

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОДУЛЯЦИИ СТВОЛОВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ФОРМИРОВАНИИ СФЕРОИДОВ: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор

© 2023 А.С. Пономарев, З.Е. Гилязиева, В.В. Соловьева, А.А. Ризванов*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008 Казань, Республика Татарстан, Россия; электронная почта: rizvanov@gmail.com*

Поступила в редакцию 31.01.2023

После доработки 30.05.2023

Принята к публикации 07.06.2023

Опухолевые стволовые клетки (ОСК), их свойства и взаимодействие с микроокружением представляют интерес для современной медицины и биологии. Существует множество исследований возникновения ОСК и их вовлечённости в патогенез опухоли. Важнейшее свойство, присущее ОСК — это стволовость. Стволовость сочетает в себе способность клетки сохранять свою плюрипотентность, давать начало дифференцированным клеткам и взаимодействовать с окружающей средой для поддержания баланса между покоем, пролиферацией и регенерацией. В то время как взрослые стволовые клетки проявляют эти свойства, участвуя в гомеостазе тканей, ОСК ведут себя как их злокачественные эквиваленты. Высокая устойчивость опухоли к терапии, способность дифференцироваться, активировать ангиогенез и метастазирование возникает именно за счёт стволовости ОСК. Данные клетки могут использоваться в качестве мишени при терапии различных типов рака. Для изучения биологии рака и поиска новых терапевтических стратегий необходимы лабораторные модели. Перспективным направлением являются трёхмерные модели опухолей или сфероиды. В таких моделях формируются свойства, напоминающие стволовость в естественной опухоли. С помощью модификации сфероидов становится возможным исследовать влияние терапии на ОСК, тем самым способствуя развитию тест-систем противоопухолевых лекарственных средств. В обзоре рассматривается ниша ОСК, возможность их исследования с помощью использования трёхмерных сфероидов и существующие маркеры для оценки такого свойства ОСК, как стволовость.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухолевые стволовые клетки, стволовость, злокачественные новообразования, опухолевые сфероиды, микроокружение опухоли, факторы транскрипции, тест-система.

DOI: 10.31857/S0320972523070102, **EDN:** FXXZAF

ВВЕДЕНИЕ

Опухолевые стволовые клетки (ОСК) — небольшая субпопуляция опухолевых клеток [1–3], которая обладает свойствами стволовых клеток (СК) [4, 5]. СК и ОСК имеют сходства и различия. К сходствам можно отнести идентичность маркеров клеточной поверхности, а также способность к дифференцировке и самообновлению с помощью использования общих сигнальных путей [6]. Одним из различий между СК и ОСК является степень их за-

висимости от ниши, в которой они находятся. ОСК могут изменять свою нишу с помощью сигналов, стимулирующих пролиферацию, в отличие от СК. СК стабильны и содержат нормальный диплоидный геном, но ОСК являются анеуплоидными с хромосомными перестройками. Кроме того, СК, как правило, находятся в состоянии покоя и имеют относительно длинные теломеры, что нехарактерно для ОСК.

Наличие ОСК в опухолевой ткани обуславливает образование фенотипически различных

Принятые сокращения: МО — микроокружение опухоли; МСК — мезенхимные стволовые клетки; ОСК — опухолевые стволовые клетки; СК — стволовые клетки; ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход; ALDH — альдегиддегидрогеназа; ЕpCAM — молекула адгезии эпителиальных клеток.

* Адресат для корреспонденции.

субклонов и приводит к дифференцированному клеточному составу опухоли [7]. Различие между ростом опухоли и обновлением ткани с участием СК заключается в дальнейшем пути развития транзитно-амплифицирующих клеток: обычно они дифференцируются и погибают, но в случае с опухолевыми клетками они накапливаются в организме и ускоряют опухолевый рост [8].

В отличие от дифференцированных опухолевых клеток, составляющих значительную часть опухоли и использующих гликолиз как способ получения энергии, ОСК обладают отчётливым метаболическим фенотипом, который, в зависимости от типа рака, может быть «гликолитическим» или присущим обычным клеткам — с сохранением окислительного фосфорилирования [9]. Отличием ОСК является онкогенная активность, позволяющая им образовывать опухоли при трансплантации лабораторным животным, что невозможно при трансплантации нормальных СК [10].

ОСК могут влиять на метаболизм соседних клеток, снабжать их питательными веществами и создавать благоприятные условия для роста опухоли. Наличие ОСК в микроокружении опухоли (МО) приводит к образованию гетерогенных клеточных популяций с высоким потенциалом пластичности [11, 12] и высокой устойчивостью к стрессовым факторам в МО (таких как низкий уровень кислорода или питательных веществ) [13, 14].

Доля ОСК в опухолевых тканях очень мала и обычно составляет не более 2% от общей массы опухоли. Для ОСК характерно наличие определённых маркеров, зависящих от типа ткани, в которой они располагаются (табл. 1). Около 73% поверхностных маркеров ОСК присутствует на мембранах эмбриональных клеток или СК взрослого организма и редко экспрессируется на мембранах дифференцированных клеток [15]. Показано, что лейкозные СК обладают фенотипом $CD34^+CD38^-$, отсутствие $CD38$ отличает эти клетки от нормальных гемопоэтических СК (ГСК) [16]. Singh et al. показали присутствие $CD133^+$ ОСК в опухолях глиобластомы [17], которые имеют устойчивость к химиотерапевтическому агенту темозоломиду, в отличие от $CD133^-$ клеток [18].

Кроме того, маркерами ОСК могут являться не только поверхностные антигены, но и микроРНК (miR-21, miR-210, miR-34a, miR-16 и др.) [45].

Стволовость относится к общим молекулярным процессам, лежащим в основе свойств самообновления СК и генерации дифференцированного потомства. Стволовость позволяет поддерживать популяцию клеток и баланс между покоем, пролиферацией и регенерацией [46]. Известно, что стволовость опухолевых клеток проявляется в сохранении наследственности, способности переживать стресс и влияние химиотерапевтических препаратов и является ключевым признаком прогрессирования

Таблица 1. Специфические маркеры ОСК для различных типов онкологических заболеваний

Маркеры ОСК	Орган	Литература
$CD133^+$, $CD49f^+$, $CD90^+$, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR ⁺), нейронспецифический антиген A2B5 ⁺ , молекула адгезии клеток L1 (L1CAM ⁺)	головной мозг	[19–23]
$CD133^+$, $CD24^+$, альдегиддегидрогеназа (ALDH ⁺), $CD44^+$ / $CD117^+$, молекула адгезии эпителиальных клеток (EPCAM ⁺)	яичники	[19, 24–26]
$CD133^+$, EPCAM ⁺ , $CD117^+$, $\alpha 2\beta 1^+$, ALDH ⁺ , $CD44^+$, гистон-лизин-N-метилтрансфераза EZH2 ⁺ , C-X-C хемокиновый рецептор 4 типа (CXCR4 ⁺), E-кадгерин (ECAD ⁺)	предстательная железа	[19, 27–29]
$CD133^+$, $CD44^+$, $CD166^+$, $CD24^+$, EPCAM ⁺	толстая кишка	[19, 30, 31]
$CD133^+$, $CD44^+$, $CD24^+$, EPCAM ⁺ , тирозин-протеинкиназа cMet ⁺	поджелудочная железа	[19, 32–34]
$CD44^+$, $CD90^+$, $CD206^+$, антиген OV-6 ⁺	печень	[19, 35–37]
$CD20^+$, $CD271^+$, ALDH ⁺ , $CD133^+$	кожа	[19, 38, 39]
$CD133^+$, АТФ-связывающий кассетный транспортёр ABCG2 ^{high} , $CD166^+$, $CD90^+$, $CD87^+$, ALDH ⁺ , $CD44^+$	лёгкие	[19, 40–42]
ALDH1 ⁺ , $CD24^+$, $CD44^+$, $CD90^+$, $CD133^+$, $\alpha 6$ -интегрин ⁺	молочная железа	[19, 43, 44]

онкологического заболевания [47, 48]. Было показано, что CD133⁺ СК карциномы толстой кишки обладают устойчивостью к фторурацилу и оксалиплатину, в отличие от CD133⁻ клеток [49].

Понимание генетических и эпигенетических изменений в опухолевых клетках, превращающихся в стволовые, является ключом к разработке новых терапевтических подходов. Расширить знания о патофизиологии ОСК в опухоли могут качественные модельные системы, позволяющие получить прикладную информацию о молекулярных свойствах злокачественной опухоли [46]. Ксенотрансплантаты хорошо зарекомендовали себя в качестве модели для изучения устойчивости ОСК. Например, ксенотрансплантаты, полученные из опухолевой ткани поджелудочной железы пациентов и обработанные гемцитабином, проявляли устойчивость к терапевтическому агенту благодаря ОСК [50]. При Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе ксенотрансплантаты имели более сильное генетическое сходство с образцами рецидива, чем с основной опухолью на момент постановки диагноза, что может означать естественный отбор резистентных клонов при ксенотрансплантации [51].

На сегодняшний день пробелы в изучении стволовости опухолевых клеток ставят перед исследователями задачу ответить на ряд вопросов, которые включают в себя следующие: насколько различны между собой СК опухолевой и нормальной ткани, будут ли происходить изменения стволовости при длительном течении заболевания, есть ли различия стволовости между типами опухолей одной ткани и как можно использовать это свойство для целей биологии и медицины [52].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ СТВОЛОВОСТИ

Нарушение регуляции экспрессии и активности факторов транскрипции в опухоли позволяет раковой клетке приобретать стволовость, выражающуюся в способности к самообновлению, дифференцировке и образованию опухолей *in vivo*. Такие ОСК обладают значительным потенциалом метастазирования и устойчивости к терапии, для объяснения которых требуется глубокое понимание молекулярных механизмов изменения транскрипционных факторов, ассоциированных со стволовостью. К основным транскрипционным факторам, играющим ключевую роль в регуляции роста ОСК, относятся OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 и MYC [53].

OCT4 контролирует самообновление и поддерживает плюрипотентность СК [54]. Сверхэкспрессия гена *OCT4* описана при некоторых типах онкологических заболеваний и способствует самообновлению СК и развитию лекарственной устойчивости [55, 56]. Нокдаун *OCT4* снижает стволовость опухолевых клеток [57]. Установлена корреляция между экспрессией *OCT4* и метастазированием колоректального рака в печень. Например, Fujino et al. исследовали клинические образцы и OCT4⁺ клетки колоректальной аденокарциномы. Уровень экспрессии *OCT4* коррелировал с частотой метастазирования в печень у пациентов, а OCT4⁺ клетки обладали способностью к самообновлению и дифференцировке аналогично ОСК [58]. Экспрессия *OCT4* клетками рака лёгких приводит к поляризации M2 макрофагов, индуцируя секрецию макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), что, в свою очередь, способствует росту опухоли и метастазированию [59].

