Исследования и практика в медицине. 2024. Т. 11, № 3. С. 8-23
https://doi.org/10.17709/2410-1893-2024-11-3-1
https://elibrary.ru/JEFFOM
3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология
ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

BY 4.0

Гетерогенная коллагенсодержащая композиция: влияние на клетки рака шейки матки линии HeLa и оценка перспективности применения в онкологической практике

И. А. Замулаева[1]✉, О. Н. Матчук[1], Л. С. Мкртчян[1], А. Д. Каприн[2,3,4]

[1] Медицинский радиологический научный центр им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Российская Федерация
[2] Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Российская Федерация
[3] Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Российская Федерация
[4] Российский университет дружбы народов, г. Москва, Российская Федерация
✉ zamulaeva@mail.ru

Аннотация

В основе возможного практического использования гетерогенной коллагенсодержащей композиции (ГКСК) для лечения осложнений лучевой терапии лежит понимание эффектов действия на опухолевые клетки.

Цель исследования. Изучить влияние ГКСК на рост, жизнеспособность, пролиферативную активность и пул стволовых клеток рака шейки матки *in vitro*.

Материалы и методы. Клетки линии HeLa инкубировали с коммерчески доступной ГКСК (торговое название Сферо®ГЕЛЬ в двух вариантах исполнения – Medium и Light) в течение 24–72 ч. Определяли общее количество опухолевых клеток, их жизнеспособность методом МТТ, суммарную долю клеток в фазах S + G2 + M методом проточной цитометрии, а также относительное и абсолютное количество опухолевых стволовых клеток (ОСК), идентифицированных по способности к выведению флуоресцентного красителя Хёхст 33342 из клеток (метод SP) и экспрессии CD133, после инкубации с ГКСК в двух разведениях и в контрольных образцах.

Результаты. При использовании ГКСК-Medium в разведении 1/5 (наименьшем из изученных разведений) зарегистрировано уменьшение общего числа опухолевых клеток на 13 % от контрольного уровня в течение всего периода наблюдения ($p < 0,05$). Этот эффект сопровождался параллельным снижением жизнеспособности клеток и уменьшением пролиферативной активности в первое время после начала воздействия по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Отмечена тенденция к уменьшению абсолютного количества ОСК, выявляемых независимо методами SP и иммунофенотипирования по CD133 после 72-часовой инкубации с ГКСК-Medium 1/5, в 1,3 раза по сравнению с контролем. Сходные, но кратковременные или менее выраженные эффекты показаны для ГКСК-Medium в большем разведении 1/20 и ГКСК-Light во всех разведениях в отношении общего количества опухолевых клеток и размера пула ОСК.

Заключение. Полученные результаты доказывают отсутствие стимулирующего действия ГКСК-Medium и ГКСК-Light как на общую массу опухолевых клеток линии HeLa, так и на субпопуляцию ОСК в условиях *in vitro*, и показывают перспективность дальнейшего проведения доклинических и клинических исследований по применению ГКСК в реабилитационных программах онкологических больных для лечения атрофических и/или лучевых вагинитов различной степени тяжести.

Ключевые слова:
рак шейки матки, ВПЧ-ассоциированные злокачественные новообразования, лучевые осложнения, реабилитация, регенеративная медицина, коллагенсодержащая композиция, Сферо®ГЕЛЬ, опухолевые стволовые клетки

Для цитирования: Замулаева И. А., Матчук О. Н., Мкртчян Л. С., Каприн А. Д. Гетерогенная коллагенсодержащая композиция: влияние на клетки рака шейки матки линии HeLa и оценка перспективности применения в онкологической практике. Research and Practical Medicine Journal (Исследования и практика в медицине). 2024; 11(3): 8-23. https://doi.org/10.17709/2410-1893-2024-11-3-1 EDN: JEFFOM

Для корреспонденции: Замулаева Ирина Александровна – д.б.н., профессор, заведующая отделом радиационной биохимии Медицинского радиологического научного центра им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Российская Федерация
Адрес: 249036, Российская Федерация, г. Обнинск, ул. Королёва, д. 4
E-mail: zamulaeva@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6136-8445, SPIN: 9542-6211, AuthorID: 87777, Scopus Author ID: 6603693422, Web of Science ResearcherID: R-4906-2016

Соблюдение этических стандартов: в работе соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ред. 2013). В работе использована коммерчески доступная клеточная культура линии HeLa в условиях in vitro.

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов: один из авторов, д.м.н., профессор, академик РАН А. Д. Каприн, является главным редактором журнала «Research'n Practical Medicine Journal». Статья прошла принятую в журнале процедуру рецензирования независимыми экспертами. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

Статья поступила в редакцию 31.07.2024; одобрена после рецензирования 21.08.2024; принята к публикации 27.08.2024.

© Замулаева И. А., Матчук О. Н., Мкртчян Л. С., Каприн А. Д., 2024

Research'n Practical Medicine Journal. 2024. Vol. 11, No. 3. P. 8-23
https://doi.org/10.17709/2410-1893-2024-11-3-1
https://elibrary.ru/JEFFOM
Pharmacology, clinical pharmacology
ORIGINAL ARTICLE

Heterogeneous collagen-containing composition: effect on HeLa cervical cancer cells and assessment of prospects for use in oncological practice

I. A. Zamulaeva[1]✉, O. N. Matchuk[1], L. S. Mkrtchian[1], A. D. Kaprin[2,3,4]

[1] A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation
[2] P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation
[3] National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russian Federation
[4] Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation
✉ zamulaeva@mail.ru

Abstract

Understanding the effects on tumor cells underlies possible practical use of collagen-containing composition (HCCC) for the treatment of radiation therapy related complications.
Purpose of the study. Is to investigate the effects of heterogeneous HCCC on growth, viability, proliferative activity and stem cell pool of cervical cancer *in vitro*.
Materials and methods. HeLa cells were incubated with commercially available HCCC (trademark Sphero®GEL in two versions: Medium and Light) for 24–72 h. We determined the total number of tumor cells, their viability by MTT assay, the total proportion of cells in S + G2 + M phases by flow cytometry, as well as the relative and absolute number of cancer stem cells (CSCs) identified by the ability to remove the fluorescent dye Hoechst 33342 from cells (SP method) and CD133 expression, after incubation with HCCC in two dilutions and in control samples.
Results. When using HCCC–Medium in a dilution of 1/5 (the lowest of the studied dilutions), decrease in the total number of tumor cells by 13 % from the control level was recorded during the entire observation period ($p < 0.05$). This effect was accompanied by parallel decrease in cell viability and decrease in proliferative activity in the first time after the onset of exposure compared to control ($p < 0.05$). The tendency towards decreases in the absolute number of CSCs, which were independently detected by SP and CD133 immunophenotyping methods after 72-hour incubation with HCCC–Medium 1/5, was observed. The number of SP and CD133+ cells decreased by 1.3 times compared to control. Similar, but short-term or less pronounced effects were shown for HCCC–Medium in a higher dilution of 1/20 and HCCC–Light in all dilutions in relation to the total number of tumor cells and the size of CSC pool.
Conclusion. The obtained results prove the absence of stimulating effect of HCCC–Medium and HCCC–Light on both the total mass of HeLa tumor cells and the CSC subpopulation *in vitro* and show the prospects for further preclinical and clinical studies on the use of HCCC in rehabilitation programs for treatment of atrophic and/or radiation vaginitis of varying severity in cancer patients.

Keywords:
cervical cancer, HPV-associated malignant neoplasms, radiation complications, rehabilitation, regenerative medicine, collagen-containing composition, Sphero®GEL, cancer stem cells

For citation: Zamulaeva I. A., Matchuk O. N., Mkrtchian L. S., Kaprin A. D. Heterogeneous collagen-containing composition: effect on HeLa cervical cancer cells and assessment of prospects for use in oncological practice. Research and Practical Medicine Journal (Issled. prakt. med.). 2024; 11(3): 8-23. (In Russ.). https://doi.org/10.17709/2410-1893-2024-11-3-1 EDN: JEFFOM

For correspondence: Irina A. Zamulaeva – Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Radiational Biochemistry, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation
Address: 4 Koroleva str., Obninsk, 249036, Russian Federation
E-mail: zamulaeva@mail.ru
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6136-8445, SPIN: 9542-6211, AuthorID: 87777, Scopus Author ID: 6603693422, Web of Science ResearcherID: R-4906-2016

Compliance with ethical standards: the research study followed the ethical principles set forth by the World Medical Association Declaration of Helsinki, 1964, ed. 2013. Commercially available cell culture of the HeLa line under *in vitro* conditions was used in the work.

Funding: this work was not funded.

Conflict of interest: Professor Andrey D. Kaprin, MD, Academician of the Russian Academy of Sciences, is the Editor-in-Chief of the Journal «Research'n Practical Medicine Journal» and one of the authors of the article. The article has passed the review procedure accepted in the Journal by independent experts. The authors did not declare any other conflicts of interest.

The article was submitted 31.07.2024; approved after reviewing 21.08.2024; accepted for publication 27.08.2024.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Коллаген – наиболее распространенный белок внеклеточного матрикса – обладает высокой биологической совместимостью и является идеальным биоматериалом для применения в медицинских целях, особенно в тканевой инженерии и регенеративной терапии [1]. Коллагенсодержащие материалы в разных формах с успехом используются более 50 лет в таких областях, как пластическая и реконструктивная хирургия, общая хирургия, урология, проктология, гинекология, офтальмология, отоларингология, стоматология, нейрохирургия, сердечно-сосудистая хирургия, хирургия костей и хрящей, а также косметология [2–4]. В Российской Федерации зарегистрировано медицинское изделие «Композиция гетерогенного имплантируемого геля Сферо®ГЕЛЬ» (АО «БИОМИР сервис», Россия) (СГ). Медицинское изделие изготавливается на основе коллагенсодержащего экстракта в трех вариантах исполнения в зависимости от размера частиц и срока резорбции микрочастиц сшитого коллагена в организме: Light (30–70 мкм, резорбция в течение 1–1,5 мес.), Medium (70–150 мкм, 4–6 мес.) и Long (15–300 мкм, 6–12 мес.). СГ имеет в своем составе практически все низко- и высокомолекулярные компоненты внеклеточного матрикса животного происхождения, включая биологически активные молекулы, что обеспечивает его способность стимулировать регенерацию различных тканей и определяет широкий спектр применения в восстановительной и заместительной эстетической медицине и хирургии, травматологии и ортопедии, нейрохирургии, офтальмологии, урологии и гинекологии. В частности, недавно была показана эффективность этого медицинского изделия для лечения пациенток с генитоуринарным менопаузальным синдромом (ГУМС) [5].

