

Научная статья

УДК 616-006

doi: 10.17223/19988591/69/14

Получение гетероклеточных сфероидов для моделирования метастазов в печени

Ксения Владимировна Невская¹, Лина Викторовна Ефимова²,
Полина Константиновна Козлова³, Александра Геннадьевна Першина⁴,
Елена Владимировна Удуг⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия,

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>, nevskayaksenia@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0002-7168-1419>, efimova.lina@gmail.com

³ kozlovapolina13@mail.ru

⁴ <http://orcid.org/0000-0001-7604-9722>, allysyzy@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-6104-4782>, udut.ev@ssmu.ru

Аннотация. Моделирование процессов, происходящих на различных этапах метастазирования раковой опухоли, является крайне перспективным направлением в современной медицине и может быть использовано для разработки эффективных противоопухолевых (антиметастатических) препаратов. Одним из ключевых этапов метастатического каскада является дедифференцировка опухолевых клеток в метастатической нише и их последующая пролиферация, приводящая к формированию вторичного опухолевого узла. Целью данного исследования являлось моделирование этапа дедифференцировки опухолевых клеток рака молочной железы в гетероклеточных сфероидах, состоящих из клеток печени человека линии HepG2, иммортализованных фибробластов BJ-5ta, M0-макрофагов. Показано, что под действием интерлейкина 6 CD44⁺ дифференцированные опухолевые клетки линии рака молочной железы человека T47D, экспрессирующей красный флуоресцентный белок RFP, в составе гетеросфероидов печени начинают активно пролиферировать. Это свидетельствует о процессе их дедифференцировки и начале формирования вторичного опухолевого узла. Жизнеспособность клеток в составе гетеросфероида подтверждали с использованием витального красителя Calcein AM. Таким образом, нами предложена модель метастаза рака молочной железы в печень на основе гетероклеточных сфероидов, предназначенная для повышения эффективности скрининга противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: онкология, метастазы, сфероиды, печень, рак молочной железы, интерлейкин 6

Для цитирования: Невская К.В., Ефимова Л.В., Козлова П.К., Першина А.Г., Удуг Е.В. Получение гетероклеточных сфероидов для моделирования метастазов в печени // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 122–129. doi: 10.17223/19988591/69/14

Heterocellular spheroids as a model of liver metastasis

Kseniya V. Nevskaya¹, Lina V. Efimova², Polina K. Kozlova³,
Alexandra G. Pershina⁴, Elena V. Udut⁵

^{1, 2, 3, 4, 5} *Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>, nevskayaksenia@gmail.com

² <https://orcid.org/0000-0002-7168-1419>, efimova.lina@gmail.com

³ kozlovapolina13@mail.ru

⁴ <http://orcid.org/0000-0001-7604-9722>, allysyz@mail.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-6104-4782>, udut.ev@ssmu.ru

Summary. Modeling the processes occurring at various stages of cancer tumor metastasis is the basis for developing effective antimetastatic drugs. One of the most promising targets for antimetastatic therapy are single tumor cells in a dormant state in the liver, lungs, bones and/or other organs of patients - micrometastases. At the time of diagnosis of a malignant neoplasm, almost all patients already have multiple micrometastases. Under certain conditions, a single dormant tumor cell transitions into a stem-like cell, and the growth of a secondary tumor node - macrometastasis - begins. The aim of this work was to model the transition of breast cancer micrometastasis into macrometastasis in heterocellular spheroids consisting of human liver cells, fibroblasts, and M0 macrophages. To model dormant tumor cells using the fluorescence-activated sorting method, a population of CD44-differentiated cells of the genetically modified T47D cell line expressing the red fluorescent protein RFP (T47D_Red) was isolated. To obtain liver heterospheroids, human hepatoma cells of the HepG2 line, immortalized human fibroblasts of the BJ-5ta line, M0 macrophages obtained from monocytes of the peripheral blood of healthy donors, and CD44 cells of the human breast cancer line T47D_Red were mixed in a ratio of 15:1:1:1 in a DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine, and an antibiotic-antimycotic (*Fig. 1a-e*). IL6 was added to the medium to induce dedifferentiation of cancer cells within the heterospheroid. This resulted in the proliferation of single breast cancer cells and the formation of secondary tumor foci in the heterospheroid structure (*Fig. 1g-j*) by the 5th day of cultivation. It is important to note that the cells in the heterospheroid retained their viability for 7 days of cultivation (*Fig. 1f, k*). Thus, a model for the formation of breast cancer metastasis in the liver has been proposed. The advantage of the model is the ability to take into account intercellular interactions due to the inclusion of several cell types, which increases the efficiency of in vitro testing of promising antimetastatic, including immunotherapeutic and gene therapeutic, drugs using the proposed model.

