

ВАСИЛЬЕВА МАРИЯ ВАДИМОВНА

**ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ NOTCH-ЗАВИСИМЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ
НА СВОЙСТВА КЛЕТОК СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ И ПРОГРЕССИЮ
НОВООБРАЗОВАНИЙ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Копнин Павел Борисович

Официальные оппоненты:

Алиева Ирина Борисовна, доктор биологических наук, заведующий лабораторией клеточной подвижности отдела электронной микроскопии научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Татарский Виктор Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита состоится «20» марта 2025 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2025 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Солидные злокачественные опухоли представляют собой органоподобные новообразования, формирующиеся в результате взаимодействия опухолевых клеток со своим непосредственным окружением. Микроокружение опухоли, как и строение большинства паренхиматозных органов, включает в себя клеточные компоненты, внеклеточный матрикс и микробиом. Все этапы опухолевой прогрессии обуславливаются именно двунаправленным взаимодействием, коэволюцией опухолевых клеток и их микроокружения. Взаимодействие опухолевых клеток с микроокружением осуществляется по юкстакринному и паракринному механизмам посредством различных сигнальных путей, в том числе Notch. Поскольку Notch является плейотропным сигнальным путём, то он вовлечён во взаимодействие опухолевых клеток со всеми типами клеточных компонентов микроокружения. Мутации генов, кодирующих его компоненты, приводят к патологиям развития и различным заболеваниям, в том числе онкологическим. Ранее в лаборатории цитогенетики отдела молекулярной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России под руководством Копнина П.Б. изучались молекулярные механизмы опухолевой прогрессии, связанные с некоторыми сигнальными путями, что позволило отработать методики определения основных биологических характеристик опухолевых клеток, пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток (ОСК) *in vitro* и *in vivo*.

Цель исследования

Изучение роли рецептора сигнального пути Notch – NOTCH1 в опухолевой прогрессии, обусловленной свойствами самих опухолевых клеток и их взаимодействием с мезенхимальными клетками микроокружения.

Задачи исследования

1. Получить клетки линий карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека с подавленной экспрессией *NOTCH1*.
2. Исследовать значимость экспрессии *NOTCH1* для прогрессии опухолевых клеток линий A549 и HCT116.
3. Проверить наличие зависимости между долей α -SMA-позитивных (от англ. α -smooth muscle actin, α -гладкомышечный актин) клеток в первичных культурах мезенхимальных клеток человека различной гистогенетической принадлежности и их способностью стимулировать рост ксенографтов, сформированных клетками линии HCT116.

4. Изучить роль сигнального пути Notch в механизме α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.

5. Выявить ключевые молекулы, вовлечённые в механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.

6. Подтвердить универсальность Notch-индуцированного механизма α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток при взаимодействии с несколькими линиями опухолевых клеток различного гистогенетического происхождения.

Методология и методы исследования

В работе использовали комплексный подход к изучению роли активности сигнального пути Notch в опухолевой прогрессии, охватывающий широкий спектр методов *in vitro* и *in vivo*.

Для подавления экспрессии *NOTCH1* в клетках карцином легкого A549 и толстой кишки HCT116 человека применяли метод РНК-интерференции. Фенотип и морфологию клеток изучали методами *in vitro*: световая микроскопия, оценка скорости пролиферации, способность к колониобразованию в адгезивных условиях, миграционная активность и *in vivo*: динамика роста подкожных ксенографтов, анализ способности к метастазированию. Для оценки влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к поддержанию пула и фенотипа ОСК анализировали туморогенность, способность к колониобразованию в полужидкой среде, активность АВС-транспортёров и продукцию одного из маркеров ОСК – CD133 методом проточной цитофлуориметрии. С помощью общедоступных баз данных выбирали гены, ассоциированные с механизмами опухолевой прогрессии, и проводили количественный анализ их экспрессии методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Для изучения механизма опухолевой прогрессии, обусловленного взаимодействием опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, использовали обширную коллекцию линий опухолевых клеток и первичных культур мезенхимальных клеток человека. В первую очередь изучили корреляцию между долей α -SMA-позитивных мезенхимальных клеток в культуре и их способностью стимулировать рост подкожных ксенографтов, сформированных клетками HCT116. Для доказательства вовлечённости *NOTCH1* и *P53* в механизм α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток десны (МСКд) с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности применяли методы генной инженерии: РНК-интерференция, экзогенная экспрессия и анализ транскрипционной активности. Все полученные результаты *in vitro* экспериментов (иммуноблоттинг, применение специфического ингибитора γ -секретазы, иммунофлуоресцентная микроскопия или проточная

цитофлуориметрия) подтверждали *in vivo*. Для доказательства возможности аутокринной регуляции дифференцировки МСКд через TGF- β 1-зависимый (от англ. transforming growth factor beta 1, трансформирующий фактор роста бета 1) сигнальный путь, в дополнение к ранее перечисленным методам, применяли ПЦР-анализ, иммуноферментный анализ (ИФА) и селективные ингибиторы рецепторов TGF- β 1. Универсальность изученного механизма доказывали на нескольких линиях опухолевых клеток.

