

DOI: 10.21294/1814-4861-2022-21-6-59-67

УДК: 618.19-006.6:577.2:571.27

Для цитирования: *Невская К.В., Ефимова Л.В., Корда П.В., Долгашева Д.С., Ибрагимова М.К., Меняйло М.Е., Удут Е.В., Литвяков Н.В., Першина А.Г.* Оптимизация метода исследования маммосферообразования для оценки IL-6 индуцированной стволовой пластичности дифференцированных клеток рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2022; 21(6): 59–67. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-6-59-67

For citation: *Nevskaya K.V., Efimova L.V., Korda P.V., Dolgasheva D.S., Ibragimova M.K., Menyailo M.E., Udut E.V., Litviakov N.V., Pershina A.G.* Optimization of mammosphere formation assay for quantification of IL6-induced stemness in differentiated breast cancer cells. Siberian Journal of Oncology. 2022; 21(6): 59–67. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-6-59-67

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ МАММОСФЕРООБРАЗОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ IL-6 ИНДУЦИРОВАННОЙ СТВОЛОВОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

К.В. Невская¹, Л.В. Ефимова¹, П.В. Корда¹, Д.С. Долгашева²,
М.К. Ибрагимова², М.Е. Меняйло², Е.В. Удут¹, Н.В. Литвяков^{1,2},
А.Г. Першина¹

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,
г. Томск, Россия¹

Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: nevskayaksenia@gmail.com¹

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия²

Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5²

Аннотация

Цель исследования – оптимизация метода оценки образования маммосфер после индуцированной интерлейкином 6 (IL6) стволовой пластичности у дифференцированных (CD44⁻) опухолевых клеток линии рака молочной железы человека T47D. **Материал и методы.** Проведена оценка жизнеспособности, цитофлуориметрического профиля клеток и их способности к маммосферообразованию при различной исходной конfluентности (40–50 % и 70–80 %) и методах снятия с поверхности пластика (использование TrypLE, аккутазы, скребка для клеток). Жизнеспособность клеток оценивали методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентно-меченного АннексинV и йодистого пропи-диа. Динамику изменения экспрессии поверхностных маркеров клеток оценивали методом проточной цитометрии с флуоресцентно-меченными антителами к CD24 и CD44. **Результаты.** Применение скребка для снятия клеток приводило к существенному повышению количества клеток с цитофлуориметрическими признаками раннего и позднего апоптоза по сравнению с использованием TrypLE и аккутазы. Использование TrypLE приводило к снижению количества CD44⁺ клеток, тогда как аккутаза не влияла на представленность данного маркера. Количество маммосфер и их средний диаметр не отличались между исследуемыми группами. Стимуляция дифференцированных (CD44⁻CD24⁺) клеток линии T47D IL6 уже через 24 ч приводила к появлению популяций CD44⁺CD24⁺ прогениторных и CD44⁺CD24^{-low} опухолевых стволовых клеток. Дифференцированные клетки после стимуляции IL6 в течение 24 ч образовывали в 3 раза больше маммосфер по сравнению с контролем. **Заключение.** Для оценки маммосферообразования целесообразно использовать клетку с конfluентностью до 80 % и применять аккутазу для снятия с поверхности пластика. Для стимуляции стволовой пластичности у дифференцированных клеток линии T47D достаточной является их инкубация с IL6 в течение 24 ч.

Ключевые слова: рак молочной железы, маммосферообразование, интерлейкин 6, стволовая пластичность.

OPTIMIZATION OF MAMMOSPHERE FORMATION ASSAY FOR QUANTIFICATION OF IL6-INDUCED STEMNESS IN DIFFERENTIATED BREAST CANCER CELLS

K.V. Nevskaya¹, L.V. Efimova¹, P.V. Korda¹, D.S. Dolgasheva²,
M.K. Ibragimova², M.E. Menyailo², E.V. Udut¹, N.V. Litviakov^{1,2},
A.G. Pershina¹

Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Tomsk, Russia¹
2, Moskovsky tract, 634050, Tomsk, Russia. E-mail: nevskeyaksenia@gmail.com¹
Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
Tomsk, Russia²
5, Kooperativny St., 634009, Tomsk, Russia²

Abstract

The aim of the study was mammosphere assay optimization for quantification of IL6-induced stemness in differentiated (CD44⁻) T47D breast cancer cells. **Material and Methods.** The effect of three commonly used cell-detaching methods (TrypLE, accutase, cell scraper) at various confluence (40–50 % and 70–80 %) on cell viability, phenotypic profile and mammosphere formation was tested. The cell viability was examined using AnnexinV/propidium iodide assay. The phenotypic profile was analyzed by flow cytometry with fluorescent markers CD24 and CD44. **Results.** Detachment of the cells using scraper led to substantial increase in early apoptotic and late apoptotic cells in comparison with TrypLE and accutase. Dissociation with TrypLE reduced the percentage of detected CD44⁺ positive cells, whereas accutase saved the surface marker. The number of mammosphere and their diameter did not differ between groups. Incubation of differentiated (CD44⁻CD24⁺) T47D cells with IL-6 for 24 hours resulted in an appearance of CD44⁺CD24⁺ and CD44⁺CD24^{-low} subpopulation. Furthermore, the differentiated cells after 24 hours of IL6 exposure formed 3 times more mammospheres compared to the control. **Conclusion.** Usage of cells with confluence of no more than 80 % and accutase for detachment of cells is recommended for mammosphere assay. Incubation of CD44-CD24⁺ T47D cells with IL6 for 24 hours is sufficient for stimulation of stemness plasticity.

Key words: breast cancer, mammosphere formation assay, IL6, stemness.