The article contains 1 Figure, 11 References.

Keywords: oncology, metastasis, spheroids, liver, breast cancer, interleukin 6

For citation: Nevskaya KV, Efimova LV, Kozlova PK, Pershina AG, Udut EV. Heterocellular spheroids as a model of liver metastasis. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69: 122-129. doi: 10.17223/19988591/69/14

Введение

Моделирование процессов, происходящих на различных этапах метастатического каскада, является важной исследовательской задачей, решение которой необходимо как для изучения механизмов метастазирования, так и

для разработки новых эффективных противоопухолевых (антиметастатических) лекарств. Одной из наиболее перспективных мишеней для антиметастатической терапии являются единичные опухолевые клетки, находящиеся в dormantном состоянии в печени, легких, костях и/или других органах пациентов, – микрометастазы [1]. На момент постановки диагноза злокачественного новообразования практически у всех пациентов уже есть множественные микрометастазы [2]. При определенных условиях происходит переход единичной опухолевой клетки, находящейся в dormantном состоянии, в клетку, подобную стволовой, и начинается рост вторичного опухолевого узла – макрометастаза. Целью данной работы являлось моделирование перехода микрометастаза рака молочной железы в макрометастаз в гетероклеточных сфероидсах, состоящих из клеток печени человека, фибробластов, M0-макрофагов. Преимуществом разрабатываемой модели, включающей несколько типов клеток, является возможность учитывать межклеточные взаимодействия, что позволит повысить эффективность *in vitro* тестирования противоопухолевых иммунотерапевтических и генотерапевтических препаратов.

Материалы и методы

Для моделирования dormantных опухолевых клеток методом флуоресцентно-активированного сортинга выделяли популяцию CD44⁺ дифференцированных клеток генетически-модифицированной клеточной линии T47D, экспрессирующей красный флуоресцентный белок RFP (T47D_Red). Для получения гетеросфероидов печени использовали клетки гепатомы человека линии HepG2, иммортализованные фибробласты человека линии BJ-5ta, M0-макрофаги, дифференцированные из моноцитов периферической крови здоровых доноров, и CD44⁺ клетки линии рака молочной железы человека T47D_Red. Суспензию смеси клеток рассаживали в 81-луночные формы, предварительно изготовленные из 2%-ной агарозы с использованием силиконовых форм «MicroTissues Inc.» (США). Для индукции дедифференцировки опухолевых клеток в часть лунок добавляли интерлейкин 6 (IL6) в конечной концентрации 50 нг/мл. Для оценки динамики пролиферации опухолевых клеток T47D_Red на 1, 2, 3, 5 и 7-е сутки гетеросфероиды анализировали с использованием сканирующего флуоресцентного микроскопа Leica DMI8 (Германия). Жизнеспособность клеток в составе гетеросфероидов подтверждали на 7-е сутки культивирования путем окрашивания витальным красителем Calcein AM.

Результаты исследования и обсуждение

Использование суспензии клеток HepG2, BJ-5ta, M0-макрофагов, T47D_Red, смешанных в соотношении 15:1:1:1 в среде DMEM/F12 с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин, антибиотика-антимикотика, приводило к формированию гетеросфероидов, содержащих единичные опухолевые клетки (рис. 1, а–е). Структура гетеросфероидов уплотнялась к 5-м суткам культивирования, и они приобретали

более четкие и ровные края. При добавлении IL6 с увеличением продолжительности инкубации наблюдали увеличение количества клеток рака молочной железы в составе гетеросфероидов, что свидетельствовало о дедифференцировке CD44⁺ клеток T47D_Red под действием цитокина-индуктора и их пролиферации с образованием вторичных опухолевых очагов (рис. 1, g–j) к 5-м суткам культивирования. Последующая оценка площади данных очагов может быть использована для сравнительного анализа эффективности противометастатических препаратов. Важно отметить, что клетки в составе гетеросфероидов сохраняли свою жизнеспособность в течение 7 суток культивирования (рис. 1, f, k).