По данным зарубежных публикаций, симптоматика ГУМС наблюдается у 80 % больных раком шейки матки (РШМ) после радикального лечения [6]. Более того, в российском исследовании у всех больных РШМ Ib2–III стадий после сочетанной лучевой и химиолучевой терапии на отдаленных сроках наблюдения была выявлена атрофия слизистой влагалища различной степени тяжести, влияющая на параметры качества жизни, в том числе семейное, эмоциональное и сексуальное благополучие [7]. Сделан вывод о том, что атрофический вагинит является неотъемлемым последствием радикальных курсов сочетанной лучевой и химиолучевой терапии. Кроме того, лучевые эпителииты, возникающие вследствие воздействия ионизирующего излучения на влагалищную трубку, на фоне атрофических изменений принимают затяжной характер, переходя от катаральных к пленчато-некротическим или язвенным процессам, усугубляющим проявления ГУМС. Эти обстоятельства, а также наличие абсолютных и относительных противопоказаний к гормонотерапии диктуют необходимость разработки новых эффективных методов лечения атрофического и/или лучевого вагинита у больных РШМ после окончания противоопухолевой терапии. Идея использовать СГ с этой целью выглядит весьма привлекательной, учитывая данные отечественных авторов о его регенеративных свойствах [5, 8].

Однако возможность безопасного применения СГ у пациентов с отягощенным онкологическим анамнезом требует предварительного исследования в силу ряда причин, основные из которых перечислены ниже. Во-первых, у больных, даже находящихся в длительной ремиссии (не имеющих клинических признаков основного заболевания в течение 1 года и более после окончания противоопухолевого лечения), возможно рецидивирование опухолевого процесса за счет редких опухолевых клеток, сохранивших жизнеспособность во время лечения из-за высокой радио- и химиорезистентности. По современным представлениям таковыми являются так называемые опухолевые стволовые клетки (ОСК). Доказано, что ОСК присутствуют в злокачественных новообразованиях подавляющего большинства локализаций, в том числе и в злокачественных опухолях шейки матки. Как показывают многочисленные данные литературы и результаты собственных исследований [9–13], ОСК по сравнению с остальной массой опухолевых клеток действительно обладают более высокой резистентностью к действию многих традиционных химиопрепаратов и редкоионизирующего (гамма-, рентгеновского) излучения, которое используется в стандартных курсах лучевой терапии. Многие исследователи полагают, что именно сохранение ОСК после радио- или химиотерапии приводит к рецидивированию опухолевого процесса у части онкологических больных [14–16]. ОСК могут находиться в дормантном («спящем») состоянии после окончания лечения, но нельзя исключить стимулирующего воздействия СГ на эти клетки. Во-вторых, убедительно показано, что коллаген определенных типов (I, IV, XVII и др.) обогащает субпопуляцию ОСК глиобластомы, злокачественных новообразований поджелудочной железы, легкого, яичника и других локализаций и с успехом может использоваться для культивирования ОСК *in vitro* в составе 3D матриксов [17–22]. В недавнем обзоре Jalil S. M.A. и соавт. (2024) рассмотрено значение коллагена как перспективной мишени для противоопухолевой терапии [23]. И, наконец, в-третьих, российскими исследователями показана способность биополимерного микрогетерогенного

коллагенсодержащего гидрогеля, каковым является СГ, поддерживать жизнеспособность, индуцировать пролиферацию и дифференцировку нормальных клеток в экспериментальных условиях *in vitro* и *in vivo*, стимулируя тем самым процессы регенерации поврежденного суставного хряща, поджелудочной железы и печени [8, 24, 25]. Влияние СГ на опухолевые клетки и отдельно на ОСК ранее не изучалось и, соответственно, возможность стимулирующего действия СГ на эти клетки не оценивалась. Все эти причины определяют актуальность оценки действия СГ на клетки РШМ и особенно на ОСК.

Цель исследования: изучить влияние гетерогенной коллагенсодержащей композиции (ГКСК) на рост, жизнеспособность, пролиферативную активность и пул стволовых клеток рака шейки матки *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток и инкубация со СГ

В качестве объекта исследования выбрана широко известная и часто используемая во всем мире линия HeLa, которая происходит из эпителиоидной карциномы шейки матки, инфицированной вирусом папилломы человека 18 типа. Клетки HeLa, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия), культивировали в стандартных условиях в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки («Biosera», Франция), пенициллина (50 000 Ед/л), стрептомицина (50 мг/л) и глутамина (292 мг/л) в CO_2-инкубаторе («NuAire», США) при 37 °С в увлажненной атмосфере (90 % влажности), содержавшей 5 % CO_2.

В работе оценивалось влияние ГКСК СГ на опухолевые клетки изучаемой линии *in vitro* по критериям абсолютного количества, жизнеспособности и пролиферативной активности общей популяции клеток, а также по количеству ОСК.

Использованное в работе медицинское изделие «Композиция гетерогенного имплантируемого геля Сферо®ГЕЛЬ» (регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13033) производства АО «БИОМИР сервис», Россия, представляет собой прозрачный, слегка опалесцирующий, вязкоупругий, pH сбалансированный, стерильный гидрогель в инъекционной форме. СГ изготавливается из гидролизированного коллагена животного происхождения с включением микронизированных частиц сшитого коллагена. Стерилизуется радиационным способом. В работе использован СГ в двух вариантах исполнения (Medium и Light). Выбор рабочих разведений СГ основан на опыте его клинического применения (интравагинально, субмукозно – по всей окружности и протяженности стенок влагалища), в соответствии с которым 2 мл изделия вводят на площади около 7 × 7 см на глубину примерно 0,5 см, т.е. 2 $см^3$ СГ распределяются в объеме 24,5 $см^3$, а примерное разведение изделия составляет 1/10. Учитывая приблизительный характер этих расчетов, в экспериментах использовали объемные разведения СГ 1/5 и 1/20.

Для определения жизнеспособности клетки рассевали в 96-луночные планшеты (Corning Costar, США) по 5000 клеток в каждую лунку в 150 мкл полной питательной среды DMEM. Через 24 ч в среду культивирования добавляли СГ в вариантах исполнения Medium (СГ-M) и Light (СГ-L) в конечных разведениях 1/5 и 1/20 каждый и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч в стандартных условиях в CO_2-инкубаторе («Shellab», США). Контролем служили клетки, не инкубированные со СГ. Выполнено 3 независимых эксперимента.

Для экспериментов по определению общего количества опухолевых клеток, их пролиферативной активности и количества ОСК клетки рассевали в пластиковые флаконы с площадью дна 25 $см^2$ («Corning», США) по 200 тыс. клеток/флакон в полной питательной среде DMEM. Через 24 ч в среду культивирования добавляли СГ-M или СГ-L в конечных разведениях 1/5 и 1/20 каждый и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч в стандартных условиях в CO_2 инкубаторе («Shellab», США). Затем клетки снимали с подложки с помощью смеси Версена и Трипсина (2:1) («ПанЭко», Россия), определяли концентрацию клеток с помощью камеры Горяева и вычисляли общее количество клеток во флаконе. Интактные клетки использовали в качестве контроля. Выполнено 3 независимых эксперимента.

Определение жизнеспособности (суммарной митохондриальной активности) клеток общей популяции с помощью МТТ-теста

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью теста, основанного на процессе биотрансформации желтого тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2H-тетразолийбромида (МТТ) внутриклеточными оксидоредуктазами до нерастворимого в воде фиолетового формазана. Количество образовавшегося формазана отражает уровень метаболизма в клетках (в митохондриях) и количество клеток. Этот метод широко используется в качестве колориметрического теста, основанного на активности митохондриальных ферментов.

МТТ-тест выполняли по стандартной методике. В конце инкубации со СГ в каждую лунку добавляли МТТ в концентрации 0,25 мг/мл в бессывороточной среде DMEM и инкубировали в течение 3 ч в CO_2-инкубаторе при 37 °С. Экстракцию образовавшегося за это время формазана производили диметилсульф-

оксидом с последующей спектрофотометрической оценкой уровня накопления. Оптическую плотность (ОП) конечного продукта реакции (формазана) определяли на микропланшетном фотометре Infinite F50 («TECAN», Австрия) при длине волны более 540 нм. Среднюю ОП в контрольных лунках принимали за 100 %. ОП в опытных лунках представляли в процентах от контроля.

Анализ клеточного цикла и оценка пролиферативной активности клеток общей популяции

Клетки культивировали во флаконах и снимали с подложки как описано выше. После подсчета концентрации клеток в полученной суспензии отбирали аликвоты по 100 тыс. клеток, центрифугировали при 200 g в течение 5 мин., осадок ресуспендировали в 0,1 мл 0,01 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 0,9 % натрия хлорида, pH 7,2. Затем в полученную суспензию клеток вливали холодный (+4 ˚С) метанол в объемном соотношении 2: 1 (метанол: суспензия клеток в ФСБ). Зафиксированные клетки хранили при +4 ˚С не более 1 мес.