Введение

Метастазирование является одной из наиболее серьезных проблем в лечении рака. Согласно современным представлениям, способность дифференцированных опухолевых клеток к переходу в опухолевые стволовые клетки (ОСК), т.е. их стволовая пластичность или дедифференцировка, играет определяющую роль в инициации образования метастазов [1–3]. Изучение процесса дедифференцировки опухолевых клеток важно как при исследовании фундаментальных механизмов канцерогенеза, так и для оценки эффективности новых антиметастатических препаратов. Для подтверждения дедифференцировки, произошедшей под действием определенных факторов, *in vitro* используют такие методы, как оценка маммосферообразования, определение уровня экспрессии генов и фенотипического профиля клеток с маркерами стволовых клеток.

Анализ образования маммосфер позволяет оценить количество и функциональную активность клеток, способных инициировать опухолевый рост [4]. Стандартный протокол анализа образования маммосфер включает в себя получение суспензии единичных клеток, рассадку на плашки со свер-

низким прикреплением и оценку образования сфероидов размером более 35–100 мкм через 5–14 дней в зависимости от клеточной линии и дизайна эксперимента [5–7]. Одним из основных вариабельных факторов при постановке экспериментов по оценке маммосферообразования является способ снятия клеток с поверхности флакона. В большинстве работ для снятия клеток с поверхности пластики используют растворы ферментов – трипсин, TrypLE или аккутазы [8, 9]. Однако существуют протоколы, предлагающие использование скребка для клеток (скрепера) в качестве альтернативы ферментам [10, 11]. Также остается неизученным вопрос о влиянии исходной конfluenceности клеток перед снятием с поверхности пластика на их способность образовывать маммосферы. Известно, что увеличение конfluenceности может приводить к изменению экспрессии маркеров на поверхности клетки, в том числе и маркеров стволовых клеток [12], что важно для определения субпопуляций клеток и сортировки дифференцированных опухолевых клеток. Влияние конfluenceности на экспрессию цитофлуориметрических маркеров стволовых клеток и маммосферообразование ранее изучены не были. Таким образом, для получения достоверных

результатов важно оптимизировать метод маммосферообразования, а именно, оценить влияние конфлюентности и выбрать способ снятия клеток, позволяющий сохранить жизнеспособность и представленность рецепторов на мембране клеток. Это позволит минимизировать риск включения в анализ стволовых раковых клеток экспрессирующих CD44, но потерявших данный рецептор в процессе снятия с поверхности пластика.

Целью исследования явилась оптимизация метода оценки образования маммосфер после индуцированной интерлейкином 6 (IL6) стволовой пластичности у дифференцированных (CD44⁺) опухолевых клеток линии рака молочной железы человека T47D.

Материал и методы

Эксперименты были выполнены на клетках линии T47D (люминальный рак молочной железы типа A), любезно предоставленной А.А. Нуштаевой, ИБХФМ СО РАН, Новосибирск. Клетки (3–10 пассажа) культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), глутамина (Gibco, США), гентамицина (Gibco, США), амфотерицина В (Синтез, Россия) (ППС RPMI-1640). Клетки с низкой (40–50 %) и высокой (70–80 %) конфлюентностью снимали с поверхности пластика 3 способами: с использованием TrypLE (Gibco, США), аккутазы (Stemcell Technologies, США) или скребка для клеток (Cell Scraper, Corning). Определение фенотипического профиля клеток проводили с использованием антител PE anti-human CD44 (клон BJ18, Sony Biotechnology, США) и APC anti-human CD24 (клон ML5, Sony Biotechnology, США) на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США), для исключения мертвых клеток из анализа проводили окрашивание 4', 6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Thermo Fisher Scientific, США). Жизнеспособность клеток определяли с помощью набора AnnexinV:FITC Assay kit (Bio-Rad, Австрия).

Для оценки способности к образованию маммосфер 1 тыс. клеток в 1 мл среды Mammocult Basal Medium (Stemcell Technologies, США) с добавлением 10 % Mammocult proliferation supplement (Stemcell Technologies, США), 4 мкг/мл гепарина (Sigma, США), 0,48 мкг/мл гидрокортизона (Stemcell Technologies, США), антибиотика-антимикотика (Gibco, США) рассаживали в лунки 12-луночного планшета. Для уменьшения адгезии клеток к пластику дно лунок планшета предварительно покрывали 1 % агарозой (Хеликон, Россия). Для получения одноклеточной суспензии клетки предварительно пропускали через клеточное сито с размером пор 40 мкм (Corning). Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 7 дней, после чего получали фотографии всех лунок с помощью сканирующего микроскопа Leica DMi8 (Leica,

Германия). Количество и диаметр маммосфер определяли, используя программное обеспечение ImageJ методом, предложенным Vlachou et al. [13] с модификациями.

Для изучения динамики дедифференцировки клеток под влиянием IL6 клетки линии T47D с конфлюентностью 70–80 % снимали с поверхности пластика с использованием аккутазы, окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами PE anti-human CD44 и APC anti-human CD24 и отбирали фракцию CD44⁺ на клеточном сортере SH800 (Sony, США). Далее 50 тыс. клеток рассаживали в лунки 6-луночного планшета в 1 мл ППС RPMI-1640. Для индукции дедифференцировки в экспериментальные лунки добавляли 50 нг/мл IL6 (Abcam, США). Через 1, 3, 7 и 10 дней клетки снимали с поверхности лунок, проводили цитофлуориметрическую оценку экспрессии CD44 и CD24, а также изучали способность клеток образовывать маммосферы.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Сравнение количественных данных проводили при помощи t-критерия Стьюдента. Для выявления достоверности различий в случае множественных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Достоверность различий считали значимой при $p < 0,05$.