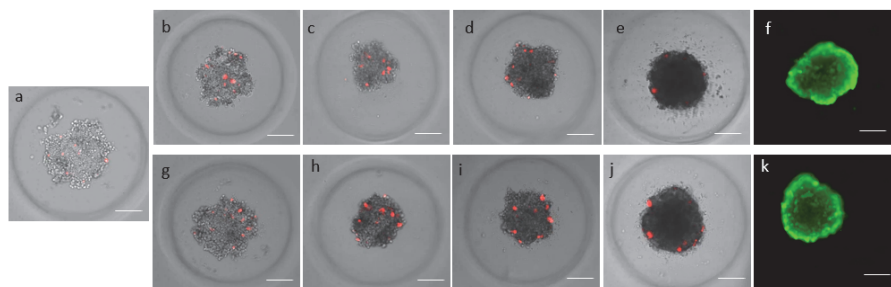


Рис. 1. Пролиферативная активность опухолевых клеток линии T47D_Red в составе гетеросфероидов печени: *a* – гетеросфероид через 1 ч инкубации, *b, c, d, e* – гетеросфероид через 24, 48, 72, 120 часов инкубации соответственно, *g, h, i, j* – гетеросфероид при добавлении IL6 через 24, 48, 72, 120 часов инкубации соответственно, *f* – жизнеспособность клеток, входящих в состав гетеросфероидов на 7-е сутки культивирования без и *k* – при добавлении IL6 (окраска Calcein AM).

Масштабная линейка: 100 мкм

[Fig. 1. Proliferation of T47D_Red cells in liver heterospheroid. *a* - 1h of incubation, *b, c, d, e* - 24, 48, 72, 120h of incubation respectively, *g, h, i, j* - 24, 48, 72, 120h of incubation with IL6 respectively, *f* - the cells viability in heterospheroid without and with IL6 at 7th day of incubation (Calcein AM staining). Scale bar: 100 μ m]

Печень является наиболее распространенным местом метастазирования рака. Так, метастазы рака молочной железы в печень встречаются у 50–70% пациентов, у которых диагностирован вторичный рак молочной железы. Тем не менее существующие модели, воспроизводящие микроокружение печени и колонизации раковыми клетками, крайне ограничены [3]. В литературе описано несколько гетероклеточных 3D-моделей метастазов, например в кости [4, 5]. В этих работах клетки костной ткани и раковые клетки смешивали в различных соотношениях (1:1 или 9:1), что обусловлено, с одной стороны, необходимостью сформировать опухолевый узел достаточных размеров, а с другой – избежать избыточной пролиферации опухолевых клеток и образования зоны гипоксии. В статье Skardal et al. описана модель метастаза рака толстой кишки в печень, в данной работе для формирования органоида использовали всего два типа клеток: клетки HepG2 и клетки рака толстой кишки HCT-116, смешивая их в соотношении 10:1 [6]. Задачей настоящего исследования являлось создание модели самого раннего этапа

формирования вторичного опухолевого узла, а именно перехода dormantной опухолевой клетки в активно пролиферирующую. В связи с этим долю клеток рака молочной железы в составе гетеросфероида значительно уменьшили (17:1). Модель такого типа высоко востребована для тестирования препаратов, направленных на этап метастатического каскада, ассоциированный с dormantностью опухолевых клеток, и вызывающих, например, ингибирование аутофагии при нахождении клеток в dormantном состоянии, пролонгацию dormantного состояния [7] или блокирование дедифференцировки [8]. Преимущество использования гетероклеточных систем для тестирования подобного рода лекарственных препаратов заключается в том, что позволяет оценивать эффективность терапии с учетом влияния клеток микроокружения, включая фибробласты и иммунные клетки (особенно макрофаги) [9, 10]. Эти клетки характеризуются переменчивым фенотипом (т.е. способны быть перепрограммированы) и секретируют широкий спектр регуляторных молекул, которые имеют решающее значение для прогрессирования рака. Существующие простые модели опухолевых сфероидов [11] не позволяют учитывать вклад межклеточных взаимодействий.

Заключение

Таким образом, нами предложена модель микрометастазов рака молочной железы в печень на основе гетероклеточных сфероидов, которая предназначена для повышения эффективности скрининга противоопухолевых (антиметастатических), в том числе иммунных и генотерапевтических препаратов, за счет более точного воспроизведения микроокружения раковой клетки. Дальнейшие исследования позволят оценить релевантность полученной модели на основании анализа метаболомного и экспрессионного профиля органоида.