SOX2 играет роль в развитии и поддержании стабильности недифференцированных эмбриональных СК (ЭСК), выполняет ключевые функции в регуляции пролиферации, самообновлении и в других процессах в СК, а также участвует в развитии стволовости опухолевых клеток [60, 61]. При трижды негативном раке молочной железы установлена сверхэкспрессия гена *SOX2*. Подавление экспрессии *SOX2* приводило к снижению пролиферации клеток трижды негативного рака молочной железы, подавлению способности клеток к инвазии, индукции апоптоза *in vitro* и снижению роста и метастазирования опухоли *in vivo* [62]. На ксенографтной модели мышей с остеосаркомой показано, что специфический для остеобластов условный нокаут *SOX2* вызывает резкое снижение частоты возникновения опухолей. Все вновь возникшие редкие опухоли, обнаруженные у подопытных животных с нокаутом *SOX2*, были SOX2-позитивными, что указывает на то, что они возникли из клеток, избежавших делеции *SOX2* [63]. При исследовании пациентов на поздних стадиях рака толстой и прямой кишки, желудка, яичников, а также меланомы было обнаружено, что коэкспрессия CD133 и *SOX2* связана с худшим прогнозом выживаемости [64].

NANOG является ключевым фактором для поддержания плюрипотентности и процесса самообновления ЭСК [65] и часто сверхэкспрессируется при многих типах онкологических заболеваний [66, 67]. При плоскоклеточном раке полости рта установлено повышение экспрессии NANOG с увеличением степени

Таблица 2. Влияние сигнальных путей на развитие онкологических заболеваний

Название сигнального пути	Функция	Активация в опухолевых клетках	Ссылки
Wnt/ β -катенин	регулирует эмбриогенез и дифференцировку клеток	молочной железы, толстой кишки, пищевода	[84–90]
Notch	один из наиболее важных сигнальных путей поддержания стабильности и функционирования СК	молочной железы, желудка, поджелудочной железы, толстой кишки и гематологических злокачественных новообразований	[91–93]
Hedgehog	участвует в эмбриональном развитии, формировании различных систем организма, включая нервную систему, а также такие органы, как лёгкие, сердце и кишечник	лёгкого, молочной железы, кожи, головного мозга, печени, желчного пузыря, поджелудочной железы, желудка, толстой кишки, простаты и гематологических злокачественных новообразований	[94–99]
NF- κ B	участвует в выживании, пролиферации и дифференцировке клеток	желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, головы и шеи, молочной железы	[100–102]
JAK/STAT	способствует выживанию, самообновлению, гематопоезу и нейрогенезу ЭСК	лёгких, толстой кишки, печени	[103–109]
PI3K/AKT/mTOR	важен для пролиферации и выживания клеток	молочной железы, лёгких, толстой кишки, костного мозга	[110–115]

Таблица 3. Белки и ферменты, участвующие в поддержании стволовости ОСК

Название	Роль	Ссылка
Галектин-3	играет роль в пролиферации клеток, динамической трансформации клеток, миграции и инвазии, выживании и апоптозе	[116]
Куллин 4B (CUL4B)	стимулирует развитие и метастазирование рака толстой кишки	[117]
Лизиндеметилаза 3A (KDM3A)	является критическим регулятором стволовости рака яичников и устойчивости к цисплатину	[118]
Фарнезилдифосфатсинтаза (FDPS)	играет важную роль в поддержании стволовости глиобластомы	[119]

дисплазии, что может являться ранним предиктором риска развития злокачественного новообразования [68]. Показано, что экспрессия гена *NANOG* связана с повышенной активностью ALDH и клеточной радиорезистентностью (посредством активации сигнальных путей NOTCH1 и AKT), а также со стимулированием репарации двухцепочечных разрывов ДНК [69]. Доказано, что мутации в гене *SPOP* приводят к отмене *SPOP*-опосредованной деградации *NANOG*, тем самым вызывая увеличение синтеза маркеров СК опухолевыми клетками простаты и снижая выживаемость пациентов [70].

KLF4 играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза и репрограммирования соматических клеток [71]. KLF4 активирует экспрессию теломеразы обратной транскриптазы (TERT) и способствует поддержанию плюрипотентности и самообновления ЭСК [72]. KLF4 может играть двойственную роль в канцерогенезе, либо стимулируя данный процесс, либо функционируя как онкосупрессор. Установлена сверхэкспрессия гена *KLF4* при разных типах меланом человека. Эктопическая экспрессия *KLF4* усиливает скорость деления клеток меланомы за счёт ингибирования апоптоза. Напротив, нокдаун

Таблица 4. Клинические испытания новых противоопухолевых стратегий терапии онкологических заболеваний, направленных на опухолевые СК

Тип рака	Описание испытания	Идентификатор ClinicalTrials.gov
Глиобластома	открытое рандомизированное исследование II/III фазы иммунотерапии дендритными клетками против ОСК у пациентов с глиобластомой, получающих стандартную терапию	NCT03548571
Аденокарцинома лёгкого, печени, поджелудочной железы	рандомизированное исследование, основной целью которого является определение безопасности иммунизации вакциной из ОСК	NCT02084823 NCT02089919 NCT02074046
Эпителиальный рак яичников, маточной трубы или брюшной полости	рандомизированное контролируемое клиническое исследование для определения сочетания препаратов с помощью анализа ChemoID (тест измеряет цитотоксический эффект препаратов и выявляет наиболее эффективный препарат, который может воздействовать на ОСК)	NCT03632798
Рак молочной железы	рандомизированное исследование II фазы, целью которого является оценка активности бевацизумаба в сочетании с традиционной химиотерапией против ОСК	NCT01190345
Карциномы, саркомы (лёгкого, пищевода, тимуса) или новообразования зародышевых клеток с плевропульмональными метастазами	нерандомизированное исследование I/II фазы, которое изучает влияние препарата-ингибитора передачи сигналов ОСК	NCT02859415
Рецидивирующая глиобластома	испытания I фазы, целью которых является изучение активированных аутологичных Т-клеток против антигенов ОСК	NCT05341947

KLF4 снижает пролиферацию клеток меланомы и вызывает гибель клеток. Кроме того, истощение запаса *KLF4* снижает скорость роста ксенотрансплантата меланомы *in vivo* [73]. *KLF4* играет важную роль в регуляции стволовости клеток остеосаркомы, а сигнальный путь *KLF4*—p38 MAPK может стать потенциальной терапевтической мишенью для лечения остеосаркомы [74]. Было установлено, что нокдаун *KLF4* способствует миграции и инвазии клеток немелкоклеточного рака лёгкого. При восстановлении экспрессии *KLF4* отмечено снижение инвазии опухолевых клеток [75]. Аналогично, в генетически модифицированных клетках рака яичников, трансдуцированных лентивирусом для сверхэкспрессии *KLF4*, наблюдалась повышенная чувствительность клеток к действию паклитаксела и цисплатина [76].

Белки MYC (с-Мус, L-Мус, S-Мус и N-Мус) представляют собой семейство факторов транскрипции, которые регулируют рост, дифференцировку, самообновление, метаболизм и клеточный цикл СК [77]. В опухолях человека часто наблюдается сверхэкспрессия *MYC* по сравнению с нормальной тканью. Нару-

шение регуляции *MYC* играет важную роль в поддержании количества инвазивных ОСК. Было установлено, что сверхэкспрессия *MYC* в ОСК глиобластомы индуцирует пролиферацию и инвазию опухолевых клеток и ингибирует апоптоз [78]. Показано, что нарушение регуляции *MYC*, включающей увеличение экспрессии этого гена, приводит к развитию инвазивной протоковой карциномы [79]. Примечательно, что с-MYC активирует экспрессию *SOX4* посредством связывания с его промотором, таким образом, сверхэкспрессия с-MYC может способствовать прогрессированию рака простаты путём активации *SOX4* [80].

Всё больше данных свидетельствует о том, что выживанию ОСК может способствовать чрезмерно активная или аномальная сигнализация между сигнальными путями. Установлено, что при злокачественных новообразованиях происходит нарушение регуляции сигнальных путей Wnt, NF-κB, Notch, Hedgehog, JAK/STAT и PI3K/AKT/mTOR, которые играют важную роль в поддержании стволовости ОСК (табл. 2) [53]. Более того, белки вышеуказанных сигнальных путей участвуют

в миграции, развитии/поддержании резистентности и образовании опухоли, а также в эпителиально-мезенхимном (ЭМП) и мезенхимно-эпителиальном (МЭП) переходах [81]. Гены различных сигнальных путей могут экспрессироваться на разных этапах канцерогенеза в разных типах опухолей, а также иметь перекрёстное взаимодействие в регуляции ОСК [82]. Таким образом, сигнальные пути, регулирующие пролиферацию ОСК, представляют собой сложные сети сигнальных медиаторов, взаимодействующих друг с другом [83]. Также существует достаточно большое количество дополнительных молекулярных агентов, влияющих на стволовость ОСК (табл. 3).

Таким образом, исследование факторов транскрипции и сигнальных путей обеспечивает не только развитие научных знаний в области биологии СК, но и вносит значительный вклад в применение данных знаний при создании новых терапевтических стратегий (табл. 4). Большое количество исследований направлено на создание таргетной терапии с использованием компонентов сигнальных путей в качестве мишеней. Фундаментальным является понимание связей, возникающих из-за стволовых свойств опухоли, между различными подтипами рака молочной железы, поскольку это позволит определить потенциальные терапевтические подходы. В работе Mei et al. разницу между подтипами клеток определяли с использованием системы CRISPR/dCas9, направленной на гены *OCT4*, *KLF*, *MYC* и *SOX2*. Использование такого метода позволило определить, что клетки, синтезирующие рецептор эпидермального фактора роста 2 (HER2), являются предшественниками люминальных А-клеток, следовательно, для терапии, направленной на данные опухолевые клетки, могут быть применены схожие противоопухолевые препараты [120].

СТВОЛОВСТЬ И МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ

СК не могут выживать вне своей ниши и в отсутствие специфических факторов микроокружения [121]. Известно, что внешние стимулы могут способствовать появлению новых СК, поскольку клетки в целом сохраняют способность дедифференцироваться [122]. Воздействие внеклеточных факторов микроокружения, таких как мезенхимные СК (МСК), иммунные клетки, опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), внеклеточный матрикс (ВКМ), везикулы и гипоксия, способствует приобретению стволовости опухолевыми клет-

ками или их репрограммированию в ОСК [53]. Сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) способствует приобретению клетками фенотипа опухолевой стволовости при плоскоклеточном раке кожи [123]. При плоскоклеточной карциноме головы и шеи эпидермальный фактор роста (EGF), секретируемый эндотелиальными клетками, индуцирует ЭМП с приобретением клетками характеристик СК [124]. Трансформирующий фактор роста (TGF)- β , секретируемый ОАФ, способствует ЭМП и увеличению пролиферации и метастазирования клеток рака молочной железы [125].

Гипоксия также воздействует на стволовость и другие свойства опухолевых клеток благодаря увеличению синтеза фактора, индуцируемого гипоксией (HIF)-1 α [126, 127].

Интересным представляется влияние белков ВКМ на модуляцию стволовости. Например, в работе Zhang et al. был исследован фибриновый гель, который использовался для создания трёхмерного (3D) ВКМ клеток рака толстой кишки. Мягкий фибриновый гель (90 Pascal) был наиболее эффективным для обогащения опухолевых колоний. В частности, эти опухолевые колонии проявляли канцерогенность, активировали маркеры СК и обладали анти-химиотерапевтическими свойствами. Данные структуры были названы репопулирующими опухоль клетками (РОК). Следует отметить, что в 3D-культивируемых РОК толстой кишки индуцировался фактор NANOG [128]. Также известно, что коллаген I типа (Col-I) вызывает стволовость опухоли. В работе Valadão et al. была определена зависимость этого эффекта от плотности Col-I. Результаты показали, что высокая плотность Col-I увеличивала количество CD44⁺CD24 СК рака молочной железы, но не способствовала самообновлению и клоногенности клеток. Таким образом, был сделан вывод, что высокая плотность Col-I сама по себе недостаточна для полного развития фенотипа СК рака молочной железы [129].