Результаты

Для оценки роли влияния исходной конфлюентности в монослое и выбора метода снятия клеток с пластика оценивали жизнеспособность, фенотипический профиль клеток и их способность образовывать маммосферы. Согласно полученным данным, использование TrypLE и аккутазы приводило к сопоставимым показателям жизнеспособности клеток (рис. 1). Можно отметить, что количество клеток с признаками раннего апоптоза (AnV⁺PI⁻) и позднего апоптоза (AnV⁺PI⁺) при использовании ферментативных методов снятия клеток (TrypLE и аккутазы) было выше при конфлюентности 40–50 % по сравнению с конфлюентностью 70–80 % ($p < 0,05$). При использовании TrypLE количество клеток с цитофлуориметрическими признаками апоптоза составило $27,47 \pm 3,59$ % при низкой конфлюентности и $16,64 \pm 0,59$ % при высокой конфлюентности, при использовании аккутазы – $24,72 \pm 2,28$ % и $18,98 \pm 1,38$ % соответственно.

Снятие клеток с использованием скребка приводило к существенному повышению количества клеток с цитофлуориметрическими признаками раннего и позднего апоптоза вне зависимости от исходного уровня конфлюентности. В случае низкой конфлюентности $63,58 \pm 5,94$ % клеток имели признаки апоптоза, в случае высокой конфлюентности – $62,67 \pm 4,60$ %. Дополнительным недостатком данного метода снятия клеток с пластика было отсутствие возможности получить одноклеточную

суспензию, необходимую для корректной оценки образования маммосфер, ни тщательным пипетированием, ни продавливанием через иглу шприца G26, ни обработкой ДНКазой. В связи с этим в дальнейшем для оценки экспрессионного профиля клеток и способности образовывать маммосферы применяли клетки, снятые с поверхности пластика ферментативными методами.

Анализ профиля экспрессии поверхностных маркеров клеток показал, что при использовании аккутазы популяция представлена преимущественно CD44⁺CD24⁺ клетками, 14,0 ± 0,33 % клеток имеют фенотип CD44⁺CD24⁺, а популяция стволовых клеток (CD44⁺CD24^{-low}) составляет 2,95 ± 0,21 %. При использовании TrypLE наблюдали уменьшение доли CD24⁺CD44⁺ клеток до 4,15 ± 0,28 % и

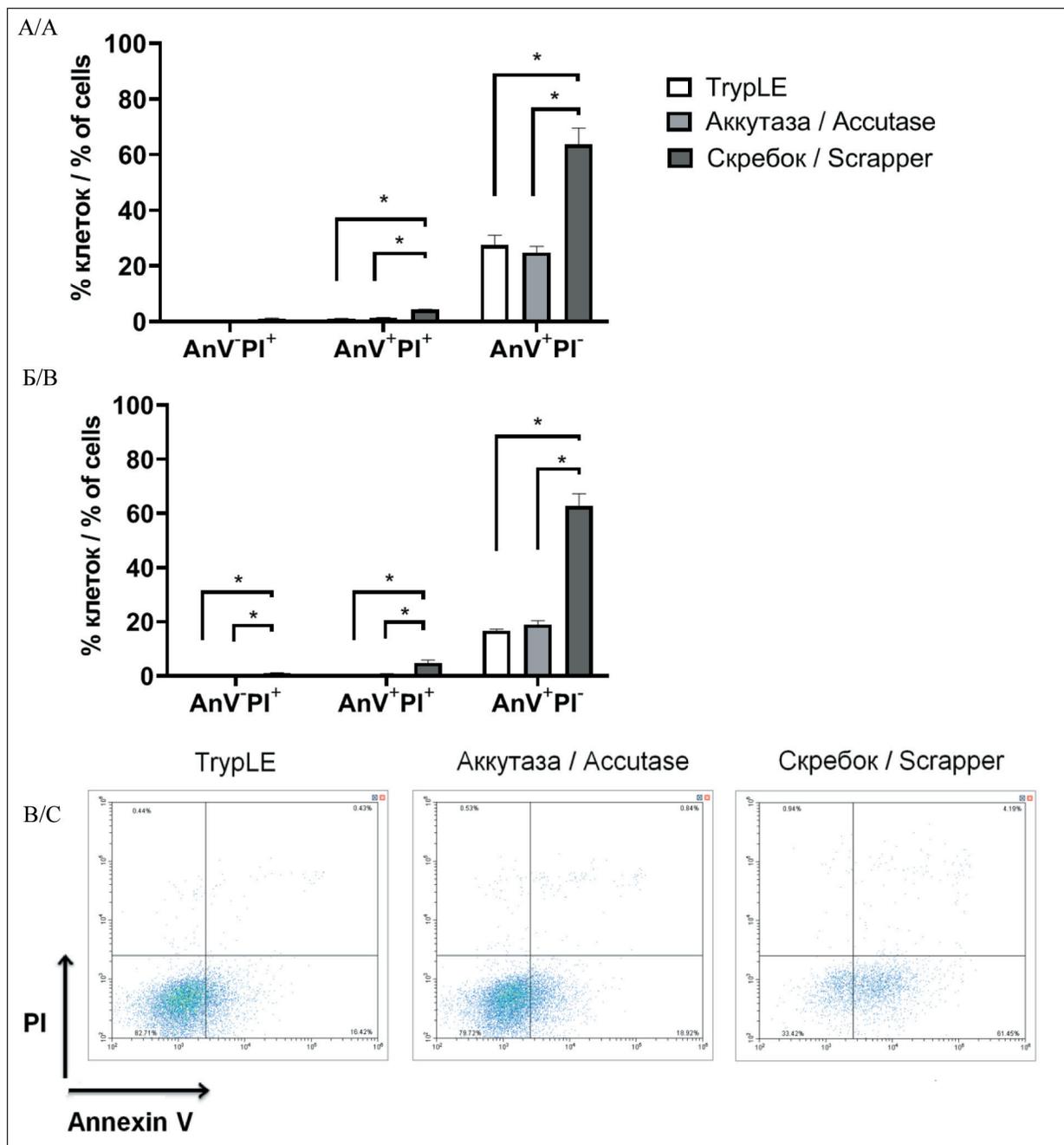


Рис. 1. Количество клеток линии T47D с цитофлуориметрическими признаками раннего апоптоза (AnV+PI⁺), некроза (AnV⁻PI⁺) и позднего апоптоза (AnV⁺PI⁻) при различных методах снятия с поверхности пластика: А – клетки с низкой конfluентностью (40–50 %); Б – клетки с высокой конfluентностью (70–80 %); В – репрезентативные гистограммы цитофлуориметрических признаков некроза, раннего и позднего апоптоза в исследуемых группах. Данные представлены как среднее ± SD, n=3. Примечание: * – p<0,05