Научная новизна

Изучение вовлеченности сигнального пути Notch в процессы онкогенеза не теряет своей актуальности. На сегодняшний день проведено множество исследований по оценке побочных эффектов его ингибиторов. Однако, литературные данные указывают на то, что большинство исследователей в своих работах используют глобальное ингибирование Notch, не уделяя должного внимания его компонентам в отдельности, либо проводят ограниченный набор экспериментов по изучению молекулярно-биологических характеристик клеток с подавленной экспрессией гена, кодирующего один из рецепторов семейства Notch. В настоящем исследовании впервые применен широкий спектр методов и подходов для изучения роли рецептора NOTCH1 сигнального пути Notch в опухолевой прогрессии, включающий оценку влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на характеристики непосредственно опухолевых клеток и на взаимодействие опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения. Данный подход позволяет выявить новые потенциальные мишени для разработки противоопухолевых терапий.

Теоретическая и практическая значимость

В настоящей работе доказана вовлеченность экспрессии гена, кодирующего рецептор NOTCH1 сигнального пути Notch, в прогрессию рака лёгкого и толстой кишки человека, в том числе в поддержание пула ОСК. По данным литературы глобальное ингибирование Notch имеет множество нежелательных эффектов, поэтому, учитывая результаты проведенной работы, потенциально более эффективными мишенями для противоопухолевой терапии представляются целевые гены Notch, продукты которых вовлечены в формирование и поддержание пула и фенотипа ОСК. Кроме этого, в результате проведенной работы был выявлен молекулярный механизм взаимовлияния опухолевых и мезенхимальных клеток микроокружения, осуществляемый посредством гетеротипического межклеточного взаимодействия через Notch. Опухолевые клетки, характеризующиеся продукцией соответствующего/-их лигандов Notch, способны запускать в NOTCH1-позитивных МСК сигнальный путь Notch, что приводит к их α -

SMA-позитивной дифференцировке. Дифференцированные МСК приобретают способность к стимуляции опухолевого роста за счёт продукции ряда молекул, в том числе TGF- β 1.

Личный вклад

Автор самостоятельно провел анализ научной литературы по теме диссертации, изучил степень разработанности темы, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке дизайна исследования. Автор лично провел все эксперименты, проанализировал полученные данные и подготовил публикации, полностью отражающие результаты работы. Доклады по теме диссертации автор лично представил на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («Биологические науки»), направлению исследований п. 2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)».

Положения, выносимые на защиту

1. Подавление экспрессии *NOTCH1* в клетках линий карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека приводит к формированию менее злокачественного фенотипа, снижает способность к поддержанию пула и фенотипа ОСК и экспрессию целевых генов сигнального пути Notch, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии.

2. Выявлена прямая зависимость между долей α -SMA-позитивных клеток в первичных культурах мезенхимальных клеток человека различной гистогенетической принадлежности и их способностью стимулировать рост ксенографтов, сформированных клетками линии HCT116.

3. Доказана вовлечённость сигнального пути Notch в механизм α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток десны, характеризующихся продукцией полноразмерного трансмембранного рецептора NOTCH1, с приобретением ими способности к стимуляции опухолевого роста клеток линии HCT116, характеризующихся продукцией лиганда сигнального пути Notch – JAGGED1.

4. Ключевыми молекулами, вовлечёнными в механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности, являются опухолевый супрессор P53 (ко-фактор) и фактор TGF- β 1, действующий по механизму аутокринной регуляции.

5. Продемонстрирована универсальность Notch-индуцированного механизма α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных клеток при взаимодействии с клетками линий рака лёгкого A549, толстой кишки LIM1215, фибросаркомы HT1080 и гепатокарциномы HEPG2 человека, характеризующимися продукцией лиганда(-ов) сигнального пути Notch – JAGGED1 и/или DLL.

Внедрение результатов исследования

Разработанный в ходе диссертационной работы комплексный подход к оценке злокачественности фенотипа опухолевых клеток и клеточная модель для воссоздания механизмов взаимодействия опухоли со стромальным микроокружением *in vitro* и *in vivo* используются в научно-исследовательской деятельности НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 9 апреля 2024 года на совместной научной конференции лаборатории цитогенетики отдела молекулярной биологии опухолей, группы биохимии опухолей и лаборатории онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории молекулярной биологии вирусов, лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Результаты исследования были представлены на 5 научных конференциях: The EMBO workshop (Томск, Россия, 2015 г.), Молекулярная онкология: итоги и перспективы (Москва, Россия, 2015 г.), EACR25 (Амстердам, Нидерланды, 2018 г.), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2018 г.) и MAP Congress (Онлайн, 2020 г.).