Факторы, связанные с воспалением, могут активировать сеть репрограммирования, ведущую к генерации ОСК. Установлено, что уровень IL-6 в сыворотке крови был выше у пациентов с остеосаркомой, чем в контрольной группе. IL-6 также увеличивал пролиферацию и сферообразование клеток остеосаркомы, а также усиливал их инвазивный и миграционный потенциал, способствуя, таким образом, образованию клеток с ЭМП-подобным фенотипом и повышенной химиорезистентностью. На ксенографтной модели остеосаркомы было определено, что размер и вес опухоли был выше у мышей, получавших рекомбинантный IL-6,

чем у контрольных [130]. Было обнаружено, что IL-1 β может индуцировать сферообразование клеток рака толстой кишки, которые характеризовались активацией генов факторов стволовости (*BMI1* и *NESTIN*) и повышенной лекарственной устойчивостью, что является отличительной чертой ОСК [131]. Hong et al. показали, что фактор некроза опухоли (TNF)- α способствует канцерогенезу опухолей полости рта, связанному с вирусом папилломы человека, за счёт увеличения стволовости клеток опухоли [132].

Внеклеточные везикулы (ВВ) опухолевых и стромальных клеток опосредуют межклеточную коммуникацию в МО и участвуют в различных стадиях канцерогенеза, таких как пролиферация, ангиогенез, метастазирование и формирование устойчивости к терапевтическим препаратам. Из-за того, что ВВ переносят в себе различные вещества, они могут участвовать в межклеточной коммуникации и играть роль в приобретении клетками стволовости. Например, ВВ, продуцируемые СК глиобластомы, способствуют образованию эндотелиальной трубки [133]. Аналогично, при колоректальной аденокарциноме экзосомы ОАФ способствовали увеличению процента ОСК в опухоли, активируя сигнальный путь Wnt [134]. ВВ из МСК могут иметь двойное действие: они могут усиливать рост и метастазирование опухоли или же способствовать апоптозу клеток и вызывать регрессию опухоли [135, 136].

Таким образом, выделяемые МО внеклеточные факторы влияют на стволовость и гетерогенность клеток посредством регуляции сигнальных путей.

СФЕРОИДЫ КАК МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ИЗУЧЕНИЯ ОСК

На сегодняшний день представляет интерес использование 3D-моделей в исследованиях опухолей. Одной из таких моделей является опухолевый сфероид. Сфероиды можно разделить на несколько типов: (I) многоклеточный сфероид, впервые описанный в начале 70-х гг. и полученный путём культивирования линий опухолевых клеток на неадгезивной культуральной посуде; (II) онкосфера — модель экспансии ОСК в бессывороточной среде с добавлением факторов роста; (III) органотипический многоклеточный сфероид, полученный путём механической и ферментативной диссоциации опухолевой ткани [137].

Многоклеточные сфероиды используются в качестве модельной системы *in vitro* для ис-

следований микрометастазов и аваскулярных опухолевых регионов. Кроме того, такой тип сфероидов подходит для изучения устойчивости опухоли, зависимой от клеточной адгезии.

Термины «сфера», «опухолевая сфера» [138] и «онкосфера» [139] используются для описания сфер, полученных из ОСК. С данной моделью обычно проводят исследования для оценки и характеристики ОСК *in vitro* [140]. Примечательно, что названия сфер могут происходить от типа ткани, из которой они образованы. Например, сферы культур СК головного мозга и молочной железы были названы «нейросферы» [141] и «маммосферы» [142].

Органотипические многоклеточные сфероиды предназначены для точного воспроизведения МО. В таких сфероидах опухолевые клетки окружены неопухолевыми клетками и стромальными компонентами, которые обычно обнаруживаются в МО [140].

В литературе данные модели ставят между 2D- и ксенографтными моделями, предполагая, что 3D-модели смогут заполнить те пробелы, которые существуют между ними [140]. 3D-модели характеризуются высокой транслируемостью биологических характеристик исходных опухолей, что даёт преимущества при их использовании [143]. 3D-модели обладают архитектурой и метаболическими реакциями, схожими с таковыми для нативной опухоли. Гистоморфологический анализ показывает, что 3D-модель, в частности, опухолевый сфероид, разделяется на несколько зон, как и естественная опухоль. К ним относятся: внешняя зона, характеризующаяся преимущественно пролиферирующими клетками, средняя зона с покоящимися клетками и центральная некротическая часть [144]. Образование некротической зоны можно объяснить недостаточной оксигенацией, отсутствием питательных веществ и накоплением метаболитов. Внешняя часть сфероида характеризуется большим количеством лактата и минимальным количеством АТФ, преимущественно из-за значительного потребления пролиферирующим слоем клеток. Распределение глюкозы происходит равномерно во всех зонах сфероида [145].

Перечисленные типы опухолевого сфероида могут содержать различные клетки, поддерживая генетическую гетерогенность и взаимодействие опухолевых клеток и стромы. С помощью 3D-моделей открывается возможность исследовать межклеточные контакты, микроокружение и взаимодействие иммунных и опухолевых клеток [146]. При проведении экспериментов с 3D-культурой клеток можно получить более точные данные о действии

терапевтических средств, метаболическом профилировании, свойствах СК [147] и таких процессов, как ЭМП и МЭП, которые вовлечены в регуляцию стволовости. Активация нескольких факторов транскрипции, включая SNAI1 и SNAI2, на молекулярном уровне обуславливает эффект ЭМП. Этот эффект связан с потерей молекул, обеспечивающих межклеточные контакты, таких как E-cadherin, а также приобретением мезенхимных маркеров, включая виментин. ЭМП был особенно хорошо изучен на примере различных типов опухолевых сфероидов, а также на нормальных СК, включая кардиферу, нейросферу и сферы сетчатки. Дополнительно исследования активации ЭМП были проведены на ЭСК (бластуляция), эмбриональных тельцах и клетках, подвергнутых индуцированному перепрограммированию [148].

Опухолевые сфероиды можно получить агрегацией или спонтанной самосборкой. Агрегация может быть вызвана принудительным контактом клетки с клеткой различными методами, такими как «висячая капля», клеточная суспензия, микролуна (96-луночные планшеты с круглым дном) или микрогидродинамика (т.е. инкапсуляция в геле) [140].

Исследования модельных систем сфероидов с использованием новых специфичных агентов, нацеленных на сигнальные пути стволовости Notch (MK-0752, R4733 и TR-4) [113], PI3K (CAL-101 и XL-147) [114], AKT (перифозин и архексин) [149] и Hedgehog (BMS-863923 и IPI-926), представляют большой интерес для развития противоопухолевой терапии [150]. Установлено, что салиномицин (ионофорный полиэфирный антибиотик) способен избирательно убивать ОСК молочной железы и индуцировать эпителиальную дифференцировку опухолевых клеток, способствуя элиминированию опухоли [138]. Namiki et al. показали, что галлат эпигаллокатехина, одно из важнейших органических веществ зелёного чая, снижает стволовость и онкогенность клеток рака лёгких человека, ингибируя рецепторы AXL [151].

Существенным препятствием для разработки рациональных методов терапии онкологических заболеваний является несоответствие между модельными системами и организмом пациента. Чтобы решить эту проблему, Fendler et al. использовали ОСК для создания опухолевых сфероидов, трёхмерных органоидов опухоли и ксенотрансплантатов светлоклеточного почечно-клеточного рака. Лечение ингибиторами сигнальных путей Wnt и Notch блокировало пролиферацию и самообновление ОСК в сфероидах и органоидах и замедляло рост

опухоли в ксенотрансплантатах, полученных от пациентов, у мышей [152].

Таким образом, использование данных модельных систем расширяет возможности для создания скрининговой платформы для тестирования лекарственных препаратов. Кроме того, использование 3D-моделей открывает перспективы для развития персонализированной медицины. А изучение ОСК раскрывает молекулярные механизмы их функционирования и способствует поиску терапевтической мишени для инновационных методов лечения, направленных на уничтожение ОСК.

ОБОГАЩЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ОСК В СФЕРОИДАХ

Одним из методов, обычно используемых для идентификации ОСК и изучения их свойств *in vitro*, является анализ сферообразования. Сферообразующие клетки представляют собой СК. Нужно отметить, что в литературе для данного метода анализа ОСК употребляются названия как «сфера», так и «сфероид». Сфероиды задействованы в исследованиях стволовости рака *in vitro* и рассматриваются как один из критериев подтверждения наличия ОСК [153]. Например, Qureshi-Baig et al. культивировали сфероиды, полученные из клинических образцов колоректальной карциномы. Показано, что данные сфероиды фенотипически напоминают нативную опухоль, сохраняют несколько сходных мутаций, относящихся к колоректальному раку, и экспрессируют гены *SOX2*, *OCT4* и *NANOG*. После проведения сравнения сфероидов ткани и клеточных линий обнаружилось, что оба типа сфероидов проявляли аналогичную способность к самообновлению и одинаково формировали опухоли у мышей с иммунодефицитом [154]. Также были охарактеризованы ОСК яичников человека, которые демонстрировали повышенную химиорезистентность к цисплатину и паклитакселу и экспрессию генов СК (*NOTCH-1*, *NANOG*, *NES*, *ABCG2* и *OCT4*) [155].

Существует достаточно большое количество исследований ОСК, связанных с использованием сфероидов. Например, объединение математического моделирования и секвенирования РНК сфероидов опухоли яичников, образованных методом «висячая капля», позволяет выявлять гены, ассоциированные с появлением ОСК и поддерживающие химиорезистентность и злокачественный фенотип. Было показано возникновение популяций ОСК в сфероидах [156]. Bahmad et al. описали протоколы

и перечень необходимых реагентов для создания сфероидов опухоли простаты и различные манипуляции с ними [157]. Показано, что сфероиды опухоли простаты выдержали более 30 пассажей без заметной потери стволовости. Сфероиды пролиферировали медленнее со значительным снижением активации сигнального пути PI3K/АКТ по сравнению с монослойными клетками линии DU145 [158].

На обогащение популяции ОСК в сфероидов могут влиять различные факторы, которые можно использовать в исследованиях. Например, условия бессывороточного культивирования используются для обогащения сфероидов СК. Herheliuk et al. показали возможность обогащения ОСК популяции клеток опухоли (в данном случае мультиклеточных опухолевых сфероидов (МОС)). Стандартизация протоколов культивирования обогащённых МОС (оМОС) может предоставить возможность использовать данные культуры для идентификации лекарств, которые могут подавлять пролиферацию ОСК. Для обогащения сфероидов ОСК использовалась бессывороточная среда с добавлением фактора роста фибробластов (FGF), EGF, инсулина и гидрокортизона. Наибольшая экспрессия рецепторов CD133, CD44, CD24 и BMI-1 была обнаружена в оМОС. оМОС были менее чувствительны к противоопухолевым препаратам (цисплатин, метотрексат и доксорубин), чем адгезивные культуры клеток и МОС, культивируемые в стандартных условиях в полной питательной среде [159].