Фиксированные клетки собирали центрифугированием при 200 g в течение 15 мин. К осадку добавляли 150 мкл окрашивающего раствора и 150 мкл раствора РНКазы («Thermo Scientific», США) (200 ед/мл в ФСБ). Окрашивающий раствор содержал иодистый пропидий (ИП) в конечной концентрации 0,1 мг/мл, 0,1 % Тритон-Х100, 3,9 % этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в ФСБ. Получившуюся смесь инкубировали в темноте в течение 30 мин. при комнатной температуре, после чего фильтровали через 40-мкм нейлоновый фильтр и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur («BD», США) по стандартной методике. С помощью программы ModFit 3.1 («BD», США) определяли долю клеток в фазах G1(G0), S, G2 + M. Для оценки пролиферативной активности вычисляли так называемый индекс пролиферации – суммарную долю (%) клеток, находящихся в синтетической, постсинтетической фазах цикла и в митозе (S + G2 + M).

Идентификация и определение количества ОСК с помощью проточной цитометрии

Идентификацию и количественную оценку ОСК выполняли с помощью двух методов, хорошо известных в литературе: иммунофенотипирование по поверхностному маркеру CD133 и оценка эффективности исключения из клеток флуоресцентного красителя Хёхст 33342.

CD133 представляет собой трансмембранный гликопротеин, кодируемый геном проминина 1 человека (*PROM1*). CD133 широко используется в качестве маркера ОСК в злокачественных новообразованиях мно-

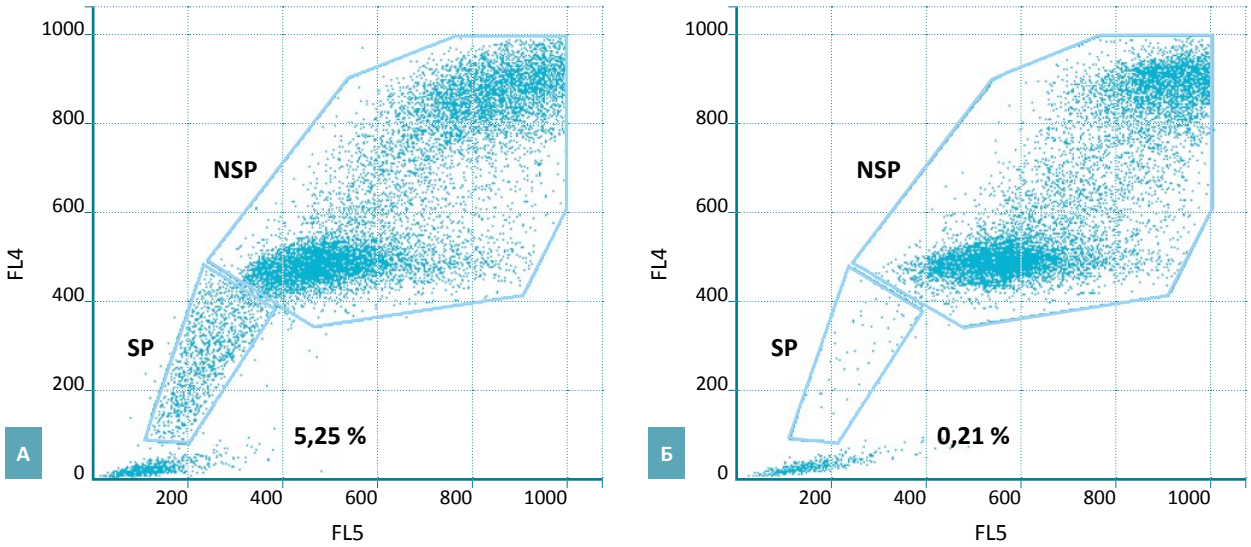


Рис. 1. Полученные в работе типичные графики распределения клеток линии HeLa по интенсивности флуоресценции Хёхста 33342 в контроле. А – образец без верапамила, Б – образец после инкубации с верапамилом. Выделены регионы клеток SP и остальных клеток (non SP – NSP); указана доля клеток SP; на каждом графике показано 30 тыс. событий. По оси абсцисс (FL5) – интенсивность флуоресценции в красной области спектра (λ = 675 ± 20 нм); по оси ординат (FL4) – интенсивность флуоресценции в синей области спектра (λ = 424 ± 20 нм)

Fig. 1. The typical graphs of the distribution of HeLa cells by the fluorescence intensity of Hoechst 33342 in the control sample obtained in the work. A – the sample without verapamil, Б – the sample after incubation with verapamil. Regions of SP cells and other cells (non-SP – NSP) are highlighted; the proportion of SP cells is indicated; each graph shows 30 thousand events. Along the abscissa axis (FL5) – is the fluorescence intensity in the red region of the spectrum (λ = 675 ± 20 nm); along the ordinate axis (FL4) – is the fluorescence intensity in the blue region of the spectrum (λ = 424 ± 20 nm)

гих локализаций, включая РШМ [26–28]. Учитывая многочисленные доказательства принадлежности $CD133^+$ клеток к субпопуляции ОСК РШМ, этот иммунофенотип был выбран нами для выявления ОСК.

Второй метод идентификации ОСК, использованный в работе, основан на способности этих клеток откачивать флуоресцентный краситель Хёхст 33342 во внеклеточную среду вследствие высокой экспрессии на плазматической мембране различных АТФ-связывающих транспортеров (в отличие от остальных клеток). Благодаря этой способности ОСК могут быть выявлены с помощью проточной цитометрии как так называемая боковая популяция (side population – SP) слабо окрашенных клеток в стабильных линиях опухолевых клеток различного происхождения, в том числе РШМ [26, 27].

Метод иммунофенотипирования по экспрессии CD133. Из клеточных суспензий, полученных как описано выше после 72-часовой инкубации с СГ-М и СГ-L, отбирали аликвоты по 100 тыс. клеток, центрифугировали при 250 g в течение 5 мин., к осадку добавляли холодный раствор Хенкса («ПанЭко», Россия) и ресуспендировали. Далее клетки инкубировали с моноклональными антителами к CD133, мечеными фикоэритрином (ФЭ) («BD Pharmingen», США), из расчета по 2 мкл антител на 100 тыс. клеток. Для контроля неспецифического связывания использовали моноклональные антитела соответствующего изотипа к гемоцианину улитки, конъюгированные с ФЭ («BD», США). Пробы инкубировали с антителами 30 мин. при +4 °С в темноте, затем отмывали в ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Vantage («BD», США). Определяли относительное количество (%) ОСК с иммунофенотипом $CD133^+$ среди неповрежденных клеток, выделенных по параметрам прямого и бокового светорассеяния по общепринятой методике. Абсолютное количество $CD133^+$ ОСК определяли путем умножения доли этих клеток на общее количество клеток во флаконе, определенное с помощью камеры Горяева.

Метод SP. В этом случае клетки культивировали во флаконах и снимали с подложки как описано выше после инкубации с СГ-М и СГ-L в обоих разведениях в течение 24, 48 и 72 ч. Из каждого флакона отбирали аликвоты по (1–2) × 10^5 клеток. Далее следовали стандартной методике идентификации клеток SP, как подробно описано в работе [9]. Кратко, клетки инкубировали с Хёхстом 33342 (Calbiochem – Behring Corp., Германия) в концентрации 5 мкг/мл в течение 90 мин. при +37 °С. Для контроля окрашивания часть проб перед добавлением Хёхста инкубировали в течение 15 мин. с верапамилом в концентрации 12,5 мг/мл («ЭбевеФарма», Австрия) – блокатором АТФ-связывающих транспортеров, который препятствует обратному транспорту из клеток ряда веществ, в том числе Хёхста 33342. Перед анализом в образцы добавляли ИП в конечной концентрации 2 мкг/мл. Для анализа использовали проточный цитофлуориметр FACS Vantage, оснащенный двумя лазерами с длиной волны 364 нм и 488 нм. Флуоресценцию Хёхста 33342 измеряли в красной (675 ± 20 нм) и синей (424 ± 20 нм) областях спектра ($\lambda_{возб}$ =364 нм). Флуоресценцию регистрировали при длине волны 585 ± 20 нм ($\lambda_{возб}$ = 488 нм). Полученные