Fig. 1. The effects of various cell-detaching methods on cell viability according to annexin V/PI staining protocol for flow cytometry: early apoptotic cells (AnV+PI⁺), necrotic cells (AnV⁻PI⁺), late apoptotic cells (AnV⁺PI⁻). A – low confluence (40–50 %), Б – high confluence (70–80 %), В – representative flow cytometry histograms early apoptotic cells, necrotic cells, late apoptotic cells. Each data point presents mean ± SD from three experiments. Note: * – p-value<0.05

3,42 ± 0,31 % при низкой и высокой конфлюентности соответственно (рис. 2), что может быть связано со слищиванием рецепторов CD44 и CD24 с поверхности под действием TrypLE.

Результаты оценки количества маммосфер, образуемых клетками при различной исходной конфлюентности и методах снятия с поверхности пластика (рис. 3), показали, что количество

маммосфер и их средний диаметр не отличались между исследуемыми группами. Однако учитывая, что сохранение CD44 рецепторов на мембране необходимо для выделения популяции дифференцированных клеток методом флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) с использованием антител, для проведения дальнейших экспериментов клетки выращивали до

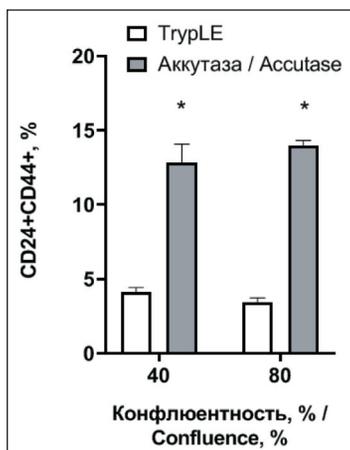


Рис. 2. Зависимость профиля клеток линии T47D от конфлюентности и метода снятия с поверхности пластика. Данные представлены как среднее ± SD, n=3. Примечание: * – p<0,05

Note: * – p-value<0.05

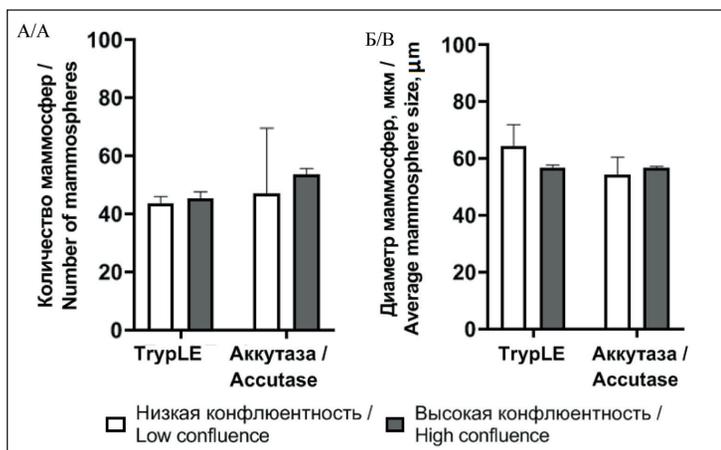


Рис. 3. Маммосферообразование при различной конфлюентности клеток и способах снятия с поверхности пластика: А – количество маммосфер в исследуемых группах; Б – диаметр маммосфер в исследуемых группах.