Аналогично, клеточные линии гепатомы человека PLC/PRF/5 и HepG2 были выращены в условиях, используемых для ОСК. Среда для культивирования включала бессывороточную среду DMEM/F12 с добавлением 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 20 нг/мл рекомбинантного EGF человека, 10 нг/мл рекомбинантного основного FGF человека и добавок B27 и N-2. Затем клетки культивировали в 6-луночных неадгезивных планшетах при плотности не более 5000 клеток/лунку. В результате сферообразующие клетки PLC/PRF/5 проявляли свойства ОСК: самообновление, обширная пролиферация, лекарственная устойчивость, а также сверхэкспрессия OCT3/4, OV6, EpCAM, CD133 и CD44. Даже небольшое количество клеток было способно образовывать опухоли у иммунодефицитных мышей и не терять данное свойство при многократном пассировании сфероидов [160]. Также обнаружено, что изменение компонентов среды может играть роль в стволовом фенотипе клеток. Maliszewska-Olejniczak et al. показали, что добавление среды без ксенона или

с низким содержанием сыворотки к 3D-культуре карциномы почки увеличивало экспрессию генов, кодирующих факторы стволовости, включая *ECAD*, ген N-кадгерина (*NCAD*), *VEGF*, *SOX2*, *PAX2* и *NESTIN* [161].

Различные матриксы могут влиять на повышение количества ОСК в сфероидов. Например, культивирование клеток MCF-7 на коллагеновых матриксах увеличивало пролиферацию клеток и генерировало популяцию со свойствами ОСК [162]. Кроме того, малые богатые лейцином протеогликанов ВКМ могут играть роль в регулировании сигнальных путей, устойчивости к лекарствам и пластичности ОСК-подобных клеток [163]. Также показано, что агар, который может применяться для создания неадгезивных условий при генерации сфероидов, может играть роль в обогащении их ОСК. Это подтверждается увеличением экспрессии маркеров ОСК, присутствием CD133⁺/CD44⁺ или SORE6⁺ клеток и повышенной способностью к самообновлению и канцерогенезу *in vivo* [164]. Такое же покрытие (агар) использовалось для культивирования сфероидов из клеток плоскоклеточного рака полости рта и показало экспрессию маркеров СК и проявление химиорадиотерапевтической резистентности в дополнение к способности инициировать опухоль и самообновляться [165]. Кроме того, такие добавки, как метилцеллюлоза и желатиновая камедь, были использованы для создания новой системы культивирования на основе традиционной. Разработанная система культивирования предлагает привлекательный альтернативный метод для усиления ОСК *in vitro* с потенциалом обширного использования в исследованиях ОСК и скрининге лекарств [166].

Для создания сфероидов с повышенным потенциалом ОСК можно применить метод клонирования одной клетки. Так, Muenzner et al. создали одноклеточные клоны HepG2, которые сформировали 3D-кластеры клеток после 8 дней инкубации и были по отдельности перенесены в лунки 12-луночного планшета для культивирования клеток. Было показано, что клон № 5 проявляет более высокоагрессивные и инвазивные характеристики, связанные, скорее всего, со значительно более высокой экспрессией клинически значимых маркеров СК и более мезенхимным фенотипом. Кроме того, более высокий метастатический потенциал был обнаружен для клеток клона № 5 по сравнению с родительской линией клеток HepG2 *in vivo* с помощью флуоресцентной визуализации. Таким образом, обогащённые ОСК клоны HepG2, безусловно, представляют собой подходящие модельные системы для изучения

роли ОСК во время инициации, прогрессирования и формирования лекарственной устойчивости гепатоклеточной карциномы [167].

Интересно, что изучение влияния МСК на опухоль можно проводить при создании гибридов с клетками рака желудка с помощью полиэтиленгликоля (PEG) *in vitro*. Такие гибриды характеризовались изменением ЭМП с пониженной регуляцией ECAD и повышенной регуляцией виментина, NCAD, α -гладкомышечного актина (α -SMA) и белка активации фибробластов (FAP). У гибридов была повышена экспрессия транскрипционных факторов стволовости — генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* и *LIN28*. Экспрессия CD44 и CD133 на гибридных клетках была выше, чем на родительских клетках рака желудка. Отмечено усиление миграционных свойств и деления гибридных клеток. Кроме того, гетеротипические гибриды способствовали росту опухоли ксенотрансплантата желудка *in vivo*. Предположительно, слияние МСК и клеток рака желудка способствует образованию онкогенных гибридов с ЭМП и свойствами СК, что может предоставить возможность для исследования роли МСК при раке желудка [168].

Таким образом, основной особенностью сфероидов, полученных из опухоли, является обогащение их ОСК или клетками с характеристиками, связанными с СК. Поскольку эрадикация ОСК, вероятно, будет иметь клиническое значение из-за их связи со злокачественной природой опухолевых клеток, такой как канцерогенность или химиорезистентность, исследование сфероидов, полученных из опухоли, может дать неоценимые подсказки для борьбы с онкологическими заболеваниями. Сфероиды, полученные из опухоли, могут оказаться полезными для обнаружения новых маркеров ОСК, стать удобной моделью для более качественной оценки реакции опухолевых клеток на лекарства, пролиферации и морфологии клеток [161, 169]. Кроме того, повышение уровня стволовости сфероидов может способствовать улучшению скрининговой платформы противоопухолевых терапевтических средств, созданию новой таргетной терапии и изучению биологии ОСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десятилетия выживаемость пациентов со злокачественными новообразованиями значительно увеличилась благодаря развитию новых технологий противоопухоле-

вой терапии, которые включают применение улучшенных химиотерапевтических препаратов и таргетную терапию. Тем не менее терапия поздних стадий рака осложняется из-за высокой клеточной гетерогенности, обусловленной генетическими мутациями, опухолевой стромой и наличием ОСК, ангиогенности и метастазирования опухоли. В МО ОСК посредством активации различных сигнальных путей поддерживают рост опухоли, опосредуя поступление питательных веществ и метаболитов. С помощью пластичности и самообновления ОСК образуют группу резистентных клонов, тем самым способствуя развитию лекарственной устойчивости и метастазированию опухоли. Таким образом, ОСК являются важной терапевтической мишенью при создании новых противоопухолевых стратегий лечения. Лучшее понимание биологии ОСК и их взаимодействия с микроокружением позволит значительно продвинуться в борьбе с прогрессированием опухоли, рецидивами и резистентностью к терапии. Лимитирующим фактором в разработках эффективных методов терапии является структурная сложность опухоли, которую тяжело перенести на модельные системы *in vitro*. Моделирование МО особенно сложно, и поэтому использование 3D-моделей может улучшить селекцию лекарственных кандидатов на этапе их разработки. Одной из таких моделей являются сфероиды, представляющие большой интерес благодаря возможности воссоздавать патогенез опухоли с помощью гибкой модификации. Использование сфероидов для изучения ОСК позволит усилить прогностический потенциал онкологических исследований и предоставить новые возможности для терапии онкологических заболеваний.

Вклад авторов. В.В. Соловьева, Р.Р. Ризванов — концепция и руководство работой; А.С. Пономарев, З.Е. Гилязиева — написание текста и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств Российского научного фонда (грант № 21-74-10021).

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wei, R., Liu, S., Zhang, S., Min, L., and Zhu, S. (2020) Cellular and extracellular components in tumor microenvironment and their application in early diagnosis of cancers, *Anal. Cell Pathol. (Amst)*, **2020**, 6283796, doi: 10.1155/2020/6283796.
- Bozyk, A., Wojas-Krawczyk, K., Krawczyk, P., and Milanowski, J. (2022) Tumor microenvironment – a short review of cellular and interaction diversity, *Biology (Basel)*, **11**, 929, doi: 10.3390/biology11060929.
- Ribeiro Franco, P. I., Rodrigues, A. P., de Menezes, L. B., and Pacheco Miguel, M. (2020) Tumor microenvironment components: allies of cancer progression, *Pathol. Res. Pract.*, **216**, 152729, doi: 10.1016/j.prp.2019.152729.
- Batlle, E., and Clevers, H. (2017) Cancer stem cells revisited, *Nat. Med.*, **23**, 1124–1134, doi: 10.1038/nm.4409.
- Capp, J. P. (2019) Cancer stem cells: from historical roots to a new perspective, *J. Oncol.*, **2019**, 5189232, doi: 10.1155/2019/5189232.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, **414**, 105–111, doi: 10.1038/35102167.
- Brooks, M. D., Burness, M. L., and Wicha, M. S. (2015) Therapeutic implications of cellular heterogeneity and plasticity in breast cancer, *Cell Stem Cell*, **17**, 260–271, doi: 10.1016/j.stem.2015.08.014.
- Sell, S. (2010) On the stem cell origin of cancer, *Am. J. Pathol.*, **176**, 2584–2594, doi: 10.2353/ajpath.2010.091064.
- Sancho, P., Barneda, D., and Heeschen, C. (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism, *Br. J. Cancer*, **114**, 1305–1312, doi: 10.1038/bjc.2016.152.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L., and Wahl, G. M. (2006) Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells, *Cancer Res.*, **66**, 9339–9344, doi: 10.1158/0008-5472.can-06-3126.
- Cabrera, M. C., Hollingsworth, R. E., and Hurt, E. M. (2015) Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy, *World J. Stem Cells*, **7**, 27–36, doi: 10.4252/wjsc.v7.i1.27.
- Chaffer, C. L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A. J., Wiggins, P. A., Rodrigues, L. O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., Arendt, L. M., Kuperwasser, C., Bieri, B., and Weinberg, R. A. (2011) Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 7950–7955, doi: 10.1073/pnas.1102454108.
- Borovski, T., Melo, F. D. E., Vermeulen, L., and Medema, J. P. (2011) Cancer stem cell niche: the place to be, *Cancer Res.*, **71**, 634–639, doi: 10.1158/0008-5472.can-10-3220.
- Plaks, V., Kong, N. W., and Werb, Z. (2015) The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell*, **16**, 225–238, doi: 10.1016/j.stem.2015.02.015.
- Kim, W. T., and Ryu, C. J. (2017) Cancer stem cell surface markers on normal stem cells, *Bmb Rep.*, **50**, 285–298, doi: 10.5483/BMBRep.2017.50.6.039.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nat. Med.*, **3**, 730–737, doi: 10.1038/nm0797-730.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*, **432**, 396–401, doi: 10.1038/nature03128.
- Liu, G. T., Yuan, X. P., Zeng, Z. H., Tunici, P., Ng, H. S., Abdulkadir, I. R., Lu, L. Z., Irvin, D., Black, K. L., and Yu, J. S. (2006) Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma, *Mol. Cancer*, **5**, 67, doi: 10.1186/1476-4598-5-67.
- Medema, J. P. (2013) Cancer stem cells: the challenges ahead, *Nat. Cell Biol.*, **15**, 338–344, doi: 10.1038/ncb2717.
- Gimple, R. C., Yang, K., Halbert, M. E., Agnihotri, S., and Rich, J. N. (2022) Brain cancer stem cells: resilience through adaptive plasticity and hierarchical heterogeneity, *Nat. Rev. Cancer*, **22**, 497–514, doi: 10.1038/s41568-022-00486-x.
- De Blank, P., Fouladi, M., and Huse, J. T. (2020) Molecular markers and targeted therapy in pediatric low-grade glioma, *J. Neurooncol.*, **150**, 5–15, doi: 10.1007/s11060-020-03529-1.
- Di, W., Fan, W., Wu, F., Shi, Z., Wang, Z., Yu, M., Zhai, Y., Chang, Y., Pan, C., Li, G., Kahlert, U. D., and Zhang, W. (2022) Clinical characterization and immunosuppressive regulation of CD161 (KLRB1) in glioma through 916 samples, *Cancer Sci.*, **113**, 756–769, doi: 10.1111/cas.15236.
- Birko, Z., Nagy, B., Klekner, A., and Virga, J. (2020) Novel molecular markers in glioblastoma-benefits of liquid biopsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7522, doi: 10.3390/ijms21207522.
- Srivastava, M., Ahlawat, N., and Srivastava, A. (2021) Ovarian cancer stem cells: newer horizons, *J. Obstet. Gynaecol. India*, **71**, 115–117, doi: 10.1007/s13224-020-01412-7.
- Barani, M., Bilal, M., Sabir, F., Rahdar, A., and Kyzas, G. Z. (2021) Nanotechnology in ovarian cancer: diagnosis and treatment, *Life Sci.*, **266**, 118914, doi: 10.1016/j.lfs.2020.118914.
- Zhang, R., Siu, M. K. Y., Ngan, H. Y. S., and Chan, K. K. L. (2022) Molecular biomarkers for the early detection of ovarian cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12041, doi: 10.3390/ijms231912041.