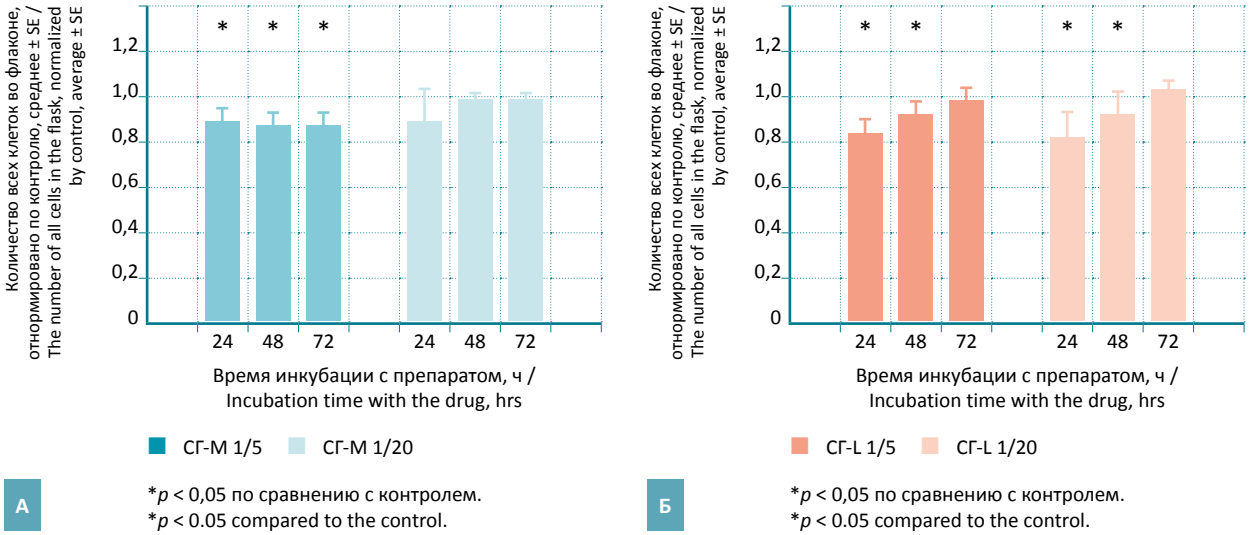
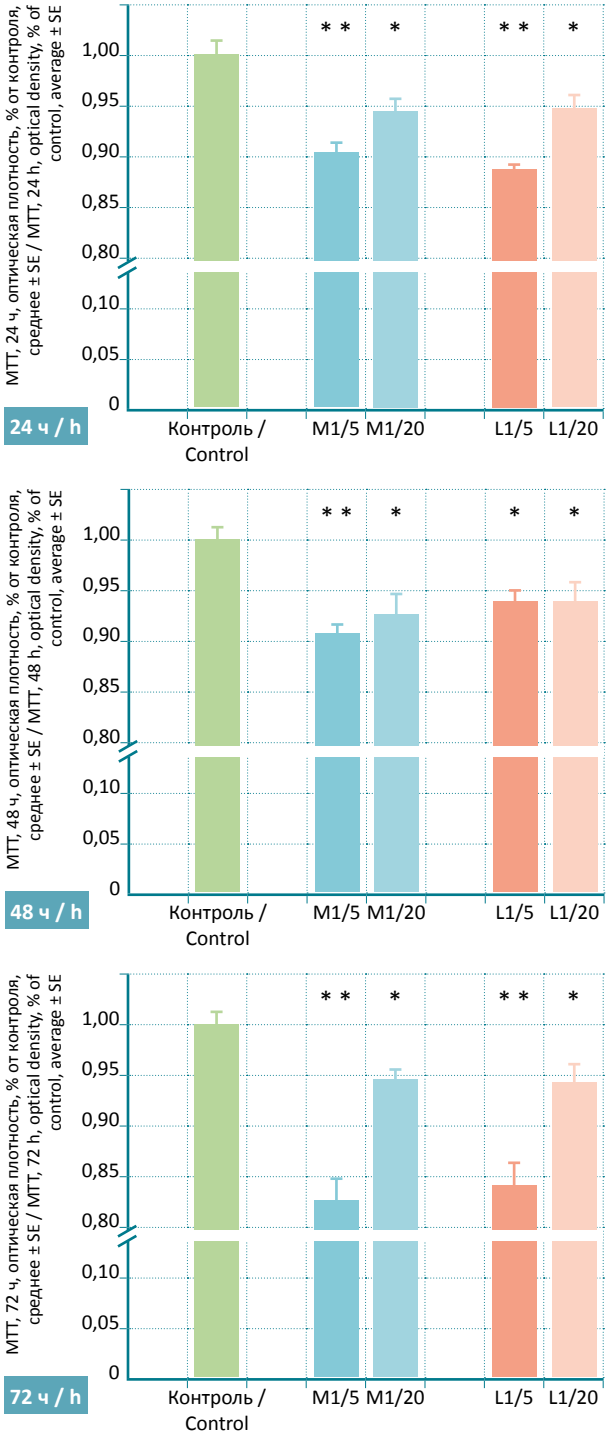


Рис. 2. Общее количество опухолевых клеток после инкубации со СГ-М (А) и СГ-L (Б) в разведениях 1/5 и 1/20 в течение 24, 48 и 72 ч. Данные нормированы по контролю, принятому за 1

Fig. 2. The total number of tumor cells after incubation with SG-M (A) and SG-L (Б) in dilutions 1/5 and 1/20 for 24, 48 and 72 hours. The data are normalized according to the control taken for 1



*p < 0,01; **p < 0,001 по сравнению с контролем.
*p < 0.01; **p < 0.001 compared to the control.

Рис. 3. Жизнеспособность клеток HeLa по результатам МТТ-теста после инкубации с СГ-М и СГ-L в разных разведениях в течение 24, 48 и 72 ч. Данные нормированы по контролю, принятому за 1

Fig. 3. Viability of HeLa cells according to the results of the MTT assay after incubation with SG-M and SG-L in different dilutions for 24, 48 and 72 hours. The data are normalized according to the control taken as 1

данные записывали в файл и обрабатывали с помощью программы CellQuestPro («BD», США). После исключения дебриса и погибших клеток по показателям светорассеяния и флуоресценции ИП анализировали флуоресценцию Хёхста 33342 и выделяли регион SP таким образом, чтобы в контрольном образце с верапамилом в него попадало минимальное количество клеток, как показано на рис. 1. Долю клеток SP определяли среди клеток с неповрежденной плазматической мембраной, которые не окрашивались ИП. Абсолютное количество клеток SP вычисляли путем умножения доли этих клеток на общее количество клеток во флаконе.

Статистическая обработка полученных данных

Обработку полученных данных выполняли с помощью стандартных методов биологической статистики с использованием программ Origin 6.1 (Microcal Software, Inc.) и Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Сравнение данных в контрольной и экспериментальной группах проводили по критериям Стьюдента (в случае нормального распределения сравниваемых величин по тесту Шапиро–Уилка) или Манна–Уитни (при отсутствии нормального распределения). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали клетки линии HeLa в логарифмической стадии роста, поэтому по мере культивирования происходило постепенное увеличение количества клеток. Так, в одном из типичных экспериментов среднее количество (±SE) клеток/флакон в контроле составляло 267 ± 34, 470 ± 17, 774 ± 33 тыс. через 48, 72 и 96 ч после пересева (т.е. во временных точках, которые соответствуют 24, 48 и 72 ч после добавления СГ в экспериментальные флаконы). В экспериментальных флаконах также происходило увеличение количества клеток по мере культивирования. Для удобства сопоставления эффектов в разные сроки инкубации с препаратом все данные по общему количеству клеток были нормированы на контроль, принятый за 1 в каждой временной точке. Полученные результаты представлены на рис. 2. После инкубации со СГ в обоих вариантах исполнения в течение 24 ч отмечалось уменьшение общего количества опухолевых клеток, которое достигало статистической значимости при использовании СГ-М 1/5 и СГ-L 1/5 или СГ-L 1/20 (по сравнению с контролем). В этой временной точке уменьшение общего числа клеток составляло 11–18 % от контрольного уровня при разных режимах использования СГ. Через 48 ч инкубации этот эффект несколько снижался

(до 7–13 % от контрольного уровня), но статистическая значимость различий по сравнению с контролем сохранялась. При удлинении периода инкубации до 72 ч статистически значимое уменьшение общего количества опухолевых клеток сохранялось только в случае СГ-М в наименьшем разведении (1/5); в этом случае снижение показателя достигало 13 %. Для СГ-L характерно постепенное восстановление общего количества клеток до контрольного уровня к 72 ч инкубации независимо от разведения.

Жизнеспособность клеток, определяемая методом МТТ, является интегральным показателем активности митохондриальных ферментов в отдельных клетках и общего числа клеток. В некоторых литературных

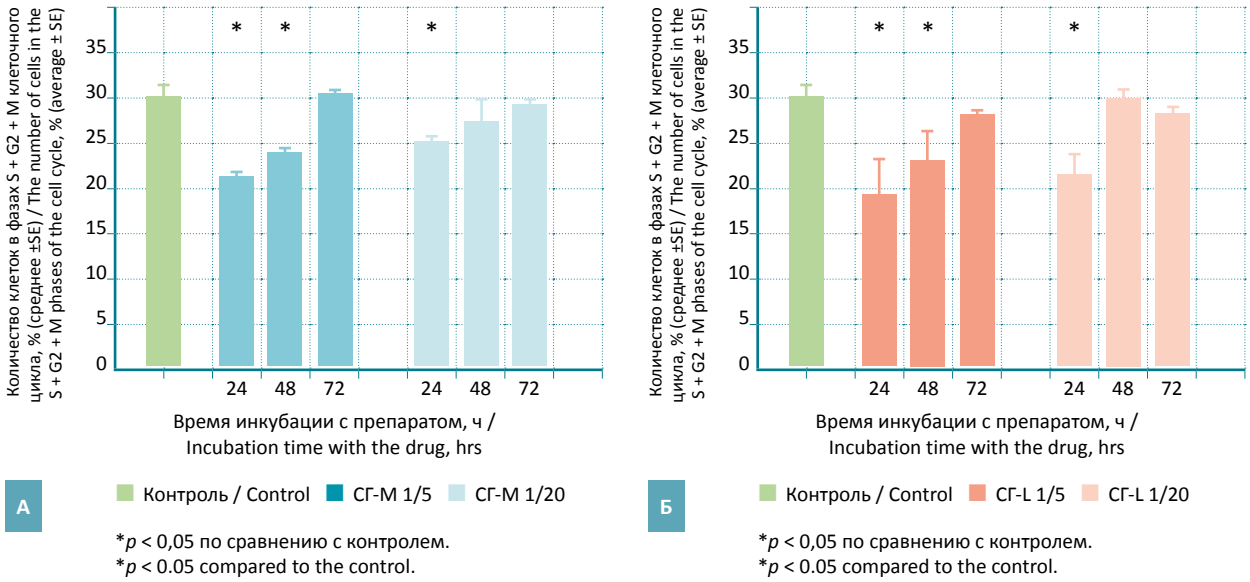


Рис. 4. Индекс пролиферации (% клеток в S + G2 + M фазах) после инкубации со СГ-М (А) и СГ-L (Б) в разведениях 1/5 и 1/20 в течение 24, 48 и 72 ч

Fig. 4. Proliferation index (% of cells in S + G2 + M phases) after incubation with SG-M (A) and SG-L (Б) in dilutions 1/5 and 1/20 for 24, 48 and 72 hours

