на CD133 клетки не производят сфероиды на мягком агаре, так как в работе Ding [29], в частности, показали, что, как CD133⁺, так и CD133[–] клетки, отсортированные из ткани опухоли эндометрия по этому маркеру, могут образовывать сфероиды, но во втором случае менее эффективно.

Таким образом, невозможно однозначно установить, какие из клеток полученных нами первичных культур РЭ принимали участие в формировании сфероидов. Некоторая предположительная связь может быть установлена только для мелких эпителиоподобных и фибробластоподобных CD133⁺ клеток, из которых только первые могут быть условно отнесены к злокачественным. Для выявления именно ОСК РЭ требуется провести сравнительное исследование клеточных культур на мягком агаре,

полученных из ткани опухоли и соответствующей ей нормальной ткани, в сочетании с клеточным сортированием с использованием маркеров CD133, CD44, CD117, CD24, CD47 и других, для которых были установлены связь с ОСК и нормальными стромальными стволовыми клетками [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нам удалось получить и охарактеризовать культуру клеточных сфероидов из послеоперационного

материала РЭ. Тем не менее, показатели частоты сфероидообразования и среднего размера сфероидов в этой культуре не могут служить маркером количества ОСК в ткани опухоли без сравнения этих данных для ткани опухоли и нормального эндометрия. Требуется более подробное изучение клеточных субпопуляций РЭ в сравнении с нормальным эндометрием для установления связи между наблюдаемым разнообразием клеток в культуре и их способностью к сфероидообразованию и другими характеристиками ОСК.

Список источников

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году. Под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022, 239 с.
3. Giannone G, Attademo L, Scotto G, Genta S, Ghisoni E, Tuninetti V, et al. Endometrial Cancer Stem Cells: Role, Characterization and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel).* 2019 Nov 19;11(11):1820. <https://doi.org/10.3390/cancers11111820>
4. Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, et al. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol.* 2020;11:1280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>
5. Hubbard SA, Friel AM, Kumar B, Zhang L, Rueda BR, Gargett CE. Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 2009 Nov 1;69(21):8241–8248. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4808>
6. Rahadiani N, Ikeda J ichiro, Mamat S, Matsuzaki S, Ueda Y, Umehara R, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. *Cancer Sci.* 2011 Apr;102(4):903–908. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01864.x>
7. Lennartsson J, Rönstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev.* 2012 Oct;92(4):1619–1649. <https://doi.org/10.1152/physrev.00046.2011>
8. Zhang X, Kyo S, Nakamura M, Mizumoto Y, Maida Y, Bono Y, et al. Imatinib sensitizes endometrial cancer cells to cisplatin by targeting CD117-positive growth-competent cells. *Cancer Lett.* 2014 Apr 1;345(1):106–114. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.020>
9. Saygin C, Wiechert A, Rao VS, Alluri R, Connor E, Thiagarajan PS, et al. CD55 regulates self-renewal and cisplatin resistance in endometrioid tumors. *J Exp Med.* 2017 Sep 4;214(9):2715–2732. <https://doi.org/10.1084/jem.20170438>
10. Hassn Mesrati M, Syafruddin SE, Mohtar MA, Syahir A. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. *Biomolecules.* 2021 Dec 9;11(12):1850. <https://doi.org/10.3390/biom11121850>
11. Elbasateeny SS, Salem AA, Abdelsalam WA, Salem RA. Immunohistochemical expression of cancer stem cell related markers CD44 and CD133 in endometrial cancer. *Pathol Res Pract.* 2016 Jan;212(1):10–16. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.10.008>
12. Park JY, Hong D, Park JY. Association between Morphological Patterns of Myometrial Invasion and Cancer Stem Cell Markers in Endometrial Endometrioid Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2019 Jan;25(1):123–130. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0320-5>
13. Грабовенко Ф. И., Кисиль О. В., Павлова Г. В., Зверева М. Э. Белок CD133 как маркер опухолевых стволовых клеток. *Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н. Н. Бурденко.* 2022;86(6):113–120. <https://doi.org/10.17116/neiro202286061113>, EDN: FYRKWQ
14. Rutella S, Bonanno G, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Prisco MG, et al. Cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the CD133 antigen in human endometrial tumors. *Clin Cancer Res.* 2009 Jul 1;15(13):4299–311. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1883>