Данные представлены как среднее ± SD, n=3. Примечание: * – p<0,05

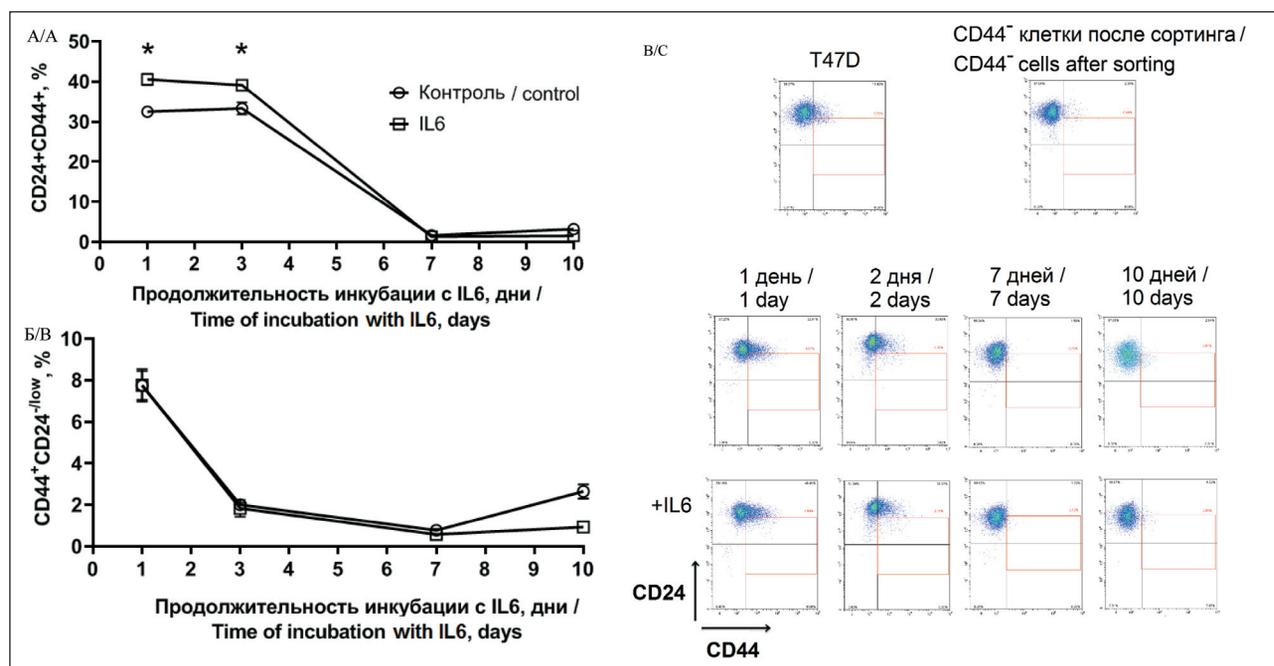


Рис. 4. Влияние продолжительности инкубации после внесения IL6 на фенотипический профиль клеток: А – количество CD24⁺CD44⁺ клеток; Б – количество CD24^{low}CD44⁺ клеток; В – репрезентативные гистограммы изменения фенотипического профиля клеток линии T47D в течение 10 дней инкубации. Примечание: * – p<0,05

Fig. 4. The effect of incubation time after IL-6 addition on phenotypic profile of the cells. A – the percentage of CD44⁺ CD24⁺ cells, B – the percentage of CD24^{low}CD44⁺ cells, C – representative flow cytometry histograms of T47D cells after IL6 exposure for 10 days. Each data point presents the mean and standard deviation of three replicates. Note: * – p-value<0.05

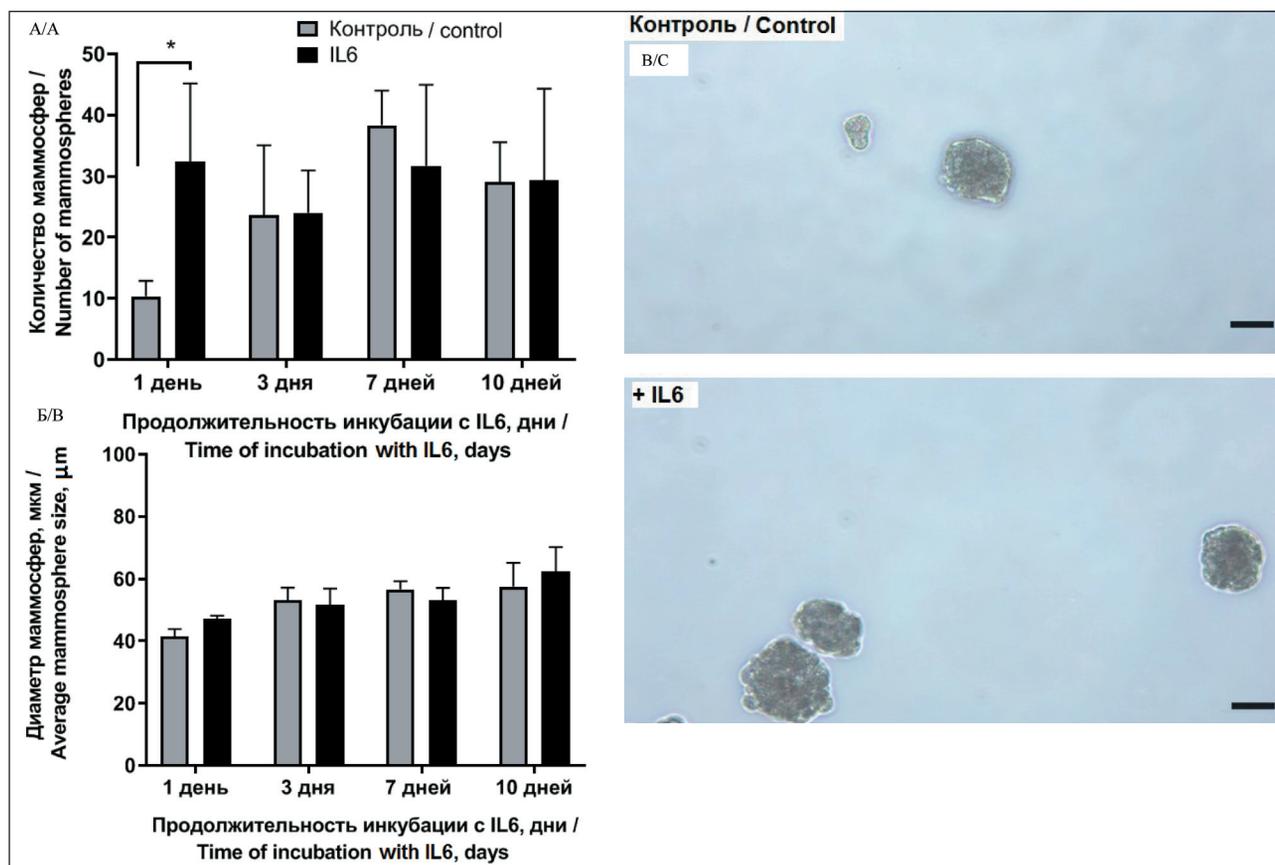


Рис. 5. Влияние продолжительности инкубации после внесения IL6 на способность CD44-CD24⁺ клеток линии T47D к маммосферообразованию: А – количество маммосфер; Б – диаметр маммосфер; В – репрезентативные фотографии маммосфер после инкубации с IL6 в течение 1 сут. Данные представлены как среднее ± SD, n=3. Длина отрезка 20 мкм.

Примечание: * – p<0,05

Fig. 5. The effect of incubation time after IL-6 addition on mammosphere formation by CD44-CD24⁺ cells. А – the number of mammospheres, В – average mammosphere size, С – Representative images of mammosphere formed by the cells after incubation with IL6 for 1 day. Each data point presents the mean and standard deviation of three replicates. Note: * – p-value<0.05

70–80 % конфлюентности и снимали с использованием аккутазы.