Публикации

Материалы диссертации представлены в 14 публикациях, в том числе в 3 статьях в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для защиты диссертационных работ по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки).

Объём и структура работы

Диссертационная работа изложена на 107 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных

обозначений и списка литературы. Текст иллюстрирован 42 рисунками и 6 таблицами. Список литературы содержит 287 источников.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе использовали клеточные линии карцином лёгкого A549 (ATCC® CCL-185™), толстой кишки HCT116 (ATCC® CCL-247™) и LIM1215 (ECACC 10092301), фибросаркомы HT1080 (ATCC® CCL-121™), гепатокарциномы HEPG2 (ATCC® HB-8065™) человека и первичные культуры мезенхимальных клеток человека различной гистогенетической принадлежности. Клетки выращивали в среде для культивирования эукариотических клеток HyClone DMEM / HyClone DMEM/F12 1:1 (SH30081.FS / SH30271.FS, Cytiva), содержащей 7–10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) HyClone FetalClone (SH30080.02, Cytiva), антибиотики, аминокислоты, глюкозу и т.д., в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Для кокультивирования опухолевых и мезенхимальных клеток последние сеяли в количестве 10⁴ кл/см² в нескольких повторах, выращивали до субконфлюэнтного монослоя, считали, затем поперх сеяли опухолевые клетки в равном количестве и, спустя 3 суток, анализировали.

С помощью инструментов базы данных National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) были выбраны последовательности малых интерферирующих РНК для РНК-интерференции *NOTCH1*. Они были синтезированы и клонированы в вектор pLKO.1-puro (8453, Addgene). Исследуемые клеточные культуры инфицировали вирусными частицами, содержащими экспериментальные вектора, и подвергали дальнейшей селекции. По результатам анализа тотальной РНК и белка была выбрана наиболее эффективная последовательность (5'–GATGCCAAATGCCTGCCAGAA–3'). Для подавления экспрессии *TP53* использовали вектор pLKO.1-puro shTP53 (19119, Addgene). В качестве контроля использовали вектор pLKO.1-puro shGFP (30323, Addgene). Для экзогенной экспрессии *NICD1* использовали вектор Notch1 intracellular domain-pcw107-V5 (64622, Addgene), *GFP* – pLenti6-GFP (35637, Addgene).

ПЦР проводили на амплификаторе Dyad DNA Engine (Bio-Rad), полученную реакционную смесь разделяли электрофоретически в агарозном геле. Относительную интенсивность флуоресценции полос оценивали с помощью программы Total Lab версии 2.0 (Nonlinear Dynamics). Образцы нормировали по количеству ПЦР-продукта *TUBA1A*. ПЦР-РВ проводили на амплификаторе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). С помощью программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad) получали значения Ct для целевых и референсного (*TUBA1A*) генов. Относительные уровни экспрессии вычисляли с использованием $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – метода. Экспрессия каждого гена была нормирована относительно его экспрессии в клетках

сублиний shGFP, которая принята за единицу. Используемые в работе пары праймеров к мРНК целевых генов и размеры получаемых ПЦР-продуктов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Праймеры к мРНК целевых генов и размеры получаемых ПЦР-продуктов (п.о. – пары оснований)

Ген	Последовательность прямого праймера (5'→3')	Последовательность обратного праймера (5'→3')	Размер продукта, п.о.
<i>CDH1</i>	GTCTGTAGGAAGGCACAGCC	TGCAACGTCGTTACGAGTCA	285
<i>C-MYC</i>	GGCTCCTGGCAAAAGGTCA	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT	119
<i>HES1</i>	ACACGACACCGGATAAACCAA	GCCGCGAGCTATCTTTCTTCA	150
<i>NANOG</i>	AAGGTCCCGGTCAAGAAACAG	CTTCTGCGTCACACCATTGC	237
<i>NES</i>	GCGGCTGCGGGCTACTGAAA	ATCCAAGACGCCGGCCCTCT	281
<i>NOTCH1</i>	CACCCATGACCACTACCCAGTT	CCTCGGACCAATCAGAGATGTT	250
<i>POU5F1</i>	GTGTTTCAGCCAAAAGACCATCT	GGCCTGCATGAGGGTTTCT	156
<i>SNAIL1</i>	ACTGCAACAAGGAATACCTCAG	GCACTGGTACTTCTTGACATCTG	242
<i>SOX2</i>	TGGACAGTTACGCGCACAT	CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	215
<i>TGFBI</i>	TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC	GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA	122
<i>TUBA1A</i>	GTTGGTCTGGAATTCTGTCAG	AAGAAGTCCAAGCTGGAGTTC	288
<i>TWIST1</i>	CACGAGCGGCTCAGCTACGC	CGCTGCCCGTCTGGGAATCAC	313
<i>WNT1</i>	TCCCCTTTGTCCTGCGTTTT	TGTTCAATGGCTCCACGACA	231