15. Gao Y, Liu T, Cheng W, Wang H. Isolation and characterization of proliferative, migratory and multidrug-resistant endometrial carcinoma-initiating cells from human type II endometrial carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* 2012 Aug;28(2):527–532. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1807>
16. Friel AM, Zhang L, Curley MD, Therrien VA, Sergeant PA, Belden SE, et al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Dec 1;8:147. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-147>
17. Sun Y, Yoshida T, Okabe M, Zhou K, Wang F, Soko C, et al. Isolation of Stem-Like Cancer Cells in Primary Endometrial Cancer Using Cell Surface Markers CD133 and CXCR4. *Transl Oncol.* 2017 Dec;10(6):976–987. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.07.007>
18. Кутилин Д. С., Никитин И. С., Кит О. И. Особенности экспрессии генов некоторых транскрипционных факторов при малигнизации тканей тела матки. *Успехи молекулярной онкологии.* 2019;6(1):57–62. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2019-6-1-57-62>, EDN: KWOXFG
19. Mancebo G, Sole-Sedeno JM, Pino O, Miralpeix E, Mojal S, Garrigos L, et al. Prognostic impact of CD133 expression in Endometrial Cancer Patients. *Sci Rep.* 2017 Aug 9;7(1):7687. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08048-0>
20. Nakamura M, Kyo S, Zhang B, Zhang X, Mizumoto Y, Takakura M, et al. Prognostic impact of CD133 expression as a tumor-initiating cell marker in endometrial cancer. *Hum Pathol.* 2010 Nov;41(11):1516–1529. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.05.006>
21. Karbanová J, Missol-Kolka E, Fonseca AV, Lorra C, Janich P, Hollerová H, et al. The stem cell marker CD133 (Prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia. *J Histochem Cytochem.* 2008 Nov;56(11):977–993. <https://doi.org/10.1369/jhc.2008.951897>
22. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011 May 6;8(5):486–498. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.007>
23. Helweg LP, Windmüller BA, Burghardt L, Storm J, Förster C, Wethkamp N, et al. The Diminishment of Novel Endometrial Carcinoma-Derived Stem-like Cells by Targeting Mitochondrial Bioenergetics and MYC. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 22;23(5):2426. <https://doi.org/10.3390/ijms23052426>
24. Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod.* 2004 Jun;70(6):1738–50. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024109>
25. Schwab KE, Hutchinson P, Gargett CE. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Reprod.* 2008 Apr;23(4):934–943. <https://doi.org/10.1093/humrep/den051>
26. Ситковская А. О., Златник Е. Ю., Филиппова С. Ю., Бондаренко Е. С., Ващенко Л. Н., Кечеджиева Э. Э. и др. Влияние интерлейкинов 2, 7, 15 на пролиферацию натуральных киллеров in vitro. *Российский биотерапевтический журнал.* 2021;20(1):56–66. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-1-56-66>, EDN: SKZQFC
27. Хаитов Р. М. Иммунология: учебник. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015, 528 с.
28. Tabuchi Y, Hirohashi Y, Hashimoto S, Mariya T, Asano T, Ikeo K, et al. Clonal analysis revealed functional heterogeneity in cancer stem-like cell phenotypes in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2019 Feb;106:78–88. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2018.11.013>
29. Ding DC, Liu HW, Chang YH, Chu TY. Expression of CD133 in endometrial cancer cells and its implications. *J Cancer.* 2017;8(11):2142–2153. <https://doi.org/10.7150/jca.18869>
30. Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A.* 2010 Jan;77(1):6–10. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20844>
31. Ulrich D, Tan KS, Deane J, Schwab K, Cheong A, Rosamilia A, et al. Mesenchymal stem/stromal cells in post-menopausal endometrium. *Hum Reprod.* 2014 Sep;29(9):1895–1905. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu159>
32. Frąszczak K, Barczyński B. Characteristics of Cancer Stem Cells and Their Potential Role in Endometrial Cancer. *Cancers (Basel).* 2024 Mar 7;16(6):1083. <https://doi.org/10.3390/cancers16061083>

Информация об авторах:

Филиппова Светлана Юрьевна – научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>, SPIN: 9586-2785, AuthorID: 878784, ResearcherID: AAH-4408-2020, Scopus Author ID: 57189618843

Межева Ирина Валентиновна – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 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

Чембарова Татьяна Владимировна ✉ – младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 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

Новикова Инна Арнольдовна – д.м.н., заместитель генерального директора по науке, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>, SPIN: 4810-2424, AuthorID: 726229, ResearcherID: E-7710-2018, Scopus Author ID: 57202252773

Вереникина Екатерина Владимировна – д.м.н., заведующая отделением онкогинекологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1084-5176>, SPIN: 6610-7824, AuthorID: 734269, Scopus Author ID: 57194271506

Женило Оксана Евгеньевна – к.м.н., врач-онколог отделения онкогинекологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9833-8530>, SPIN: 4078-7080, AuthorID: 732220

Половодова Вероника Васильевна – аспирант, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-8863-6229>, SPIN: 3051-4734, AuthorID: 1214151

Шапошников Александр Васильевич – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник торакоабдоминального отдела, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6881-2281>, SPIN: 8756-9438, AuthorID: 712823

Шалашная Елена Владимировна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7742-4918>, SPIN: 2752-0907, AuthorID: 476968, ResearcherID: AAE-4085-2022, Scopus Author ID: 55144159900

Маслов Андрей Александрович – д.м.н., профессор, главный врач, заслуженный врач Российской Федерации, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7328-8074>, SPIN: 5963-5915, AuthorID: 817983

Ишонина Оксана Георгиевна – к.б.н., заведующий отделом подготовки и переподготовки специалистов, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5300-1213>, SPIN: 4051-5165, AuthorID: 612417, Scopus Author ID: 37115461900

Вклад авторов:

Филиппова С. Ю. – концепция и дизайн исследования, написание рукописи, интерпретация результатов;
Межева И. В. – проведение эксперимента;
Чембарова Т. В. – техническое редактирование рукописи;
Новикова И. А. – научное редактирование статьи;
Вереникина Е. В. – предоставление биологического материала пациентов;
Женило О. Е. – предоставление биологического материала пациентов;
Половодова В. В. – предоставление биологического материала пациентов;
Шапошников А. В. – научное редактирование статьи;
Шалашная Е. В. – научное редактирование статьи;
Маслов А. А. – научное редактирование статьи;
Ишонина О. Г. – научное редактирование статьи.