Вторая часть эксперимента была направлена на изучение динамики изменения экспрессии поверхностных маркеров и способности к маммосферообразованию CD44-CD24⁺ клеток линии T47D (выделенных методом FACS) при инкубации с индуктором дедифференцировки IL6. Уже через 24 ч инкубации CD44-CD24⁺ клеток наблюдали появление CD44⁺ клеток (рис. 4). При стимуляции IL6 доля CD44⁺CD24⁺ клеток составила 40,52 ± 1,41 % и была выше, чем для клеток без стимуляции (32,44 ± 0,51 %) (p<0,05). Популяция опухолевых стволовых клеток CD44⁺CD24^{-low} также возрастала по сравнению с исходной линией без сортировки (2,95 ± 0,21 %) и составила 7,76 ± 0,77 % при добавлении IL6 и 7,75 ± 0,69 % без добавления IL6. К 3-м сут доля CD44⁺CD24⁺ клеток не изменялась как в опытных, так и в контрольных образцах, однако популяция CD44⁺CD24^{-low} снижалась по сравнению с 1-ми сут. К 7-м сут инкубации с IL6 процент CD44⁺CD24⁺ клеток резко снижался и к 10-м сут оставался ниже базального уровня экспрессии, характерного для линии T47D.

Анализ способности дифференцированных клеток образовывать маммосферы показал, что клетки после стимуляции IL6 в течение 24 ч образовывали в 3 раза больше маммосфер (рис. 5) по сравнению с контролем (дифференцированными клетками без добавления IL6). Увеличение продолжительности инкубации клеток с IL6 не влияло на их способность образовывать маммосферы (рис. 5А). В то же время при увеличении времени инкубации клеток в контроле (без добавления IL6) до 7 дней наблюдали тенденцию к увеличению количества образуемых маммосфер, что может быть связано со способностью клеток T47D вырабатывать эндогенный эстроген, который способен стимулировать пролиферацию ESR⁺ опухолевых клеток линии T47D. Интересно отметить, что CD44-CD24⁺ клетки как при стимуляции IL6, так и без стимуляции образовывали меньше маммосфер, чем клетки исходной линии T47D, что можно объяснить отсутствием ОСК – CD44⁺CD24⁻. Продолжительность инкубации с IL6 не влияла на диаметр маммосфер (рис. 5Б).

Обсуждение

Полученные результаты об использовании аккутазы как оптимального реагента для снятия клеток линии T47D с поверхности пластика согласуются с данными Y. Quan et al. [14], полученными на линии клеток рака молочной железы MCF7. Важно отметить, что обработка TрупLE приводила к значительной потере CD44 рецепторов на поверхности клеток, тогда как количество CD24 рецепторов не изменялось. Это обусловлено тем, что в структуре CD44 содержится длинный трансмембранный домен, имеющий сайты протеолитического расщепления [15]. В то же время CD24 представляет собой сравнительно небольшой белок, закрепленный в мембране за счет гликозилфосфатидилинозитольного якоря. Известно, что TрупLE является трипсиноподобной протеазой и может воздействовать на сайты протеолитического расщепления CD44. Тогда как в составе аккутазы концентрация протеолитических ферментов ниже, так как их действие реализуется в комбинации с коллагенолитическими ферментами. Использование аккутазы позволяет получить одноклеточную суспензию, необходимую для оценки маммосферообразования, и сохранить рецепторы на поверхности клетки для иммунной сортировки, поэтому является предпочтительным методом для выделения популяции дифференцированных клеток с целью дальнейшего исследования индукторов или блокаторов дедифференцировки.

Влияние цитокинов семейства интерлейкина 6 (преимущественно IL6 и онкостатина M) на дедифференцировку показано в широком спектре исследований. IL6 и онкостатин M способны индуцировать дедифференцировку с образованием ОСК или ОСК-подобных клеток посредством воздействия на сигнальные пути (STAT3, STAT1, ERK1/2, PI3K/AKT) и активации факторов транскрипции (Snail, Twist, Zeb1, Slug, Nrf2) [16]. Однако при проведении экспериментальных исследований ключевым остается вопрос о продолжительности инкубации с индуктором.

Согласно полученным данным, стимуляция дифференцированных (CD44⁺CD24⁺) клеток линии T47D IL6 уже через 24 ч приводит к появлению новых популяций CD44⁺CD24⁺ и CD44⁺CD24^{-low}, т.е. является достаточной для индукции дедифференцировки. Полученные данные хорошо согласуются

с результатами N.R. West et al. [17], показавшими, что увеличение количества CD44⁺CD24^{-low} клеток линии T47D происходит в течение первых 48 ч стимуляции онкостатином M. Аналогично, на дифференцированных клетках линии HMEC (CD44⁺CD24⁺) показано, что через 48 ч стимуляции онкостатином M появляются популяции прогениторных CD44⁺CD24⁺ и стволовых клеток CD44⁺CD24⁻. Однако поддержание стволового состояния опухолевых стволовых клеток требует постоянного воздействия онкостатином M, в противном случае клетки снова начинают дифференцироваться к исходному фенотипу [18].

Крайне интересным наблюдением является то, что через 7 сут инкубации CD44⁺CD24⁺ клеток линии T47D происходит резкое сокращение популяции CD44⁺CD24⁺ ниже базального уровня, характерного для клеток линии T47D. В связи с этим важным представляется изучить их способность восстанавливать популяционный состав, характерный для исходной линии T47D. Наши данные показывают, что, в отличие от онкостатина M [18], длительная инкубация с IL6 приводит к дифференцировке CD44⁺ клеток. Аналогичные результаты опубликованы G. Xie et al. [19]: через 10 дней инкубации CD44⁻ клеток с добавлением IL6 доля CD44⁺ была значительно ниже, чем в исходной линии.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сократить время индукции стволовой пластичности дифференцированных клеток рака молочной железы с использованием IL6 до 24 ч, а также исключить необходимость проведения дополнительной замены среды и повторного добавления дорогостоящего цитокина для проведения анализа маммосферообразования.