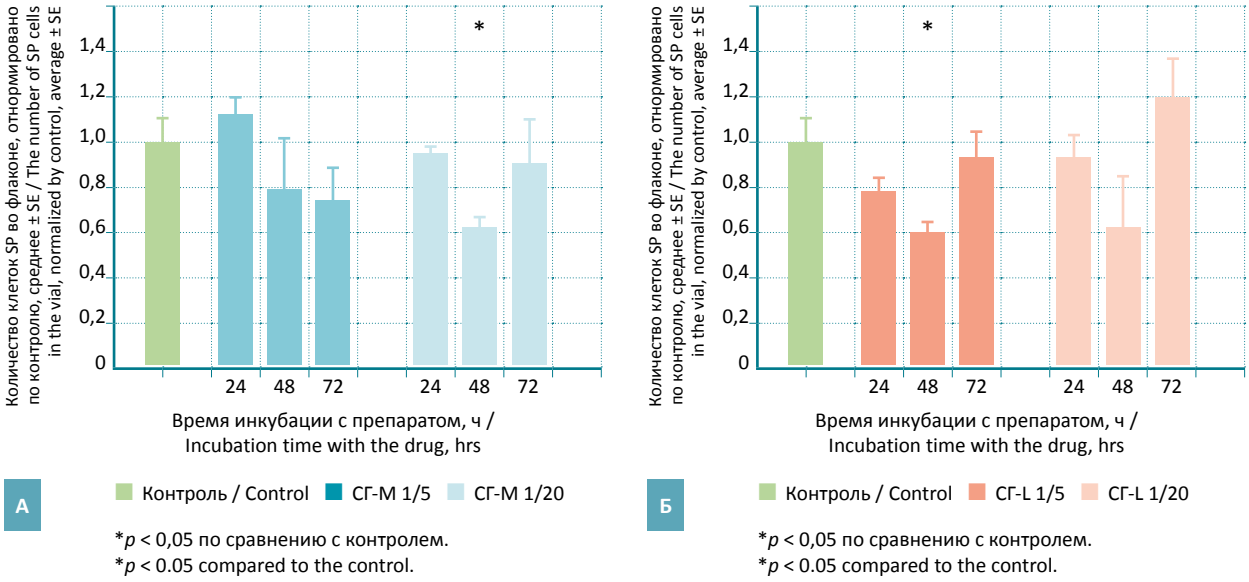


Рис. 5. Абсолютное количество ОСК (клеток SP) после инкубации со СГ-М (А) и СГ-L (Б) в разведениях 1/5 и 1/20 в течение 24, 48 и 72 ч. Данные нормированы по контролю, принятому за 1

Fig. 5. The absolute number of CSCs (SP cells) after incubation with SG-M (A) and SG-L (Б) in dilutions 1/5 and 1/20 for 24, 48 and 72 hours. The data are normalized according to the control taken as 1

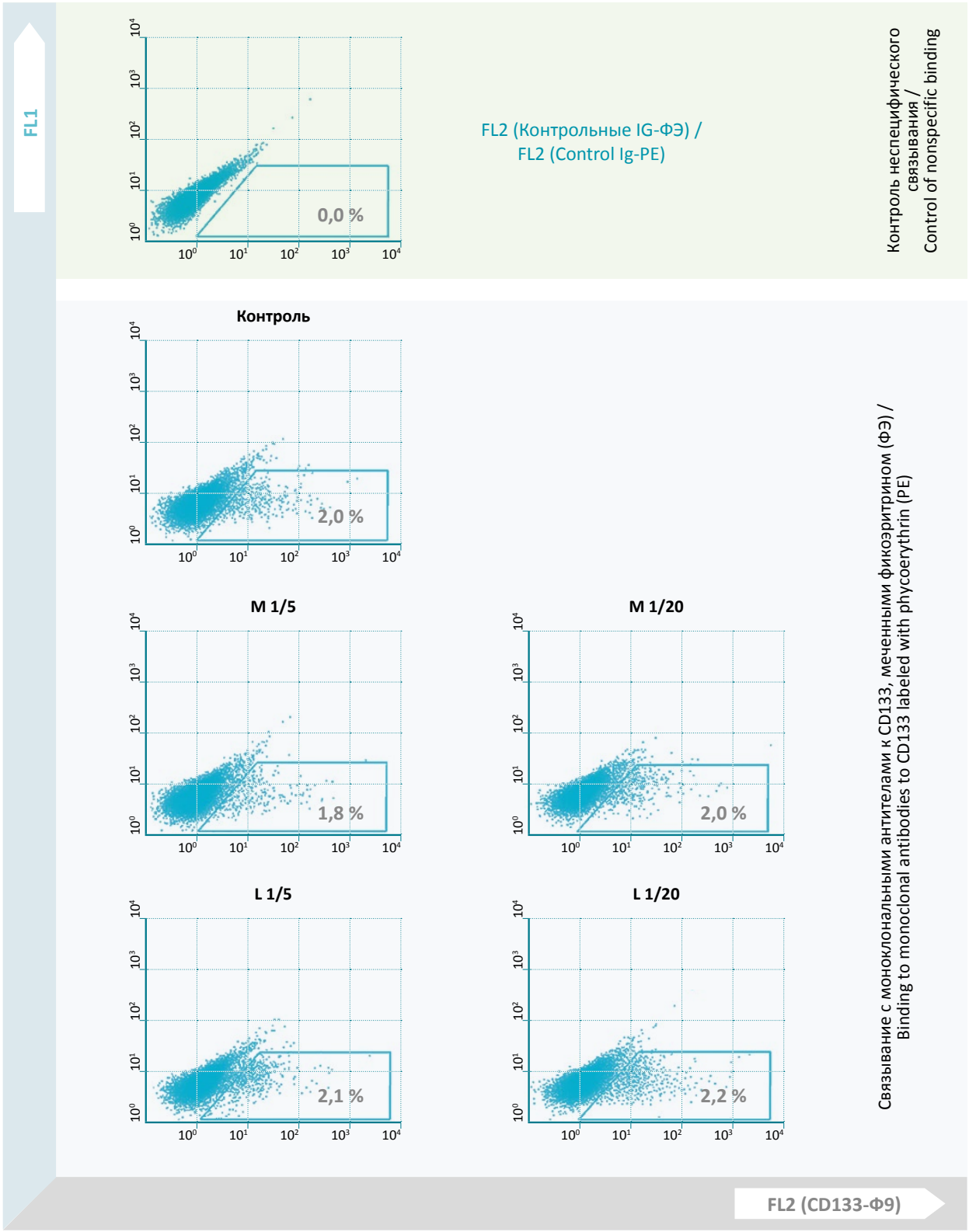


Рис. 6. Типичные графики распределения клеток линии HeLa по связыванию антител к CD133 и контрольных Ig, меченных ФЭ, после инкубации со СГ-М и СГ-L в различных разведениях в течение 72 ч. На каждом графике показано 20 тыс. событий. Выделен регион CD133+ ОСК и указана их доля

Fig. 6. Typical graphs of the distribution of HeLa cells by binding antibodies to CD133 and control Ig labeled with PE after incubation with SG-M and SG-L in various dilutions for 72 hours. Each graph shows 20 thousand events. The CD133+ CSC region is highlighted and their proportion is indicated

источниках МТТ называют тестом на метаболическую активность клеток. Этот тест часто используется в биологических исследованиях из-за его быстроты, относительно низкой стоимости и отсутствия субъективности на этапе получения данных.

После инкубации со СГ в обоих вариантах исполнения, во всех разведениях и изученных временных точках зарегистрировано статистически значимое уменьшение жизнеспособности клеток общей популяции по сравнению с таковой в контроле (рис. 3). Обнаруженное уменьшение составляет от 5 до 16 % по сравнению с контролем, т.е. примерно соответствует диапазону изменений, показанному для общего количества клеток. Но имеются и отличия эффектов, установленных по критериям жизнеспособности и общего количества клеток. Отличия заключаются в том, что общее количество клеток восстанавливается до контрольного уровня после 72-часовой инкубации при всех вариантах воздействия кроме СГ-М 1/5, а жизнеспособность остается все еще сниженной по сравнению с контролем до конца периода наблюдения во всех случаях. При этом наибольшее снижение этого показателя отмечается при использовании минимальных разведений 1/5 СГ-М и СГ-L, но в первом случае выражено несколько сильнее, составляя в среднем 16 % для СГ-М 1/5 и 14 % для СГ-L 1/5 по сравнению с контролем.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла определено с помощью проточной цитометрии по интенсивности флуоресценции ИП, которая прямо коррелирует с содержанием ДНК. Этот метод давно используется в клеточной биологии, но, как известно, имеет некоторые ограничения, связанные с невозможностью разделить клетки в фазах G1 и G0 (поскольку и те, и другие имеют диплоидное содержание ДНК), а также нельзя разделить клетки в фазах G2 и M (поскольку и те, и другие имеют тетраплоидное содержание ДНК). Тем не менее, с помощью этого метода зачастую вычисляют так называемый индекс пролиферации (суммарную долю клеток в S + G2 + M фазах цикла, в которых могут находиться только пролиферирующие клетки за редким исключением). Результаты определения индекса пролиферации после инкубации со СГ в разных концентрациях представлены на рис. 4. Уже через 24 ч инкубации со СГ в любом варианте исполнения наблюдается статистически значимое снижение индекса пролиферации по сравнению с контролем, причем при меньшем разведении эффект выражен сильнее. Через 48 ч инкубации со СГ эффект снижения индекса пролиферации ослабевает, статистически значимые различия по сравнению с контролем сохраняются только при наименьшем из использованных разведений (СГ-М 1/5 и СГ-L 1/5), а через 72 ч инкубации все различия с контролем исчезают независимо от варианта исполнения и разведения СГ.