Список источников

1. Litviakov N., Ibragimova M., Tsyganov M., Kazantseva P., Deryusheva I., Pevzner A., Doroshenko A., Garbukov E., Tarabanovskaya N., Slonimskaya E.. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis // *Oncotarget*. 2020. Vol. 11, № 21, PP. 1988–2001. doi: 10.18632/oncotarget.27608
2. Ramamoorthi G., Kodumudi K., Gallen C., Zachariah N.N., Basu A., Albert G., Beyer A., Snyder C., Wiener D., Costa R.L.B., Czerniecki B.J. Disseminated cancer cells in breast cancer: Mechanism of dissemination and dormancy and emerging insights on therapeutic opportunities // *Seminars in cancer biology*. 2022. Vol. 78. PP. 78–89. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.02.004
3. Nuckhir M., Withey D., Cabral S., Harrison H., Clarke R.B. State of the Art Modelling of the Breast Cancer Metastatic Microenvironment: Where Are We? // *J. Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2024. Vol. 29, № 1. 14. doi: 10.1007/s10911-024-09567-z
4. Suurmond C.E., Leeuwenburgh S.C.G., van den Beucken J.J.J.P. Modelling bone metastasis in spheroids to study cancer progression and screen cisplatin efficacy // *Cell Prolif*. 2024. Vol. 57, № 9. e13693. doi: 10.1111/cpr.13693
5. Kumar V., Naqvi S.M., Verbruggen A., McEvoy E., McNamara L.M. A mechanobiological model of bone metastasis reveals that mechanical stimulation inhibits the pro-osteolytic effects of breast cancer cells // *Cell Rep*. 2024. Vol. 43, № 5. 114043. doi: 10.1016/j.celrep.2024.114043

6. Skardal A., Devarasetty M., Rodman C., Atala A., Soker S. Liver-Tumor Hybrid Organoids for Modeling Tumor Growth and Drug Response In Vitro // *Ann Biomed Eng.* 2015. Vol. 43, № 10. PP. 2361–2373. doi: 10.1007/s10439-015-1298-3
7. Ren D., Dai Y., Yang Q., Zhang X., Guo W., Ye L., Huang S., Chen X., Lai Y., Du H., Lin C., Peng X., Song L. Wnt5a induces and maintains prostate cancer cells dormancy in bone // *J Exp Med.* 2019. Vol. 216, № 2. PP. 428–449. doi: 10.1084/jem.20180661
8. Nevskaya K.V., Pershina A.G., Hmelevskaya E.S., Efimova L.V., Ibragimova M.K., Dolgasheva D.S., Tsydenova I.A., Ufandeev A.A., Buyko E.E., Perina E.A., Gaptulbarova K.A., Kravtsova E.A., Krivoshchekov S.V., Ivanov V.V., Guriev A.M., Udut E.V., Litviakov N.V. Prevention of Metastasis by Suppression of Stemness Genes Using a Combination of microRNAs // *J. Med Chem.* 2024. Vol. 67, № 7. PP. 5591–5602. doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c02199
9. Rodrigues J., Heinrich M.A., Teixeira L.M., Prakash J. 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions // *Trends Cancer.* 2021. Vol. 7, № 3. PP. 249–264. doi: 10.1016/j.trecan.2020.10.009
10. Yakavets I., Francois A., Benoit A., Merlin J.L., Bezdetnaya L., Vogin G. Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study // *Sci Rep.* 2020. Vol. 10. 21273. doi: 10.1038/s41598-020-78087-7
11. Xie G., Yao Q., Liu Y., Du S., Liu A., Guo Z., Sun A., Ruan J., Chen L., Ye C., Yuan Y. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures // *Int J. Oncol.* 2012. Vol. 40, № 4. PP. 1171–1179. doi: 10.3892/ijo.2011.1275