Заключение

Для оценки образования маммосфер после IL6 индуцированной дедифференцировки CD44⁻ клеток линии рака молочной железы человека T47D целесообразным является применение аккутазы для снятия клеток с поверхности пластика. Конфлюентность клеток, используемых для постановки эксперимента, может достигать 80 %. Для стимуляции стволовой пластичности у дифференцированных клеток линии T47D достаточной является их инкубация с IL6 в течение 24 ч.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Fumagalli A., Oost K.C., Kester L., Morgner J., Bornes L., Bruens L., Spaargaren L., Azkanaz M., Schelfhorst T., Beerling E., Heinz M.C., Postrach D., Seinstra D., Sieuwerts A.M., Martens J.W.M., van der Elst S., van Baalen M., Bhowmick D., Vriskoop N., Ellenbroek S.I.J., Suijkerbuijk S.J.E., Snippert H.J., van Rheenen J. Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell*. 2020; 26(4): 569–78. doi: 10.1016/j.stem.2020.02.008.
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022; 12(1): 31–46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
3. Litviakov N., Ibragimova M., Tsyganov M., Kazantseva P., Derysheva 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.

4. Bhandary L., Bailey P.C., Chang K.T., Underwood K.F., Lee C.J., Whipple R.A., Jewell C.M., Ory E., Thompson K.N., Ju J.A., Mathias T.M., Pratt S.J.P., Vitolo M.I., Martin S.S. Lipid tethering of breast tumor cells reduces cell aggregation during mammosphere formation. *Sci Rep*. 2021; 11(1): 3214. doi: 10.1038/s41598-021-81919-9.
5. Bailey P.C., Lee R.M., Vitolo M.I., Pratt S.J.P., Ory E., Chakrabarti K., Lee C.J., Thompson K.N., Martin S.S. Single-Cell Tracking of Breast Cancer Cells Enables Prediction of Sphere Formation from Early Cell Divisions. *iScience*. 2018; 8: 29–39. doi: 10.1016/j.isci.2018.08.015.
6. Lombardo Y., de Giorgio A., Coombes C.R., Siebbing J., Castellano L. Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *J Vis Exp*. 2015; (97): 52671. doi: 10.3791/52671.
7. Montales M.T., Rahal O.M., Kang J., Rogers T.J., Prior R.L., Wu X., Simmen R.C. Repression of mammosphere formation of human breast cancer cells by soy isoflavone genistein and blueberry polyphenolic

acids suggests diet-mediated targeting of cancer stem-like/progenitor cells. *Carcinogenesis*. 2012; 33(3): 652–60. doi: 10.1093/carcin/bgr317.

8. *Iriondo O., Rábano M., Domenici G., Carlevaris O., López-Ruiz J.A., Zabalza I., Berra E., Vivanco M.* Distinct breast cancer stem/progenitor cell populations require either HIF1 α or loss of PHD3 to expand under hypoxic conditions. *Oncotarget*. 2015; 6(31): 31721–39. doi: 10.18632/oncotarget.5564.

9. *Kessel S.L., Chan L.L.* A High-Throughput Image Cytometry Method for the Formation, Morphometric, and Viability Analysis of Drug-Treated Mammospheres. *SLAS Discov*. 2020; 25(7): 723–33. doi: 10.1177/2472555220922817.

10. *Gallegos K.M., Patel J.R., Llopis S.D., Walker R.R., Davidson A.M., Zhang W., Zhang K., Tilghman S.L.* Quantitative Proteomic Profiling Identifies a Potential Novel Chaperone Marker in Resistant Breast Cancer. *Front Oncol*. 2021; 11: 540134. doi: 10.3389/fonc.2021.540134.

11. *Wang D., Naydenov N.G., Dozmorov M.G., Koblinski J.E., Ivanov A.I.* Anillin regulates breast cancer cell migration, growth, and metastasis by non-canonical mechanisms involving control of cell stemness and differentiation. *Breast Cancer Res*. 2020; 22(1): 3. doi: 10.1186/s13058-019-1241-x.

12. *Ren J., Wang H., Tran K., Civini S., Jin P., Castiello L., Feng J., Kuznetsov S.A., Robey P.G., Sabatino M., Stroncek D.F.* Human bone marrow stromal cell confluence: effects on cell characteristics and methods of assessment. *Cytotherapy*. 2015; 17(7): 897–911. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.03.607.

13. *Vlachou T., Aobuli X., D'Elia E., Santoro A., Moroni M.C., Pelicci P.G.* Quantification of Self-renewal in Murine Mammosphere Cultures. *J Vis Exp*. 2019; (153). doi: 10.3791/60256.

14. *Quan Y., Yan Y., Wang X., Fu Q., Wang W., Wu J., Yang G., Ren J., Wang Y.* Impact of cell dissociation on identification of breast cancer stem cells. *Cancer Biomark*. 2012–2013; 12(3): 125–33. doi: 10.3233/CBM-130300.

15. *Zöller M.* CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(4): 254–67. doi: 10.1038/nrc3023.

16. *Abaurrea A., Araujo A.M., Caffarel M.M.* The Role of the IL-6 Cytokine Family in Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(15): 8334. doi: 10.3390/ijms22158334.

17. *West N.R., Murray J.I., Watson P.H.* Oncostatin-M promotes phenotypic changes associated with mesenchymal and stem cell-like differentiation in breast cancer. *Oncogene*. 2014; 33(12): 1485–94. doi: 10.1038/onc.2013.105.

18. *Junk D.J., Bryson B.L., Smigiel J.M., Parameswaran N., Bartel C.A., Jackson M.W.* Oncostatin M promotes cancer cell plasticity through cooperative STAT3-SMAD3 signaling. *Oncogene*. 2017; 36(28): 4001–13. doi: 10.1038/onc.2017.33.

19. *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): 1171–9. doi: 10.3892/ijo.2011.1275.