Заключительная часть исследования была посвящена оценке ответа ОСК на воздействие СГ в обоих вариантах исполнения и разведениях. С помощью метода SP определено относительное и абсолютное количество ОСК после инкубации со СГ в течение 24, 48 и 72 ч. Статистически значимых изменений относительного количества (доли) клеток SP по сравнению с контролем не зарегистрировано ни в одном случае, кроме кратковременного уменьшения этого показателя после воздействия СГ-М 1/20 в течение 48 ч (p = 0,001). Результаты определения абсолютного количества ОСК (SP) показаны на рис. 5. Во временной точке 48 ч обнаружено кратковременное уменьшение абсолютного количества клеток SP при воздействии СГ-М 1/20 (p = 0,001) и СГ-L 1/5 (p = 0,007); для СГ-L 1/20 отмечена тенденция к снижению количества

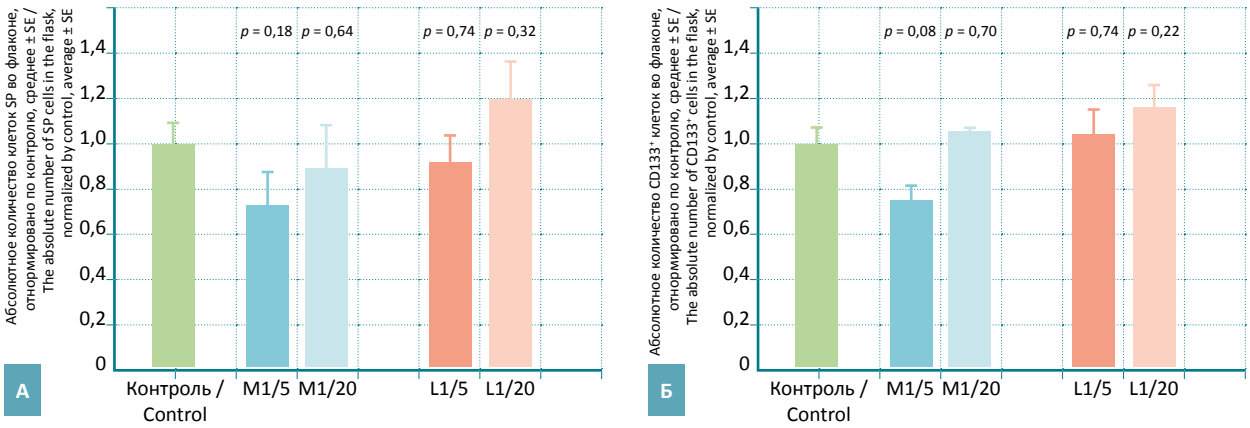


Рис. 7. Абсолютное количество клеток SP (А) и CD133+ (Б) после инкубации с СГ-М и СГ-L в разных разведениях в течение 72 ч. Данные нормированы по контролю, принятому за 1. Указаны значения p при сравнении с контролем

Fig. 7. The absolute number of SP (A) and CD133+ (Б) cells after incubation with SG-M and SG-L in different dilutions for 72 hours. The data are normalized according to the control taken as 1. The p values are indicated when compared with the control

клеток SP на уровне $p = 0,08$. Обращает на себя внимание стойкая тенденция к снижению количества клеток SP после контакта со СГ-М в разведении 1/5 в течение 48–72 ч ($p = 0,18$ для точки 72 ч по сравнению с контролем), что соответствует уменьшению общего количества опухолевых клеток после такого воздействия (рис. 2). Важно, что стимулирующего действия СГ на клетки SP не выявлено ни для одного варианта воздействия, по крайней мере, в течение 72 ч.

Количество CD133$^+$ ОСК изучали во временной точке 72 ч инкубации со СГ. Типичные графики проточной цитометрии, по которым определяли относительное количество (долю) CD133$^+$ ОСК, приведены на рис. 6, а полученные результаты – на рис. 7. Как и при изучении доли клеток SP, в этой временной точке статистически значимых различий по сравнению с контролем не выявлено. При этом абсолютное количество CD133$^+$ клеток после воздействия СГ в разных режимах полностью повторяет «профиль» абсолютного количества клеток SP после аналогичных воздействий (рис. 7). Как следствие, данные этих двух независимых методов выявления ОСК коррелируют между собой (рис. 8).

Таким образом, результаты изучения CD133$^+$ клеток подтверждают отсутствие стимулирующего действия СГ на ОСК, которое было показано с помощью метода SP. Более того, при использовании СГ-М в минимальном разведении 1/5 двумя методами

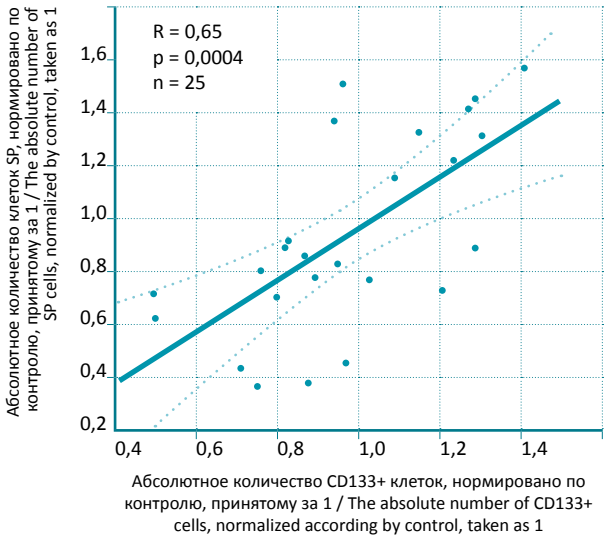


Рис. 8. Корреляция абсолютного количества клеток SP и CD133+ после инкубации с СГ-М и СГ-L в разных разведениях в течение 72 ч. Разорванные линии показывают границы 95 % доверительного интервала для линейной регрессии

Fig. 8. Correlation of the absolute number of SP and CD133+ cells after incubation with SG-M and SG-L in different dilutions for 72 hours. The broken lines show the boundaries of the 95 % confidence interval for linear regression

независимо показана тенденция к уменьшению количества ОСК после 72-часовой инкубации примерно в 1,3 раза по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Достаточно быстро после добавления в среду культивирования СГ начинается снижение общего количества клеток HeLa по сравнению с контролем. При удлинении периода инкубации до 72 ч общее количество клеток восстанавливается до контрольного уровня во всех случаях кроме варианта использования СГ-М в наименьшем разведении (1/5). При этом происходит согласованное по времени уменьшение, а затем восстановление индекса пролиферации, что свидетельствует о цитостатическом (но не цитотоксическом) действии СГ. Жизнеспособность общей популяции клеток по данным МТТ-теста также быстро снижается и примерно в той же степени, но не восстанавливается к концу периода наблюдения (72 ч) в отличие от общего числа клеток.

Можно полагать, при добавлении СГ в культуральную среду происходит изменение концентрации солей, питательных веществ и, возможно, газового состава внеклеточной среды, что является причиной клеточного стресса, снижения митохондриальной активности и временной остановки продвижения по клеточному циклу. К 72 часам, по-видимому, происходит частичная адаптация клеток к изменившимся условиям и/или концентрация СГ в среде падает из-за поглощения клетками его компонентов вследствие эндоцитоза (кроме воздействия СГ-М в наименьшем разведении 1/5, т.е. при максимальной концентрации из использованных в работе. Можно предположить, что в этом случае из-за большего размера частиц эндоцитоз происходит медленнее и при исходно высокой концентрации частиц к 72 часам инкубации их остается еще достаточно много в среде культивирования). Поэтому рост клеточной культуры восстанавливается до контрольного уровня (исключая вариант СГ-М 1/5), хотя митохондриальная активность продолжает оставаться сниженной. При этом важно заметить, что факторы роста, возможно привнесенные в среду культивирования со СГ, не приводят к стимуляции опухолевого роста выше контрольных значений. Более того, в близкие сроки после начала инкубации со СГ индекс пролиферации снижается.

В целом, данные по относительному и абсолютному количеству ОСК (клеток SP) свидетельствуют об одинаковом ответе стволовых и не стволовых клеток на воздействие СГ в разных режимах. Как и в случае общего количества клеток, абсолютное количество клеток SP кратковременно снижается после 48 часовой

инкубации со СГ, но к 72 ч восстанавливается до контрольного уровня при всех экспериментальных воздействиях за исключением варианта СГ-М 1/5. Последний продемонстрировал сниженное количество ОСК (SP) и через 48, и через 72 ч после добавления в культуральную среду. Важно, что эти данные подтверждаются и с помощью другого метода идентификации ОСК (по экспрессии поверхностного маркера CD133). Среди возможных причин уменьшения количества ОСК следует указать индукцию клеточной гибели (что маловероятно, учитывая отсутствие цитотоксического действия СГ на общую популяцию опухолевых клеток), переход в состояние пролиферативного покоя (что более вероятно) и ускоренную дифференцировку ОСК в не стволовые клетки (под влиянием биоактивных компонентов, находящихся в составе СГ) и способных поддерживать дифференцировку, например, мезенхимальных стромальных клеток [29].

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии стимулирующего действия коллагенсодержащего СГ на ОСК в использованных экспериментальных условиях *in vitro*, как это показано для нативного коллагена [17–22]. Можно предположить, что этот факт является следствием ультрадиспергирования и радиационного воздействия на коллаген при изготовлении исследуемого медицинского изделия.

Данное исследование выполнено с использованием ВПЧ18-позитивной клеточной линии HeLa *in vitro* и является первым этапом оценки безопасности применения СГ. Представляет интерес изучение эффектов действия СГ на ВПЧ16-позитивные линии РШМ. Кроме того, для выяснения возможности практического использования СГ в лечении лучевых осложнений у онкологических больных необходимы дальнейшие доклинические исследования *in vivo* и клинические исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе показано отсутствие стимулирующего действия СГ-М и СГ-L как на общую массу опухолевых клеток линии HeLa, так и на субпопуляцию ОСК в условиях *in vitro*. Более того, при использовании СГ-М в разведении 1/5 (наименьшем из изученных разведений) зарегистрировано уменьшение общего числа опухолевых клеток в течение всего периода наблюдения (до 72 ч после начала инкубации), которое сопровождалось параллельным снижением жизнеспособности клеток и уменьшением пролиферативной активности в первое время после начала воздействия. Отмечена тенденция к уменьшению абсолютного количества ОСК, выявляемых независимо методами иммунофенотипирования и SP после 72-часовой инкубации со СГ-М 1/5. Полученные данные показывают перспективность дальнейшего проведения доклинических и клинических исследований по применению СГ для лечения атрофических и/или лучевых изменений слизистой влагалища после радикальной противоопухолевой терапии ЗНО органов малого таза, в том числе РШМ.