27. Escudero-Lourdes, C., Alvarado-Morales, I., and Tokar, E. J. (2022) Stem cells as target for prostate cancer therapy: opportunities and challenges, *Stem Cell Rev. Rep.*, **18**, 2833-2851, doi: 10.1007/s12015-022-10437-6.
28. Kerr, B. A., Miocinovic, R., Smith, A. K., West, X. Z., Watts, K. E., Alzayed, A. W., Klink, J. C., Mir, M. C., Sturey, T., Hansel, D. E., Heston, W. D., Stephenson, A. J., Klein, E. A., and Byzova, T. V. (2015) CD117⁺ cells in the circulation are predictive of advanced prostate cancer, *Oncotarget*, **6**, 1889-1897, doi: 10.18632/oncotarget.2796.
29. Zhang, K., Zhou, S., Wang, L., Wang, J., Zou, Q., Zhao, W., Fu, Q., and Fang, X. (2016) Current stem cell biomarkers and their functional mechanisms in prostate cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1163, doi: 10.3390/ijms17071163.
30. Gupta, R., Bhatt, L. K., Johnston, T. P., and Prabhavalkar, K. S. (2019) Colon cancer stem cells: potential target for the treatment of colorectal cancer, *Cancer Biol. Ther.*, **20**, 1068-1082, doi: 10.1080/15384047.2019.1599660.
31. Chen, K., Huang, Y. H., and Chen, J. L. (2013) Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges, *Acta Pharmacol. Sin.*, **34**, 732-740, doi: 10.1038/aps.2013.27.
32. Ishiwata, T., Matsuda, Y., Yoshimura, H., Sasaki, N., Ishiwata, S., Ishikawa, N., Takubo, K., Arai, T., and Aida, J. (2018) Pancreatic cancer stem cells: features and detection methods, *Pathol. Oncol. Res.*, **24**, 797-805, doi: 10.1007/s12253-018-0420-x.
33. Immervoll, H., Hoem, D., Steffensen, O. J., Miletic, H., and Molven, A. (2011) Visualization of CD44 and CD133 in normal pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas: non-overlapping membrane expression in cell populations positive for both markers, *J. Histochem. Cytochem.*, **59**, 441-455, doi: 10.1369/0022155411398275.
34. Patil, K., Khan, F. B., Akhtar, S., Ahmad, A., and Uddin, S. (2021) The plasticity of pancreatic cancer stem cells: implications in therapeutic resistance, *Cancer Metastasis Rev.*, **40**, 691-720, doi: 10.1007/s10555-021-09979-x.
35. Gu, Y., Zheng, X., and Ji, J. (2020) Liver cancer stem cells as a hierarchical society: yes or no? *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **52**, 723-735, doi: 10.1093/abbs/gmaa050.
36. Fang, X., Yan, Q., Liu, S., and Guan, X. Y. (2022) Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: intrinsic and extrinsic molecular mechanisms in stemness regulation, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12327, doi: 10.3390/ijms232012327.
37. Nio, K., Yamashita, T., and Kaneko, S. (2017) The evolving concept of liver cancer stem cells, *Mol. Cancer*, **16**, 4, doi: 10.1186/s12943-016-0572-9.
38. Joshi, P., Ghadi, D. S., and Waghmare, S. K. (2022) Isolation of cancer stem cells from skin squamous cell carcinoma, *Methods Cell Biol.*, **171**, 63-80, doi: 10.1016/bs.mcb.2022.06.002.
39. Yin, Q., Shi, X., Lan, S., Jin, H., and Wu, D. (2021) Effect of melanoma stem cells on melanoma metastasis, *Oncol. Lett.*, **22**, 566, doi: 10.3892/ol.2021.12827.
40. Zheng, Y., Wang, L., Yin, L., Yao, Z., Tong, R., Xue, J., and Lu, Y. (2022) Lung cancer stem cell markers as therapeutic targets: an update on signaling pathways and therapies, *Front. Oncol.*, **12**, 873994, doi: 10.3389/fonc.2022.873994.
41. Rowbotham, S. P., Goruganthu, M. U. L., Arasada, R. R., Wang, W. Z., Carbone, D. P., and Kim, C. F. (2022) Lung cancer stem cells and their clinical implications, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **12**, a041270, doi: 10.1101/cshperspect.a041270.
42. Pustovalova, M., Blokhina, T., Alhaddad, L., Chigasova, A., Chuprov-Netochin, R., Veviorskiy, A., Filkov, G., Osipov, A. N., and Leonov, S. (2022) CD44⁺ and CD133⁺ non-small cell lung cancer cells exhibit DNA damage response pathways and dormant polyploid giant cancer cell enrichment relating to their p53 status, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4922, doi: 10.3390/ijms23094922.
43. Butti, R., Gunasekaran, V. P., Kumar, T. V. S., Banerjee, P., and Kundu, G. C. (2019) Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **107**, 38-52, doi: 10.1016/j.biocel.2018.12.001.
44. Wright, M. H., Calcagno, A. M., Salcido, C. D., Carlson, M. D., Ambudkar, S. V., and Varticovski, L. (2008) Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics, *Breast Cancer Res.*, **10**, R10, doi: 10.1186/bcr1855.
45. Farace, C., Pisano, A., Grinan-Lison, C., Solinas, G., Jimenez, G., Serra, M., Carrillo, E., Scognamiglio, F., Attene, F., Montella, A., Marchal, J. A., and Madeddu, R. (2020) Deregulation of cancer-stem-cell-associated miRNAs in tissues and sera of colorectal cancer patients, *Oncotarget*, **11**, 116-130, doi: 10.18632/oncotarget.27411.
46. Aponte, P. M., and Caicedo, A. (2017) Stemness in cancer: stem cells, cancer stem cells, and their microenvironment, *Stem Cells Int.*, **2017**, 5619472, doi: 10.1155/2017/5619472.
47. Visvader, J. E., and Clevers, H. (2016) Tissue-specific designs of stem cell hierarchies, *Nat. Cell Biol.*, **18**, 349-355, doi: 10.1038/ncb3332.
48. Kaseb, H. O., Fohrer-Ting, H., Lewis, D. W., Lagasse, E., and Gollin, S. M. (2016) Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas, *Exp. Cell Res.*, **348**, 75-86, doi: 10.1016/j.yexcr.2016.09.003.
49. Todaro, M., Alea, M. P., Di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Lovino, F., Tripodo, C.,

- Russo, A., Gulotta, G., Medema, J. P., and Stassi, G. (2007) Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4, *Cell Stem Cell*, **1**, 389-402, doi: 10.1016/j.stem.2007.08.001.
50. Li, C. W., Wu, J. J., Hynes, M., Dosch, J., Sarkar, B., Welling, T. H., di Magliano, M. P., and Simeone, D. M. (2011) c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target, *Gastroenterology*, **141**, 2218-2227.e5, doi: 10.1053/j.gastro.2011.08.009.
51. Nassar, D., and Blanpain, C. (2016) Cancer stem cells: basic concepts and therapeutic implications, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, **11**, 47-76, doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044438.
52. Laplane, L., and Solary, E. (2019) Towards a classification of stem cells, *Elife*, **8**, e46563, doi: 10.7554/eLife.46563.
53. Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., and Cui, H. (2020) Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **5**, 8, doi: 10.1038/s41392-020-0110-5.
54. Jerabek, S., Merino, F., Scholer, H. R., and Cojocaru, V. (2014) OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency, *Biochim. Biophys. Acta*, **1839**, 138-154, doi: 10.1016/j.bbagr.2013.10.001.
55. Murakami, S., Ninomiya, W., Sakamoto, E., Shibata, T., Akiyama, H., and Tashiro, F. (2015) SRY and OCT4 are required for the acquisition of cancer stem cell-like properties and are potential differentiation therapy targets, *Stem Cells*, **33**, 2652-2663, doi: 10.1002/stem.2059.
56. Du, Z., Jia, D., Liu, S., Wang, F., Li, G., Zhang, Y., Cao, X., Ling, E. A., and Hao, A. (2009) Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells, *Glia*, **57**, 724-733, doi: 10.1002/glia.20800.
57. Song, B., Kim, D. K., Shin, J., Bae, S. H., Kim, H. Y., Won, B., Kim, J. K., Youn, H. D., Kim, S. T., Kang, S. W., and Jang, H. (2018) OCT4 directly regulates stemness and extracellular matrix-related genes in human germ cell tumours, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 1980-1986, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.145.
58. Fujino, S., and Miyoshi, N. (2019) Oct4 gene expression in primary colorectal cancer promotes liver metastasis, *Stem Cells Int.*, **2019**, 7896524, doi: 10.1155/2019/7896524.
59. Lu, C. S., Shiau, A. L., Su, B. H., Hsu, T. S., Wang, C. T., Su, Y. C., Tsai, M. S., Feng, Y. H., Tseng, Y. L., Yen, Y. T., Wu, C. L., and Shieh, G. S. (2020) Oct4 promotes M2 macrophage polarization through upregulation of macrophage colony-stimulating factor in lung cancer, *J. Hematol. Oncol.*, **13**, 62, doi: 10.1186/s13045-020-00887-1.
60. Hagey, D. W., Klum, S., Kurtsdotter, I., Zaouter, C., Topcic, D., Andersson, O., Bergsland, M., and Muhr, J. (2018) SOX2 regulates common and specific stem cell features in the CNS and endoderm derived organs, *PLoS Genet.*, **14**, e1007224, doi: 10.1371/journal.pgen.1007224.
61. Schaefer, T., and Lengerke, C. (2020) SOX2 protein biochemistry in stemness, reprogramming, and cancer: the PI3K/AKT/SOX2 axis and beyond, *Oncogene*, **39**, 278-292, doi: 10.1038/s41388-019-0997-x.
62. Liu, P., Tang, H., Song, C., Wang, J., Chen, B., Huang, X., Pei, X., and Liu, L. (2018) SOX2 promotes cell proliferation and metastasis in triple negative breast cancer, *Front. Pharmacol.*, **9**, 942, doi: 10.3389/fphar.2018.00942.
63. Maurizi, G., Verma, N., Gadi, A., Mansukhani, A., and Basilico, C. (2018) Sox2 is required for tumor development and cancer cell proliferation in osteosarcoma, *Oncogene*, **37**, 4626-4632, doi: 10.1038/s41388-018-0292-2.
64. Han, S., Huang, T., Wu, X., Wang, X., Liu, S., Yang, W., Shi, Q., Li, H., and Hou, F. (2019) Prognostic value of CD133 and SOX2 in advanced cancer, *J. Oncol.*, **2019**, 3905817, doi: 10.1155/2019/3905817.
65. Heurtier, V., Owens, N., Gonzalez, I., Mueller, F., Proux, C., Mornico, D., Clerc, P., Dubois, A., and Navarro, P. (2019) The molecular logic of Nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells, *Nat. Commun.*, **10**, 1109, doi: 10.1038/s41467-019-09041-z.
66. Chiou, S. H., Wang, M. L., Chou, Y. T., Chen, C. J., Hong, C. F., Hsieh, W. J., Chang, H. T., Chen, Y. S., Lin, T. W., Hsu, H. S., and Wu, C. W. (2010) Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation, *Cancer Res.*, **70**, 10433-10444, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2638.
67. Lin, T., Ding, Y. Q., and Li, J. M. (2012) Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma, *Med. Oncol.*, **29**, 878-885, doi: 10.1007/s12032-011-9860-9.
68. De Vicente, J. C., Rodriguez-Santamarta, T., Rodrigo, J. P., Allonca, E., Vallina, A., Singhania, A., Donate-Perez Del Molino, P., and Garcia-Pedrero, J. M. (2019) The emerging role of NANOG as an early cancer risk biomarker in patients with oral potentially malignant disorders, *J. Clin. Med.*, **8**, 1376, doi: 10.3390/jcm8091376.
69. Dehghan Harati, M., Rodemann, H. P., and Toulany, M. (2019) Nanog signaling mediates radioresistance in ALDH-positive breast cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1151, doi: 10.3390/ijms20051151.
70. Wang, X., Jin, J., Wan, F., Zhao, L., Chu, H., Chen, C., Liao, G., Liu, J., Yu, Y., Teng, H., Fang, L., Jiang, C., Pan, W., Xie, X., Li, J., Lu, X., Jiang, X., Ge, X., Ye, D., and Wang, P. (2019) AMPK promotes SPOP-mediated NANOG degradation to regulate prostate cancer cell stemness, *Dev. Cell*, **48**, 345-360. e347, doi: 10.1016/j.devcel.2018.11.033.