Поступила/Received 15.09.2022

Одобрена после рецензирования/Revised 08.11.2022

Принята к публикации/Accepted 28.11.2022

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Невская Ксения Владимировна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник центра биологических исследований и биоинженерии центральной научно-исследовательской лаборатории, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). E-mail: nevskayaksenia@gmail.com. SPIN-код: 1405-0472. Researcher ID (WOS): L-7279-2016. Author ID (Scopus): 55865615000. ORCID: 0000-0003-1659-8812.

Ефимова Лина Викторовна, младший научный сотрудник центра биологических исследований и биоинженерии центральной научно-исследовательской лаборатории, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 5569-5343. Researcher ID (WOS): L-7345-2016. Author ID (Scopus): 57190033913. ORCID: 0000-0002-7168-1419.

Корда Полина Викторовна, студентка медико-биологического факультета, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). Researcher ID (WOS): AEA-5054-2022. ORCID: 0000-0001-8887-536X.

Долгашева Дарья Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия). SPIN-код: 3580-3460. Researcher ID (WOS): AEC-9454-2022. ORCID: 0000-0002-6763-920X.

Ибрагимова Марина Константиновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; научный сотрудник лаборатории генетических технологий центральной научно-исследовательской лаборатории, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Томск, Россия). SPIN-код: 2340-1628. Researcher ID (WOS): C-8609-2012. Author ID (Scopus): 57130579200. ORCID: 0000-0001-8815-2786.

Меняйло Максим Евгеньевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории биологии опухолевой прогрессии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск, Россия). SPIN-код: 6929-4298. Researcher ID (WOS): Q-9605-2016. Author ID (Scopus): 5718343883. ORCID: 0000-0003-4630-4934.

Удут Елена Владимировна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая центральной научно-исследовательской лабораторией, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 1713-8040. Researcher ID (WOS): O-9807-2015. Author ID (Scopus): 6507329853. ORCID: 0000-0002-6104-4782.

Литвяков Николай Васильевич, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; научный сотрудник лаборатории генетических технологий центральной научно-исследовательской лаборатории, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 2546-0181. Researcher ID (WOS): C-3263-2012. Author ID (Scopus): 6506850698. ORCID: 0000-0002-0714-8927.

Першина Александра Геннадьевна, кандидат биологических наук, заведующая центром биологических исследований и биоинженерии центральной научно-исследовательской лаборатории, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Томск, Россия). SPIN-код: 7755-5984. Researcher ID (WOS): C-3053-2015. Author ID (Scopus): 35108090500. ORCID: 0000-0001-7604-9722.

ВКЛАД АВТОРОВ

Невская Ксения Владимировна: культивирование клеток, проточная цитофлуориметрия, анализ полученных данных, подготовка текста публикации.

Ефимова Лина Викторовна: оценка маммосферообразования.

Корда Полина Викторовна: оценка маммосферообразования.

Долгашева Дарья Сергеевна: сбор образцов для клеточного сортирования.

Ибрагимова Марина Константиновна: анализ опубликованной литературы.

Меняйло Максим Евгеньевич: сбор образцов для клеточного сортирования.

Удут Елена Владимировна: научное редактирование текста.

Литвяков Николай Васильевич: анализ опубликованной литературы по теме исследования, научное редактирование текста.

Першина Александра Геннадьевна: разработка дизайна эксперимента, анализ полученных данных, подготовка текста публикации.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 29.09.2021 № 075-15-2021-1073).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Ksenia V. Nevskaya, MD, PhD, Researcher at the Center for Biological Research and Bioengineering of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). E-mail: nevskeyaksenia@gmail.com. Researcher ID (WOS): L-7279-2016. Author ID (Scopus): 55865615000. ORCID: 0000-0003-1659-8812.

Lina V. Efimova, Junior Researcher at the Center for Biological Research and Bioengineering of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): L-7345-2016. Author ID (Scopus): 57190033913. ORCID: 0000-0002-7168-1419.

Polina V. Korda, Student, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): AEA-5054-2022, ORCID: 0000-0001-8887-536X

Daria S. Dolgasheva, Junior Researcher at the Laboratory of Viral Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): AEC-9454-2022. ORCID: 0000-0002-6763-920X.

Marina K. Ibragimova, PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Viral Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Researcher of the Laboratory of Genetic Technologies of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-8609-2012. Author ID (Scopus): 57130579200. ORCID: 0000-0001-8815-2786.

Maksim E. Menyailo, MD, PhD, Researcher at the Laboratory of Biology of Tumor Progression, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): Q-9605-2016. Author ID (Scopus): 5718343883. ORCID: 0000-0003-4630-4934.

Elena V. Udut, MD, Professor, Head of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): O-9807-2015. Author ID (Scopus): 6507329853. ORCID: 0000-0002-6104-4782.

Nikolai V. Litviakov, DSc, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Viral Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; Researcher of the Laboratory of Genetic Technologies of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-3263-2012. Author ID (Scopus): 6506850698. ORCID: 0000-0002-0714-8927.

Alexandra G. Pershina, PhD, Head of the Center for Biological Research and Bioengineering of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Tomsk, Russia). Researcher ID (WOS): C-3053-2015. Author ID (Scopus): 35108090500. ORCID: 0000-0001-7604-9722.

AUTHOR CONTRIBUTION

Kseniya V. Nevskaya: cell culture, flow cytometry, data analysis, manuscript preparation.

Lina V. Efimova: mammosphere formation assay.

Polina V. Korda: mammosphere formation assay.

Daria S. Dolgasheva: collection of samples for cell sorting.

Marina K. Ibragimova: literature analysis.

Maxim E. Menyailo: collection of samples for cell sorting.

Elena V. Udut: manuscript preparation and editing.

Nikolay V. Litviakov: manuscript preparation and editing.

Alexandra G. Pershina: concept and design of the study, manuscript preparation and editing.

Funding

The study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-15-2021-1073, 29.09.2021).

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.