Список источников

1. Salvante ERG, Popoiu AV, Saxena AK, Popoiu TA, Boia ES, Cimpean AM, Rus FS, Dorobantu FR, Chis M. Glycosaminoglycans Modulate the Angiogenic Ability of Type I Collagen-Based Scaffolds by Acting on Vascular Network Remodeling and Maturation. Bioengineering (Basel). 2024 Apr 25;11(5):423. https://doi.org/10.3390/bioengineering11050423
2. Jadach B, Mielcarek Z, Osmałek T. Use of Collagen in Cosmetic Products. Curr Issues Mol Biol. 2024 Mar 4;46(3):2043–2070. https://doi.org/10.3390/cimb46030132
3. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. Adv Mater. 2019 Jan;31(1):e1801651. https://doi.org/10.1002/adma.201801651
4. Shekhter AB, Fayzullin AL, Vukolova MN, Rudenko TG, Osipycheva VD, Litvitsky PF. Medical Applications of Collagen and Collagen-Based Materials. Curr Med Chem. 2019;26(3):506–516. https://doi.org/10.2174/0929867325666171205170339
5. Балан В. Е., Краснопольская К. В., Оразов М. Р., Токтар Л. Р., Тихомирова Е. В. Коллагенотерапия пациенток с генитоуринарным менопаузальным синдромом – новая возможность в арсенале врача. Российский вестник акушера-гинеколога. 2020;20(4):65–75. https://doi.org/10.17116/rosakush20202004165
6. Tramacere F, Lancellotta V, Casà C, Fionda B, Cornacchione P, Mazzarella C, et al. Assessment of Sexual Dysfunction in Cervical Cancer Patients after Different Treatment Modality: A Systematic Review. Medicina (Kaunas). 2022 Sep 5;58(9):1223. https://doi.org/10.3390/medicina58091223
7. Мкртчян Л. С. Химиолучевое лечение местнораспространенного рака шейки матки и факторы прогноза. Дисс. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск, 2020, с. 33-34. Доступно по: https://www.dissercat.com/content/khimioluchevoe-lechenie-mestnorasprostranennogo-raka-sheiki-matki-i-faktory-prognoza. Дата обращения: 21.08.2024.

8. Shagidulin M, Onishchenko N, Sevastianov V, Krasheninnikov M, Lyundup A, Nikolskaya A, et al. Experimental Correction and Treatment of Chronic Liver Failure Using Implantable Cell-Engineering Constructs of the Auxiliary Liver Based on a Bioactive Heterogeneous Biopolymer Hydrogel. Gels. 2023 Jun 1;9(6):456. https://doi.org/10.3390/gels9060456
9. Матчук О. Н., Замулаева И. А. Количественные изменения популяции стволовых клеток рака шейки матки линии HeLa под влиянием фракционированного γ-облучения *in vitro*. Радиация и риск. 2019;28(2):112–123. https://doi.org/10.21870/0131-3878-2019-28-2-112-123
10. Nunes T, Hamdan D, Leboeuf C, El Bouchtaoui M, Gapihan G, Nguyen TT, et al. Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. Int J Mol Sci. 2018 Dec 13;19(12):4036. https://doi.org/10.3390/ijms19124036
11. Peitzsch C, Kurth I, Ebert N, Dubrovska A, Baumann M. Cancer stem cells in radiation response: current views and future perspectives in radiation oncology. Int J Radiat Biol. 2019 Jul;95(7):900–911. https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589023
12. Phi LTH, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, et al. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. Stem Cells Int. 2018 Feb 28;2018:5416923. https://doi.org/10.1155/2018/5416923
13. Zamulaeva I, Matchuk O, Selivanova E, Mkrtchian L, Yakimova A, Gusarova V, et al. Effects of Fractionated Radiation Exposure on Vimentin Expression in Cervical Cancers: Analysis of Association with Cancer Stem Cell Response and Short-Term Prognosis. Int J Mol Sci. 2023 Feb 7;24(4):3271. https://doi.org/10.3390/ijms24043271
14. Luo M, Clouthier SG, Deol Y, Liu S, Nagrath S, Azizi E, Wicha MS. Breast cancer stem cells: current advances and clinical implications. Methods Mol Biol. 2015;1293:1–49. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2519-3_1
15. Lytle NK, Barber AG, Reya T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. Nat Rev Cancer. 2018 Nov;18(11):669–680. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0056-x
16. Yang F, Xu J, Tang L, Guan X. Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications. Cell Mol Life Sci. 2017 Mar;74(6):951–966. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2334-7
17. Moon S, Ok Y, Hwang S, Lim YS, Kim HY, Na YJ, Yoon S. A Marine Collagen-Based Biomimetic Hydrogel Recapitulates Cancer Stem Cell Niche and Enhances Progression and Chemoresistance in Human Ovarian Cancer. Mar Drugs. 2020 Sep 29;18(10):498. https://doi.org/10.3390/md18100498
18. Cescon M, Rampazzo E, Bresolin S, Da Ros F, Manfreda L, Cani Aet al. Collagen VI sustains cell stemness and chemotherapy resistance in glioblastoma. Cell Mol Life Sci. 2023 Jul 28;80(8):233. https://doi.org/10.1007/s00018-023-04887-5
19. Cowan JM, Juric M, Petrie RJ. Culturing and Imaging Glioma Stem Cells in 3D Collagen Matrices. Curr Protoc. 2023 Jan;3(1):e643. https://doi.org/10.1002/cpz1.643
20. Devarajan R, Izzi V, Peltoketo H, Rask G, Kauppila S, Väisänen MR, et al. Targeting collagen XVIII improves the efficiency of ErbB inhibitors in breast cancer models. J Clin Invest. 2023 Sep 15;133(18):e159181. https://doi.org/10.1172/jci159181
21. Morimoto T, Takemura Y, Miura T, Yamamoto T, Kakizaki F, An H, et al. Novel and efficient method for culturing patient-derived gastric cancer stem cells. Cancer Sci. 2023 Aug;114(8):3259–3269. https://doi.org/10.1111/cas.15840
22. Abuwatfa WH, Pitt WG, Husseini GA. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. J Biomed Sci. 2024 Jan 14;31(1):7. https://doi.org/10.1186/s12929-024-00994-y
23. Jalil SMA, Henry JC, Cameron AJM. Targets in the Tumour Matrisome to Promote Cancer Therapy Response. Cancers (Basel). 2024 May 11;16(10):1847. https://doi.org/10.3390/cancers16101847
24. Пономарева А. С., Баранова Н. В., Милосердов И. А., Севастьянов В. И. Влияние биоматриксов на жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию островков Лангерганса человека *in vitro*. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2022;24(4):109–117. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2022-4-109-117
25. Севастьянов В. И. Клеточно-инженерные конструкции в тканевой инженерии и регенеративной медицине. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2015;17(2):127–130. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2015-2-127-130
26. Chhabra R. Cervical cancer stem cells: opportunities and challenges. J Cancer Res Clin Oncol. 2015 Nov;141(11):1889–1897. https://doi.org/10.1007/s00432-014-1905-y
27. Di Fiore R, Suleiman S, Drago-Ferrante R, Subbannayya Y, Pentimalli F, Giordano A, et al. Cancer Stem Cells and Their Possible Implications in Cervical Cancer: A Short Review. Int J Mol Sci. 2022 May 5;23(9):5167. https://doi.org/10.3390/ijms23095167
28. Javed S, Sharma BK, Sood S, Sharma S, Bagga R, Bhattacharyya S, et al. Significance of CD133 positive cells in four novel HPV-16 positive cervical cancer-derived cell lines and biopsies of invasive cervical cancer. BMC Cancer. 2018 Apr 2;18(1):357. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4237-5
29. Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Кирсанова Л.А., Кириллова А.Д., Суббот А.М., Цветкова А.В., и др. Сравнительное исследование хондрогенеза мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека при культивировании на коллагенсодержащих носителях в условиях *in vitro*. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2021;23(3):90–100. https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-3-90-100