71. Ghaleb, A. M., and Yang, V. W. (2017) Kruppel-like factor 4 (KLF4): what we currently know, *Gene*, **611**, 27-37, doi: 10.1016/j.gene.2017.02.025.
72. Hsieh, M. H., Chen, Y. T., Chen, Y. T., Lee, Y. H., Lu, J., Chien, C. L., Chen, H. F., Ho, H. N., Yu, C. J., Wang, Z. Q., and Teng, S. C. (2017) PARP1 controls KLF4-mediated telomerase expression in stem cells and cancer cells, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 10492-10503, doi: 10.1093/nar/gkx683.
73. Rivero, M., Montagnani, V., and Stecca, B. (2017) KLF4 is regulated by RAS/RAF/MEK/ERK signaling through E2F1 and promotes melanoma cell growth, *Oncogene*, **36**, 3322-3333, doi: 10.1038/onc.2016.481.
74. Qi, X. T., Li, Y. L., Zhang, Y. Q., Xu, T., Lu, B., Fang, L., Gao, J. Q., Yu, L. S., Zhu, D. F., Yang, B., He, Q. J., and Ying, M. D. (2019) KLF4 functions as an oncogene in promoting cancer stem cell-like characteristics in osteosarcoma cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, **40**, 546-555, doi: 10.1038/s41401-18-0050-6.
75. Ding, X., Zhong, T., Jiang, L., Huang, J., Xia, Y., and Hu, R. (2018) miR-25 enhances cell migration and invasion in non-small-cell lung cancer cells via ERK signaling pathway by inhibiting KLF4, *Mol. Med. Rep.*, **17**, 7005-7016, doi: 10.3892/mmr.2018.8772.
76. Wang, B., Shen, A., Ouyang, X., Zhao, G., Du, Z., Huo, W., Zhang, T., Wang, Y., Yang, C., Dong, P., Watari, H., Pfeffer, L. M., and Yue, J. (2017) KLF4 expression enhances the efficacy of chemotherapy drugs in ovarian cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **484**, 486-492, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.062.
77. Dang, C. V. (2012) MYC on the path to cancer, *Cell*, **149**, 22-35, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.003.
78. Galardi, S., Savino, M., Scagnoli, F., Pellegatta, S., Pisati, F., Zambelli, F., Illi, B., Annibali, D., Beji, S., Orecchini, E., Alberelli, M. A., Apicella, C., Fontanella, R. A., Michienzi, A., Finocchiaro, G., Farace, M. G., Pavesi, G., Ciafre, S. A., and Nasi, S. (2016) Resetting cancer stem cell regulatory nodes upon MYC inhibition, *EMBO Rep.*, **17**, 1872-1889, doi: 10.15252/embr.201541489.
79. Lourenco, C., Kalkat, M., Houlahan, K. E., De Melo, J., Longo, J., Done, S. J., Boutros, P. C., and Penn, L. Z. (2019) Modelling the MYC-driven normal-to-tumour switch in breast cancer, *Dis. Model. Mech.*, **12**, dmm038083, doi: 10.1242/dmm.038083.
80. Dong, H., Hu, J., Wang, L., Qi, M., Lu, N., Tan, X., Yang, M., Bai, X., Zhan, X., and Han, B. (2019) SOX4 is activated by C-MYC in prostate cancer, *Med. Oncol.*, **36**, 92, doi: 10.1007/s12032-019-1317-6.
81. Fabregat, I., Malfettone, A., and Soukupova, J. (2016) New insights into the crossroads between EMT and stemness in the context of cancer, *J. Clin. Med.*, **5**, 37, doi: 10.3390/jcm5030037.
82. Katoh, M. (2007) Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis, *Stem Cell Rev.*, **3**, 30-38, doi: 10.1007/s12015-007-0006-6.
83. Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2012) Cancer stem cells: current status and evolving complexities, *Cell Stem Cell*, **10**, 717-728, doi: 10.1016/j.stem.2012.05.007.
84. Clements, W. M., Wang, J., Sarnaik, A., Kim, O. J., MacDonald, J., Fenoglio-Preiser, C., Groden, J., and Lowy, A. M. (2002) beta-Catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer, *Cancer Res.*, **62**, 3503-3506.
85. Abd El-Rehim, D., and Ali, M. M. (2009) Aberrant expression of beta-catenin in invasive ductal breast carcinomas, *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.*, **21**, 185-195.
86. Kudo, J., Nishiwaki, T., Haruki, N., Ishiguro, H., Shibata, Y., Terashita, Y., Sugiura, H., Shinoda, N., Kimura, M., Kuwabara, Y., and Fujii, Y. (2007) Aberrant nuclear localization of β -catenin without genetic alterations in beta-catenin or Axin genes in esophageal cancer, *World J. Surg. Oncol.*, **5**, 21, doi: 10.1186/1477-7819-5-21.
87. Zhao, X., Jiang, C., Xu, R., Liu, Q., Liu, G., and Zhang, Y. (2020) TRIP6 enhances stemness property of breast cancer cells through activation of Wnt/beta-catenin, *Cancer Cell Int.*, **20**, 51, doi: 10.1186/s12935-020-1136-z.
88. Zhu, L., Pan, R., Zhou, D., Ye, G., and Tan, W. (2019) BCL11A enhances stemness and promotes progression by activating Wnt/beta-catenin signaling in breast cancer, *Cancer Manag. Res.*, **11**, 2997-3007, doi: 10.2147/CMAR.S199368.
89. Zhang, L., Dong, X., Yan, B., Yu, W., and Shan, L. (2020) CircAGFG1 drives metastasis and stemness in colorectal cancer by modulating YY1/CTNBN1, *Cell Death Dis.*, **11**, 542, doi: 10.1038/s41419-020-2707-6.
90. Xiang, X., Xiong, R., Yu, C., Deng, L., Bie, J., Xiao, D., Chen, Z., Zhou, Y., Li, X., Liu, K., and Feng, G. (2019) Tex10 promotes stemness and EMT phenotypes in esophageal squamous cell carcinoma via the Wnt/betacatenin pathway, *Oncol. Rep.*, **42**, 2600-2610, doi: 10.3892/or.2019.7376.
91. Stylianou, S., Clarke, R. B., and Brennan, K. (2006) Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer, *Cancer Res.*, **66**, 1517-1525, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3054.
92. Li, L., Tang, P., Li, S., Qin, X., Yang, H., Wu, C., and Liu, Y. (2017) Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy, *Med. Oncol.*, **34**, 180, doi: 10.1007/s12032-017-1039-6.
93. Katoh, M., and Katoh, M. (2020) Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review), *Int. J. Mol. Med.*, **45**, 279-297, doi: 10.3892/ijmm.2019.4418.
94. Amantini, C., Morelli, M. B., Nabissi, M., Cardinali, C., Santoni, M., Gismondi, A., and Santoni, G.