References

1. Litviakov N, Ibragimova M, Tsyganov M, Kazantseva P, Deryusheva I, Pevzner A, Doroshenko A, Garbukov E, Tarabanovskaya N, Slonimskaya E. Amplifications of stemness genes and the capacity of breast tumors for metastasis. *Oncotarget.* 2020;11(21):1988-2001. doi: 10.18632/oncotarget.27608
2. Ramamoorthi G, Kodumudi K, Gallen C, Zachariah NN, Basu A, Albert G, Beyer A, Snyder C, Wiener D, Costa RLB, Czerniecki BJ. Disseminated cancer cells in breast cancer: Mechanism of dissemination and dormancy and emerging insights on therapeutic opportunities. *Seminars in cancer biology.* 2022;78:78-89. doi: 10.1016/j.semcancer.2021.02.004
3. Nuckhir M, Withey D., Cabral S., Harrison H, Clarke RB. State of the Art Modelling of the Breast Cancer Metastatic Microenvironment: Where Are We? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2024;29(1):14. doi: 10.1007/s10911-024-09567-z
4. Suurmond CE, Leeuwenburgh SCG, van den Beucken JJJP. Modelling bone metastasis in spheroids to study cancer progression and screen cisplatin efficacy. *Cell Prolif.* 2024;57(9):e13693. doi: 10.1111/cpr.13693
5. Kumar V, Naqvi SM, Verbruggen A, McEvoy E, McNamara LM. A mechanobiological model of bone metastasis reveals that mechanical stimulation inhibits the pro-osteolytic effects of breast cancer cells. *Cell Rep.* 2024;43(5):114043. doi: 10.1016/j.celrep.2024.114043
6. Skardal A, Devarasetty M, Rodman C, Atala A, Soker S. Liver-Tumor Hybrid Organoids for Modeling Tumor Growth and Drug Response In Vitro. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(10):2361-2373. doi: 10.1007/s10439-015-1298-3
7. Ren D, Dai Y, Yang Q, Zhang X, Guo W, Ye L, Huang S, Chen X, Lai Y, Du H, Lin C, Peng X, Song L. Wnt5a induces and maintains prostate cancer cells dormancy in bone. *J Exp Med.* 2019;216(2):428-449. doi: 10.1084/jem.20180661
8. Nevskaya KV, Pershina AG, Hmelevskaya ES, Efimova LV, Ibragimova MK, Dolgasheva DS, Tsydenova IA, Ufandeev AA, Buyko EE, Perina EA, Gaptulbarova KA, Kravtsova EA, Krivoshchekov SV, Ivanov VV, Guriev AM, Udut EV, Litviakov NV. Prevention of Metastasis by Suppression of Stemness Genes Using a Combination of microRNAs. *J Med Chem.* 2024;67(7):5591-5602. doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c02199

9. Rodrigues J, Heinrich MA, Teixeira LM, Prakash J. 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions. *Trends Cancer*. 2021;7(3):249-264. doi: 10.1016/j.trecan.2020.10.009
10. Yakavets I, Francois A, Benoit A, Merlin JL, Bezdetnaya L, Vogin G. Advanced co-culture 3D breast cancer model for investigation of fibrosis induced by external stimuli: optimization study. *Sci Rep*. 2020;10:21273. doi: 10.1038/s41598-020-78087-7
11. Xie G, Yao Q, Liu Y, Du S, Liu A, Guo Z, Sun A, Ruan J, Chen L, Ye C, Yuan Y. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol*. 2012;40(4):1171-1179. doi: 10.3892/ijo.2011.1275

Информация об авторах:

Невская Ксения Владимировна, канд. мед. наук, н.с. Центра биологических исследований и биоинженерии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

E-mail: Nevskayaksenia@gmail.com

Ефимова Лина Викторовна, м.н.с. Центра биологических исследований и биоинженерии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7168-1419>

E-mail: efimova.lina@gmail.com

Козлова Полина Константиновна, лаборант-исследователь Центра биологических исследований и биоинженерии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

E-mail: kozlovapolina13@mail.ru

Першина Александра Геннадьевна, канд. биол. наук, зав. Центром биологических исследований и биоинженерии Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7604-9722>

E-mail: allysyz@mail.ru

Удут Елена Владимировна, д-р мед. наук, профессор, зав. Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета (Томск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6104-4782>

E-mail: udut.ev@ssmu.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Kseniya V. Nevskaya, Cand.Sci. (Med.), researcher of the Center of Bioscience and Bioengineering, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1659-8812>

E-mail: nevskayaksenia@gmail.com

Lina V. Efimova, junior researcher of the Center of Bioscience and Bioengineering, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7168-1419>

E-mail: efimova.lina@gmail.com

Polina K. Kozlova, laboratory research assistant of the Center of Bioscience and Bioengineering, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).

E-mail: kozlovapolina13@mail.ru

Alexandra G. Pershina, Cand.Sci. (Biol.), head of the Center of Bioscience and Bioengineering, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7604-9722>

E-mail: allysyz@mail.ru

Elena V. Udut, Doc.Sci. (Med.), professor, head of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6104-4782>
E-mail: udut.ev@ssmu.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2024;
одобрена после рецензирования 05.11.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 25.08.2024;
approved after reviewing 05.11.2024; accepted for publication 03.03.2025.*