References

1. Salvante ERG, Popoiu AV, Saxena AK, Popoiu TA, Boia ES, Cimpean AM, Rus FS, Dorobantu FR, Chis M. Glycosaminoglycans Modulate the Angiogenic Ability of Type I Collagen-Based Scaffolds by Acting on Vascular Network Remodeling and Maturation. Bioengineering (Basel). 2024 Apr 25;11(5):423. https://doi.org/10.3390/bioengineering11050423
2. Jadach B, Mielcarek Z, Osmałek T. Use of Collagen in Cosmetic Products. Curr Issues Mol Biol. 2024 Mar 4;46(3):2043–2070. https://doi.org/10.3390/cimb46030132
3. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. Adv Mater. 2019 Jan;31(1):e1801651. https://doi.org/10.1002/adma.201801651
4. Shekhter AB, Fayzullin AL, Vukolova MN, Rudenko TG, Osipycheva VD, Litvitsky PF. Medical Applications of Collagen and Collagen-Based Materials. Curr Med Chem. 2019;26(3):506–516. https://doi.org/10.2174/0929867325666171205170339
5. Balan VE, Krasnopolskaya KV, Orazov MR, Toktar LR, Tikhomirova EV. Collagenotherapy for patients with genitourinary menopausal syndrome is a new opportunity in the doctor's arsenal. Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist. 2020;20(4):65–75. (In Russ). https://doi.org/10.17116/rosakush20202004165
6. Tramacere F, Lancellotta V, Casà C, Fionda B, Cornacchione P, Mazzarella C, et al. Assessment of Sexual Dysfunction in Cervical Cancer Patients after Different Treatment Modality: A Systematic Review. Medicina (Kaunas). 2022 Sep 5;58(9):1223. https://doi.org/10.3390/medicina58091223
7. Mkrtchyan LS. Chemoradiation treatment of locally advanced cervical cancer and prognostic factors. Diss. A. Tsyb Medical Research Center – Branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, 2020, pp. 33-34. (In Russ). Available at: https://www.dissercat.com/content/khimioluchevoe-lechenie-mestnoraspros-tranennogo-raka-sheiki-matki-i-faktory-prognoza. Accessed: 21.08.2024.
8. Shagidulin M, Onishchenko N, Sevastianov V, Krasheninnikov M, Lyundup A, Nikolskaya A, et al. Experimental Correction and Treatment of Chronic Liver Failure Using Implantable Cell-Engineering Constructs of the Auxiliary Liver Based on a Bioactive Heterogeneous Biopolymer Hydrogel. Gels. 2023 Jun 1;9(6):456. https://doi.org/10.3390/gels9060456
9. Matchuk ON, Zamulaeva IA. Quantitative changes in the stem cell population of cervical cancer cell line HeLa under the influence of fractionated γ-irradiation *in vitro*. Radiation and Risk. 2019;28(2):112–123. (In Russ). https://doi.org/10.21870/0131-3878-2019-28-2-112-123
10. Nunes T, Hamdan D, Leboeuf C, El Bouchtaoui M, Gapihan G, Nguyen TT, et al. Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. Int J Mol Sci. 2018 Dec 13;19(12):4036. https://doi.org/10.3390/ijms19124036
11. Peitzsch C, Kurth I, Ebert N, Dubrovska A, Baumann M. Cancer stem cells in radiation response: current views and future perspectives in radiation oncology. Int J Radiat Biol. 2019 Jul;95(7):900–911. https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589023
12. Phi LTH, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, et al. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. Stem Cells Int. 2018 Feb 28;2018:5416923. https://doi.org/10.1155/2018/5416923
13. Zamulaeva I, Matchuk O, Selivanova E, Mkrtchian L, Yakimova A, Gusarova V, et al. Effects of Fractionated Radiation Exposure on Vimentin Expression in Cervical Cancers: Analysis of Association with Cancer Stem Cell Response and Short-Term Prognosis. Int J Mol Sci. 2023 Feb 7;24(4):3271. https://doi.org/10.3390/ijms24043271
14. Luo M, Clouthier SG, Deol Y, Liu S, Nagrath S, Azizi E, Wicha MS. Breast cancer stem cells: current advances and clinical implications. Methods Mol Biol. 2015;1293:1–49. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2519-3_1
15. Lytle NK, Barber AG, Reya T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. Nat Rev Cancer. 2018 Nov;18(11):669–680. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0056-x
16. Yang F, Xu J, Tang L, Guan X. Breast cancer stem cell: the roles and therapeutic implications. Cell Mol Life Sci. 2017 Mar;74(6):951–966. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2334-7
17. Moon S, Ok Y, Hwang S, Lim YS, Kim HY, Na YJ, Yoon S. A Marine Collagen-Based Biomimetic Hydrogel Recapitulates Cancer Stem Cell Niche and Enhances Progression and Chemoresistance in Human Ovarian Cancer. Mar Drugs. 2020 Sep 29;18(10):498. https://doi.org/10.3390/md18100498
18. Cescon M, Rampazzo E, Bresolin S, Da Ros F, Manfreda L, Cani Aet al. Collagen VI sustains cell stemness and chemotherapy resistance in glioblastoma. Cell Mol Life Sci. 2023 Jul 28;80(8):233. https://doi.org/10.1007/s00018-023-04887-5
19. Cowan JM, Juric M, Petrie RJ. Culturing and Imaging Glioma Stem Cells in 3D Collagen Matrices. Curr Protoc. 2023 Jan;3(1):e643. https://doi.org/10.1002/cpz1.643
20. Devarajan R, Izzi V, Peltoketo H, Rask G, Kauppila S, Väisänen MR, et al. Targeting collagen XVIII improves the efficiency of ErbB inhibitors in breast cancer models. J Clin Invest. 2023 Sep 15;133(18):e159181. https://doi.org/10.1172/jci159181
21. Morimoto T, Takemura Y, Miura T, Yamamoto T, Kakizaki F, An H, et al. Novel and efficient method for culturing patient-derived gastric cancer stem cells. Cancer Sci. 2023 Aug;114(8):3259–3269. https://doi.org/10.1111/cas.15840

22. Abuwatfa WH, Pitt WG, Husseini GA. Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. J Biomed Sci. 2024 Jan 14;31(1):7. https://doi.org/10.1186/s12929-024-00994-y
23. Jalil SMA, Henry JC, Cameron AJM. Targets in the Tumour Matrisome to Promote Cancer Therapy Response. Cancers (Basel). 2024 May 11;16(10):1847. https://doi.org/10.3390/cancers16101847
24. Ponomareva AS, Baranova NV, Miloserdov IA, Sevastianov VI. *In vitro* effect of bioscaffolds on viability and insulin-producing function of human islets of Langerhans. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2022;24(4):109–117. (In Russ). https://doi.org/10.15825/1995-1191-2022-4-109-117
25. Sevastianov VI. Cell-engineered constructs in tissue engineering and regenerative medicine. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2015;17(2):127–130. (In Russ). https://doi.org/10.15825/1995-1191-2015-2-127-130
26. Chhabra R. Cervical cancer stem cells: opportunities and challenges. J Cancer Res Clin Oncol. 2015 Nov;141(11):1889–1897. https://doi.org/10.1007/s00432-014-1905-y
27. Di Fiore R, Suleiman S, Drago-Ferrante R, Subbannayya Y, Pentimalli F, Giordano A, et al. Cancer Stem Cells and Their Possible Implications in Cervical Cancer: A Short Review. Int J Mol Sci. 2022 May 5;23(9):5167. https://doi.org/10.3390/ijms23095167
28. Javed S, Sharma BK, Sood S, Sharma S, Bagga R, Bhattacharyya S, et al. Significance of CD133 positive cells in four novel HPV-16 positive cervical cancer-derived cell lines and biopsies of invasive cervical cancer. BMC Cancer. 2018 Apr 2;18(1):357. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4237-5
29. Basok YB, Grigoriev AM, Kirsanova LA, Kirillova AD, Subbot AM, Tsvetkova AV, et al. Comparative study of chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells when cultured in collagen-containing media under *in vitro* conditions. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2021;23(3):90–100. (In Russ). https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-3-90-100

Информация об авторах:

Замулаева Ирина Александровна ✉ – д.б.н., профессор, заведующая отделом радиационной биохимии Медицинского радиологического научного центра им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ«Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Российская Федерация
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6136-8445, SPIN: 9542-6211, AuthorID: 87777, Scopus Author ID: 6603693422, Web of Science ResearcherID: R-4906-2016

Матчук Ольга Николаевна – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории радиационной биохимии Медицинского радиологического научного центра им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Российская Федерация
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8644-6657, SPIN: 2833-9585, AuthorID: 681255, Scopus Author ID: 55370537000 Web of Science ResearcherID: E-8187-2014

Мкртчян Лиана Сирекановна – д.м.н., ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего отделом медицинской реабилитации и восстановительных технологий Медицинского радиологического научного центра им. А. Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Российская Федерация
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5027-5331, SPIN: 3352-0814, AuthorID: 147713, Scopus Author ID: 6601999343, Web of Science ResearcherID: JBJ-0493-2023

Каприн Андрей Дмитриевич – д.м.н., профессор, академик РАН, академик РАО, директор Московского научно-исследовательского онкологического института им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Российская Федерация; генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Обнинск, Российская Федерация; заведующий кафедрой онкологии и рентгенорадиологии им. В. П. Харченко Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», г. Москва, Российская Федерация
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8784-8415, SPIN: 1759-8101, AuthorID: 96775, Scopus Author ID: 6602709853, Web of Science ResearcherID: K-1445-2014

Information about authors:

Irina A. Zamulaeva ✉ – Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of the Department of Radiational Biochemistry, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-6136-8445, SPIN: 9542-6211, AuthorID: 87777, Scopus Author ID: 6603693422, Web of Science ResearcherID: R-4906-2016

Olga N. Matchuk – Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher at the Laboratory of Radiational Biochemistry, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8644-6657, SPIN: 2833-9585, AuthorID: 681255, Scopus Author ID: 55370537000, Web of Science ResearcherID: E-8187-2014

Liana S. Mkrtchian – Dr. Sci. (Medicine), Leading Researcher, Acting Head of the Department of Medical Rehabilitation and Rehabilitation Technologies, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation
ORCID: https://orcid.org/0000-0002-5027-5331, SPIN: 3352-0814, AuthorID: 147713, Scopus Author ID: 6601999343, Web of Science ResearcherID: JBJ-0493-2023

Andrey D. Kaprin – Dr. Sci. (Medicine), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Academician of the Russian Academy of Education, Director of P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; General Director of National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russian Federation; Head of the Department of Oncology and Radiology named after V. P. Kharchenko at the Medical Institute. V. P. Kharchenko Medical Institute of Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8784-8415, SPIN: 1759-8101, AuthorID: 96775, Scopus Author ID: 6602709853, Web of Science ResearcherID: K-1445-2014

Участие авторов:

Замулаева И. А. – научное руководство, концепция исследования, написание исходного текста, итоговые выводы;
Матчук О. Н. – культивирование клеток, выполнение экспериментов, проточная цитометрия, МТТ-тест, статистическая обработка данных;
Мкртчян Л. С. – научная обработка литературных данных по клиническим аспектам проблемы, доработка текста;
Каприн А. Д. – организация и контроль за выполнением исследования.
Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку статьи и утвердили окончательный вариант, одобренный к публикации.

Contribution of the authors:

Zamulaeva I. A. – scientific guidance, research concept, writing of the source text, final conclusions;
Matchuk O. N. – cell cultivation, conducting the experiments, flow cytometry, MTT assay, statistical data processing;
Mkrtchian L. S. – scientific processing of literature sources on clinical aspects of the problem, revision of the text;
Kaprin A. D. – organization and control over the execution of the study.
All authors made equivalent contributions to the preparation of the article and approved the final version for publication.