- (2016) Capsaicin triggers autophagic cell survival which drives epithelial mesenchymal transition and chemoresistance in bladder cancer cells in an Hedgehog-dependent manner, *Oncotarget*, **7**, 50180-50194, doi: 10.18632/oncotarget.10326.
95. Villegas, V. E., Rondon-Lagos, M., Annaratone, L., Castellano, I., Grismaldo, A., Sapino, A., and Zaphiropoulos, P. G. (2016) Tamoxifen treatment of breast cancer cells: impact on Hedgehog/GLI1 signaling, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 308, doi: 10.3390/ijms17030308.
 96. Jeng, K. S., Chang, C. F., and Lin, S. S. (2020) Sonic hedgehog signaling in organogenesis, tumors, and tumor microenvironments, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 758, doi: 10.3390/ijms21030758.
 97. Petrova, R., and Joyner, A. L. (2014) Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair, *Development*, **141**, 3445-3457, doi: 10.1242/dev.083691.
 98. Po, A., Silvano, M., Miele, E., Capalbo, C., Eramo, A., Salvati, V., Todaro, M., Besharat, Z. M., Catanzaro, G., Cucchi, D., Coni, S., Di Marcotullio, L., Canettieri, G., Vacca, A., Stassi, G., De Smaele, E., Tartaglia, M., Screpanti, I., De Maria, R., and Ferretti, E. (2017) Noncanonical GLI1 signaling promotes stemness features and in vivo growth in lung adenocarcinoma, *Oncogene*, **36**, 4641-4652, doi: 10.1038/onc.2017.91.
 99. Zhu, R., Gires, O., Zhu, L., Liu, J., Li, J., Yang, H., Ju, G., Huang, J., Ge, W., Chen, Y., Lu, Z., and Wang, H. (2019) TSPAN8 promotes cancer cell stemness via activation of sonic Hedgehog signaling, *Nat. Commun.*, **10**, 2863, doi: 10.1038/s41467-019-10739-3.
 100. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling, *Cell*, **132**, 344-362, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
 101. Prasad, S., Rarnachandran, S., Gupta, N., Kaushik, I., and Srivastava, S. K. (2020) Cancer cells stemness: A doorstep to targeted therapy, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Bas. Dis.*, **1866**, 165424, doi: 10.1016/j.bbdis.2019.02.019.
 102. Prasad, S., Ravindran, J., and Aggarwal, B. B. (2010) NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship, *Mol. Cell. Biochem.*, **336**, 25-37, doi: 10.1007/s11010-009-0267-2.
 103. Van der Zee, M., Sacchetti, A., Cansoy, M., Joosten, R., Teeuwssen, M., Heijmans-Antonissen, C., Ewing-Graham, P. C., Burger, C. W., Blok, L. J., and Fodde, R. (2015) IL6/JAK1/STAT3 signaling blockade in endometrial cancer affects the ALDHhi/CD126⁺ stem-like component and reduces tumor burden, *Cancer Res.*, **75**, 3608-3622, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2498.
 104. Yang, L., Dong, Y., Li, Y., Wang, D., Liu, S., Wang, D., Gao, Q., Ji, S., Chen, X., Lei, Q., Jiang, W., Wang, L., Zhang, B., Yu, J. J., and Zhang, Y. (2019) IL-10 derived from M2 macrophage promotes cancer stemness via JAK1/STAT1/NF-kappaB/Notch1 pathway in non-small cell lung cancer, *Int. J. Cancer*, **145**, 1099-1110, doi: 10.1002/ijc.32151.
 105. Park, S. Y., Lee, C. J., Choi, J. H., Kim, J. H., Kim, J. W., Kim, J. Y., and Nam, J. S. (2019) The JAK2/STAT3/CCND2 axis promotes colorectal cancer stem cell persistence and radioresistance, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **38**, 399, doi: 10.1186/s13046-019-1405-7.
 106. Toh, T. B., Lim, J. J., Hooi, L., Rashid, M., and Chow, E. K. (2020) Targeting Jak/Stat pathway as a therapeutic strategy against SP/CD44⁺ tumorigenic cells in Akt/beta-catenin-driven hepatocellular carcinoma, *J. Hepatol.*, **72**, 104-118, doi: 10.1016/j.jhep.2019.08.035.
 107. Chambers, I. (2004) The molecular basis of pluripotency in mouse embryonic stem cells, *Cloning Stem Cells*, **6**, 386-391, doi: 10.1089/clo.2004.6.386.
 108. Zhou, J., Wulfschuhle, J., Zhang, H., Gu, P., Yang, Y., Deng, J., Margolick, J. B., Liotta, L. A., Petricoin, E., 3rd, and Zhang, Y. (2007) Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 16158-16163, doi: 10.1073/pnas.0702596104.
 109. Kaowinn, S., Kaewpiboon, C., Koh, S. S., Kramer, O. H., and Chung, Y. H. (2018) STAT1HDAC4 signaling induces epithelialmesenchymal transition and sphere formation of cancer cells overexpressing the oncogene, CUG2, *Oncol. Rep.*, **40**, 2619-2627, doi: 10.3892/or.2018.6701.
 110. Dey, N., De, P., and Leyland-Jones, B. (2017) PI3K-AKT-mTOR inhibitors in breast cancers: from tumor cell signaling to clinical trials, *Pharmacol. Ther.*, **175**, 91-106, doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.037.
 111. Tan, A. C. (2020) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC), *Thorac. Cancer*, **11**, 511-518, doi: 10.1111/1759-7714.13328.
 112. Karami Fath, M., Ebrahimi, M., Nourbakhsh, E., Zia Hazara, A., Mirzaei, A., Shafieyari, S., Salehi, A., Hoseinzadeh, M., Payandeh, Z., and Barati, G. (2022) PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells, *Pathol. Res. Pract.*, **237**, 154010, doi: 10.1016/j.prp.2022.154010.
 113. Nepstad, I., Hatfield, K. J., Gronningsaeter, I. S., and Reikvam, H. (2020) The PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2907, doi: 10.3390/ijms21082907.
 114. Madsen, R. R. (2020) PI3K in stemness regulation: from development to cancer, *Biochem. Soc. Trans.*, **48**, 301-315, doi: 10.1042/BST20190778.
 115. Fitzgerald, T. L., Lertpiriyapong, K., Cocco, L., Martelli, A. M., Libra, M., Candido, S., Montalto, G., Cervello, M., Steelman, L., Abrams, S. L., and McCubrey, J. A. (2015) Roles of EGFR and KRAS

- and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells, *Adv. Biol. Regul.*, **59**, 65-81, doi: 10.1016/j.jbior.2015.06.003.
116. Nangia-Makker, P., Hogan, V., and Raz, A. (2018) Galectin-3 and cancer stemness, *Glycobiology*, **28**, 172-181, doi: 10.1093/glycob/cwy001.
 117. Li, Y., Hu, H., Wang, Y., Fan, Y., Yang, Y., Guo, B., Xie, X., Lian, J., Jiang, B., Han, B., Wang, Y., Shao, C., and Gong, Y. (2020) CUL4B contributes to cancer stemness by repressing tumor suppressor miR34a in colorectal cancer, *Oncogenesis*, **9**, 20, doi: 10.1038/s41389-020-0206-3.
 118. Ramadoss, S., Sen, S., Ramachandran, I., Roy, S., Chaudhuri, G., and Farias-Eisner, R. (2017) Lysine-specific demethylase KDM3A regulates ovarian cancer stemness and chemoresistance, *Oncogene*, **36**, 1537-1545, doi: 10.1038/onc.2016.320.
 119. Kim, H. Y., Kim, D. K., Bae, S. H., Gwak, H., Jeon, J. H., Kim, J. K., Lee, B. I., You, H. J., Shin, D. H., Kim, Y. H., Kim, S. Y., Han, S. S., Shim, J. K., Lee, J. H., Kang, S. G., and Jang, H. (2018) Farnesyl diphosphate synthase is important for the maintenance of glioblastoma stemness, *Exp. Mol. Med.*, **50**, 1-12, doi: 10.1038/s12276-018-0166-2.
 120. Mei, Y., Cai, D., and Dai, X. (2020) Modulating cancer stemness provides luminal a breast cancer cells with HER2 positive-like features, *J. Cancer*, **11**, 1162-1169, doi: 10.7150/jca.37117.
 121. Ouspenskaia, T., Matos, I., Mertz, A. F., Fiore, V. F., and Fuchs, E. (2016) WNT-SHH antagonism specifies and expands stem cells prior to niche formation, *Cell*, **164**, 156-169, doi: 10.1016/j.cell.2015.11.058.
 122. Wahlster, L., and Daley, G. Q. (2016) Progress towards generation of human haematopoietic stem cells, *Nat. Cell. Biol.*, **18**, 1111-1117, doi: 10.1038/ncb3419.
 123. Beck, B., Driessens, G., Goossens, S., Youssef, K. K., Kuchnio, A., Caauwe, A., Sotiropoulou, P. A., Loges, S., Lapouge, G., Candi, A., Mascré, G., Drogat, B., Dekoninck, S., Haigh, J. J., Carmeliet, P., and Blanpain, C. (2011) A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours, *Nature*, **478**, 399-403, doi: 10.1038/nature10525.
 124. Zhang, Z., Dong, Z., Lauxen, I. S., Filho, M. S., and Nor, J. E. (2014) Endothelial cell-secreted EGF induces epithelial to mesenchymal transition and endows head and neck cancer cells with stem-like phenotype, *Cancer Res.*, **74**, 2869-2881, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2032.
 125. Yu, Y., Xiao, C. H., Tan, L. D., Wang, Q. S., Li, X. Q., and Feng, Y. M. (2014) Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling, *Br. J. Cancer*, **110**, 724-732, doi: 10.1038/bjc.2013.768.
 126. Bao, B., Azmi, A. S., Ali, S., Ahmad, A., Li, Y., Banerjee, S., Kong, D., and Sarkar, F. H. (2012) The biological kinship of hypoxia with CSC and EMT and their relationship with deregulated expression of miRNAs and tumor aggressiveness, *Biochim. Biophys. Acta*, **1826**, 272-296, doi: 10.1016/j.bbcan.2012.04.008.
 127. Joseph, J. V., Conroy, S., Pavlov, K., Sontakke, P., Tomar, T., Eggens-Meijer, E., Balasubramanian, V., Wagemakers, M., den Dunnen, W. F., and Kruyt, F. A. (2015) Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1alpha-ZEB1 axis, *Cancer Lett.*, **359**, 107-116, doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.010.
 128. Zhang, M., Xu, C., Wang, H. Z., Peng, Y. N., Li, H. O., Zhou, Y. J., Liu, S., Wang, F., Liu, L., Chang, Y., Zhao, Q., and Liu, J. (2019) Soft fibrin matrix downregulates DAB2IP to promote Nanog-dependent growth of colon tumor-repopulating cells, *Cell Death Dis.*, **10**, 151, doi: 10.1038/s41419-019-1309-7.
 129. Valadão, I. C., Ralph, A. C. L., Bordeleau, F., Dzik, L. M., Borbely, K. S. C., Geraldo, M. V., Reinhart-King, C. A., and Freitas, V. M. (2020) High type I collagen density fails to increase breast cancer stem cell phenotype, *PeerJ*, **8**, e9153, doi: 10.7717/peerj.9153.
 130. Zhang, C., Ma, K., and Li, W. Y. (2019) IL-6 promotes cancer stemness and oncogenicity in U2OS and MG-63 osteosarcoma cells by upregulating the OPN-STAT3 pathway, *J. Cancer*, **10**, 6511-6525, doi: 10.7150/jca.29931.
 131. Li, Y., Wang, L., Pappan, L., Galliher-Beckley, A., and Shi, J. (2012) IL-1beta promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation, *Mol. Cancer*, **11**, 87, doi: 10.1186/1476-4598-11-87.
 132. Hong, H. S., Akhavan, J., Lee, S. H., Kim, R. H., Kang, M. K., Park, N. H., and Shin, K. H. (2020) Proinflammatory cytokine TNFalpha promotes HPV-associated oral carcinogenesis by increasing cancer stemness, *Int. J. Oral Sci.*, **12**, 3, doi: 10.1038/s41368-019-0069-7.
 133. Bronisz, A., Wang, Y., Nowicki, M. O., Peruzzi, P., Ansari, K. I., Ogawa, D., Balaj, L., De Rienzo, G., Mineo, M., Nakano, I., Ostrowski, M. C., Hochberg, F., Weissleder, R., Lawler, S. E., Chiocca, E. A., and Godlewski, J. (2014) Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1, *Cancer Res.*, **74**, 738-750, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2650.
 134. Hu, Y. B., Yan, C., Mu, L., Huang, K. Y., Li, X. L., Tao, D. D., Wu, Y. Q., and Qin, J. C. (2015) Fibroblast-derived exosomes contribute to chemoresistance through priming cancer stem cells in colorectal cancer, *PLoS One*, **10**, e0125625, doi: 10.1371/journal.pone.0125625.
 135. Bruno, S., Collino, F., Deregibus, M. C., Grange, C., Tetta, C., and Camussi, G. (2013) Microvesicles

- derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth, *Stem Cells Dev.*, **22**, 758-771, doi: 10.1089/scd.2012.0304.
136. Zhang, X., Tu, H., Yang, Y., Fang, L., Wu, Q., and Li, J. (2017) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: roles in tumor growth, progression, and drug resistance, *Stem Cells Int.*, **2017**, 1758139, doi: 10.1155/2017/1758139.
 137. Weiswald, L. B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V. (2015) Spherical cancer models in tumor biology, *Neoplasia*, **17**, 1-15, doi: 10.1016/j.neo.2014.12.004.
 138. Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., and Lander, E. S. (2009) Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening, *Cell*, **138**, 645-659, doi: 10.1016/j.cell.2009.06.034.
 139. Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X. H., Vanharanta, S., Tavazoie, S. F., Morris, P. G., Downey, R. J., Manova-Todorova, K., Brogi, E., and Massague, J. (2011) Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs, *Nat. Med.*, **17**, 867-874, doi: 10.1038/nm.2379.
 140. Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., and Okamoto, K. (2017) Tumor-derived spheroids: relevance to cancer stem cells and clinical applications, *Cancer Sci.*, **108**, 283-289, doi: 10.1111/cas.13155.
 141. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res.*, **63**, 5821-5828.
 142. Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M. A., and Daidone, M. G. (2005) Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties, *Cancer Res.*, **65**, 5506-5511, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626.
 143. Gilazieva, Z., Ponomarev, A., Rutland, C., Rizvanov, A., and Solovyeva, V. (2020) Promising applications of tumor spheroids and organoids for personalized medicine, *Cancers (Basel)*, **12**, 2727, doi: 10.3390/cancers12102727.
 144. Han, S. J., Kwon, S., and Kim, K. S. (2021) Challenges of applying multicellular tumor spheroids in preclinical phase, *Cancer Cell Int.*, **21**, 152, doi: 10.1186/s12935-021-01853-8.
 145. Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L. A. (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again, *J. Biotechnol.*, **148**, 3-15, doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
 146. Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., and Correia, I. J. (2016) 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis, *Biotechnol. Adv.*, **34**, 1427-1441, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.
 147. Jensen, C., and Teng, Y. (2020) Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front. Mol. Biosci.*, **7**, 33, doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.
 148. Forte, E., Chimenti, I., Rosa, P., Angelini, F., Pagano, F., Calogero, A., Giacomello, A., and Messina, E. (2017) EMT/MET at the crossroad of stemness, regeneration and oncogenesis: the ying-yang equilibrium recapitulated in cell spheroids, *Cancers*, **9**, 98, doi: 10.3390/cancers9080098.
 149. Eyler, C. E., Foo, W. C., Lafiura, K. M., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2008) Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition, *Stem Cells*, **26**, 3027-3036, doi: 10.1634/stemcells.2007-1073.
 150. Lindemann, R. K. (2008) Stroma-initiated hedgehog signaling takes center stage in B-cell lymphoma, *Cancer Res.*, **68**, 961-964, doi: 10.1158/0008-5472.can-07-5500.
 151. Namiki, K., Wongsirisin, P., Yokoyama, S., Sato, M., Rawangkan, A., Sakai, R., Iida, K., and Suganuma, M. (2020) (–)-Epigallocatechin gallate inhibits stemness and tumourigenicity stimulated by AXL receptor tyrosine kinase in human lung cancer cells, *Sci. Rep.*, **10**, 2444, doi: 10.1038/s41598-020-59281-z.
 152. Fendler, A., Bauer, D., Busch, J., Jung, K., Wulf-Goldenberg, A., Kunz, S., Song, K., Myszczyzyn, A., Elezkurtaj, S., Erguen, B., Jung, S., Chen, W., and Birchmeier, W. (2020) Inhibiting WNT and NOTCH in renal cancer stem cells and the implications for human patients, *Nat. Commun.*, **11**, 929, doi: 10.1038/s41467-020-14700-7.
 153. Stewart, M., and Fox, S. E. (1989) Firing relations of medial septal neurons to the hippocampal theta-rhythm in urethane anesthetized rats, *Exp. Brain Res.*, **77**, 507-516, doi: 10.1007/BF00249604.
 154. Qureshi-Baig, K., Ullmann, P., Rodriguez, F., Frاسquilho, S., Nazarov, P. V., Haan, S., and Letellier, E. (2016) What do we learn from spheroid culture systems? Insights from tumorspheres derived from primary colon cancer tissue, *PLoS One*, **11**, e0146052, doi: 10.1371/journal.pone.0146052.
 155. Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H. C., Matei, D., Schilder, J. M., Yan, P. S., Huang, T. H. M., and Nephew, K. P. (2008) Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors, *Cancer Res.*, **68**, 4311-4320, doi: 10.1158/0008-5472.can-08-0364.
 156. Rashidi, M. R. W., Mehta, P., Bregenzer, M., Raghavan, S., Fleck, E. M., Horst, E. N., Harissa, Z., Ravikumar, V., Brady, S., Bild, A., Rao, A., Buckanovich, R. J., and Mehta, G. (2019) Engineered 3D model of cancer stem cell enrichment and chemoresistance, *Neoplasia*, **21**, 822-836, doi: 10.1016/j.neo.2019.06.005.
 157. Bahmad, H. F., Cheaito, K., Chalhoub, R. M., Hadadeh, O., Monzer, A., Ballout, F., El-Hajj, A.,

- Mukherji, D., Liu, Y. N., Daoud, G., and Abou-Kheir, W. (2018) Sphere-formation assay: three-dimensional *in vitro* culturing of prostate cancer stem/progenitor sphere-forming cells, *Front. Oncol.*, **8**, 347, doi: 10.3389/fonc.2018.00347.
158. Rybak, A. P., He, L. Z., Kapoor, A., Cutz, J. C., and Tang, D. (2011) Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1813**, 683-694, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.018.
159. Herheliuk, T., Perepelytsina, O., Ugnivenko, A., Ostapchenko, L., and Sydorenko, M. (2019) Investigation of multicellular tumor spheroids enriched for a cancer stem cell phenotype, *Stem Cell Invest.*, **6**, 21-21, doi: 10.21037/sci.2019.06.07.
160. Cao, L., Zhou, Y. M., Zhai, B. B., Liao, J., Xu, W., Zhang, R. X., Li, J., Zhang, Y., Chen, L., Qian, H. H., Wu, M. C., and Yin, Z. F. (2011) Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines, *BMC Gastroenterol.*, **11**, 71, doi: 10.1186/1471-230x-11-71.
161. Maliszewska-Olejniczak, K., Brodaczkowska, K. K., Bielecka, Z. F., Solarek, W., Kornakiewicz, A., Szczylik, C., Porta, C., and Czarnecka, A. M. (2019) Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells, *Cytotechnology*, **71**, 149-163, doi: 10.1007/s10616-018-0273-x.
162. Chen, L., Xiao, Z. F., Meng, Y., Zhao, Y. N., Han, J., Su, G. N., Chen, B., and Dai, J. W. (2012) The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs, *Biomaterials*, **33**, 1437-1444, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.056.
163. Farace, C., Oliver, J. A., Melguizo, C., Alvarez, P., Bandiera, P., Rama, A. R., Malaguarnera, G., Ortiz, R., Madeddu, R., and Prados, J. (2015) Microenvironmental modulation of decorin and lumican in temozolomide-resistant glioblastoma and neuroblastoma cancer stem-like cells, *PLoS One*, **10**, e0134111, doi: 10.1371/journal.pone.0134111.
164. Gao, W. J., Wu, D. L., Wang, Y. L., Wang, Z., Zou, C., Dai, Y., Ng, C. F., Teoh, J. Y. C., and Chan, F. L. (2018) Development of a novel and economical agar-based non-adherent three-dimensional culture method for enrichment of cancer stem-like cells, *Stem Cell Res. Ther.*, **9**, 243, doi: 10.1186/s13287-018-0987-x.
165. Chen, S. F., Chang, Y. C., Nieh, S., Liu, C. L., Yang, C. Y., and Lin, Y. S. (2012) Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties, *PLoS One*, **7**, e31864, doi: 10.1371/journal.pone.0031864.
166. Zhu, Z. W., Chen, L., Liu, J. X., Huang, J. W., Wu, G., Zheng, Y. F., and Yao, K. T. (2018) A novel three-dimensional tumorsphere culture system for the efficient and low-cost enrichment of cancer stem cells with natural polymers, *Exper. Ther. Med.*, **15**, 85-92, doi: 10.3892/etm.2017.5419.
167. Muenzner, J. K., Kunze, P., Lindner, P., Polaschek, S., Menke, K., Eckstein, M., Geppert, C. I., Chanvorachote, P., Baeuerle, T., Hartmann, A., and Schneider-Stock, R. (2018) Generation and characterization of hepatocellular carcinoma cell lines with enhanced cancer stem cell potential, *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 6238-6248, doi: 10.1111/jcmm.13911.
168. Xue, J. G., Zhu, Y., Sun, Z. X., Ji, R. B., Zhang, X., Xu, W. R., Yuan, X., Zhang, B., Yan, Y. M., Yin, L., Xu, H. J., Zhang, L. L., Zhu, W., and Qian, H. (2015) Tumorigenic hybrids between mesenchymal stem cells and gastric cancer cells enhanced cancer proliferation, migration and stemness, *BMC Cancer*, **15**, 793, doi: 10.1186/s12885-015-1780-1.
169. Nath, S., and Devi, G. R. (2016) Three-dimensional culture systems in cancer research: focus on tumor spheroid model, *Pharmacol. Ther.*, **163**, 94-108, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.

MOLECULAR MECHANISMS OF TUMOR CELL STEMNESS MODULATION DURING FORMATION OF SPHEROIDS: A REVIEW

Review

A. S. Ponomarev, Z. E. Gilazieva, V. V. Solovyova, and A. A. Rizvanov*

Kazan (Volga Region) Federal University,
420008 Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; e-mail: rizvanov@gmail.com

Cancer stem cells (CSCs), their properties and interaction with the microenvironment are of interest in modern medicine and biology. There are many studies on the emergence of CSCs and their involvement in tumor pathogenesis. The most important property inherent to CSCs is their stemness. Stemness combines the ability of the cell to maintain its pluripotency, give rise to differentiated cells and interact with the

environment to maintain a balance between dormancy, proliferation and regeneration. While adult stem cells exhibit these properties by participating in tissue homeostasis, CSCs behave as their malignant equivalents. High tumor resistance to therapy, the ability to differentiate, activate angiogenesis and metastasis arise precisely due to stemness of CSCs. These cells can be used as a target for therapy of different types of cancer. Laboratory models are needed to study cancer biology and find new therapeutic strategies. A promising direction is three-dimensional tumor models or spheroids. Such models form properties resembling stemness in a natural tumor. By modifying spheroids, it becomes possible to investigate the effect of therapy on CSCs, thus contributing to the development of anti-tumor drug test systems. The review examines the niche of CSCs, the possibility of their study using three-dimensional spheroids, and existing markers for assessing stemness of CSCs.

Keywords: tumor stem cells, stemness, malignant neoplasms, tumor spheroids, tumor microenvironment, transcription factors, test system