В работе использовали первичные антитела к Notch1 (sc-6014, Santa Cruz Biotechnology), Jagged1 (sc-390177, Santa Cruz Biotechnology), P53 (sc-126, Santa Cruz Biotechnology), α -SMA (M0851, DAKO), F-актину (P1951, Sigma-Aldrich), α -тубулину (B-5-1-2: sc-23948, Santa Cruz Biotechnology), CD133 (ab19898, Abcam) и флуоресцентно-меченые вторичные антитела Alexa Fluor 488 (A11094, Thermo Fisher Scientific) и 633 (A30634, Thermo Fisher Scientific).

Для анализа тотального белка методом иммуноблоттинга количество белка в пробах определяли методом Бредфорда. Лизаты электрофоретически разделяли в полиакриламидном геле с помощью системы Mini-PROTEAN (Bio-Rad) и переносили на поливинилиденфторидную мембрану с низкой автофлуоресценцией (IPFL00005, Merck Millipore) с помощью системы полусухого переноса белков Power Blotter System (Invitrogen). Мембраны инкубировали с необходимыми первичными, затем с соответствующими вторичными антителами. Визуализацию полос проводили с помощью сканера Typhoon 9410 (GE Healthcare). Относительную интенсивность флуоресценции полос оценивали с помощью программы Total Lab версии 2.0 (Nonlinear Dynamics). Образцы нормировали по количеству α -тубулина.

Микрофотографии живых клеточных культур в фазовом контрасте получали с помощью микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss). Для анализа белков методом иммунофлуоресцентной микроскопии клетки культивировали на покровных стёклах, затем фиксировали. Покровные стёкла инкубировали с необходимыми первичными, затем с соответствующими вторичными

антителами. Ядра выявляли с помощью 4',6-диамидино-2-фенилиндола (4',6-diamidino-2-phenylindole – DAPI) (D9542, Sigma-Aldrich). Анализ проводили с помощью микроскопа AxioPlan 2 с использованием объектива 100×/1,30 (Carl Zeiss).

Для определения скорости роста клеточных культур клетки высевали на чашку Петри в количестве $0,5 \times 10^5$, каждые 48 часов в течение 6 суток проводили подсчёт количества клеток с помощью камеры Горяева. Для определения миграционной активности клеток на фильтр камер Бойдена с диаметром пор 8 мкм высевали $0,5 \times 10^5$ клеток. Спустя сутки инкубации, клетки, оставшиеся на верхней поверхности фильтра, удаляли, мигрировавшие клетки фиксировали и окрашивали DAPI. Миграционную активность определяли подсчётом клеток на нижней поверхности фильтра. Для анализа колониобразования в адгезивных условиях клетки высевали в количестве 500 клеток на 10-см чашку Петри, инкубировали 14 суток, фиксировали и окрашивали. Для анализа колониобразования в полужидкой среде (2,6% раствор метилцеллюлозы и среда NuClone DMEM, содержащая 20% ЭТС, в пропорции 1:1) клетки высевали в количестве 200 клеток на 10-см чашку Петри с неадгезивным для эукариотических клеток покрытием дна, инкубировали 14 суток и окрашивали. Количество и размер колоний подсчитывали с помощью программы Total Lab версии 2.0 (модуль Colony Counter).

Способность к исключению красителя детектировали с помощью проточного цитометра BD FACSCanto II (BD Biosciences). Анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения BD FACSDiva Software (BD Biosciences) и WinMDI (Joseph Trotter). Для анализа доли клеток в культуре, продуцирующих специфические маркеры, клетки фиксировали и считали в камере Горяева. Клетки инкубировали с необходимыми первичными, затем с соответствующими вторичными антителами. Образцы анализировали с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCalibur (BD Biosciences) и программного обеспечения Cell Quest software (BD Biosciences).

Для анализа транскрипционной активности *NOTCH1* использовали полученный ранее научным руководителем к.б.н. Копниным П.Б. генно-инженерный репортерный лентивирусный конструкт, где *Luc* находится под контролем NICD1-зависимого промотора RBP (recombination signal binding protein). Для анализа транскрипционной активности *TP53* использовали конструкт pGF-P53-mCMV-EF1-puro (TR200, System Biosciences). Клеточные культуры с введёнными ранее конструктами спустя 72 часа после экспериментов анализировали в системе Steady-Glo Luciferase Assay System (E2510, Promega). Люминесценцию детектировали люминометром 20/20n Luminometer (Fisher Scientific International). Полученные значения нормировали относительно концентрации белка в пробах, определённой по методу Бредфорда. Активность люциферазы на диаграммах была нормирована относительно её активности в клетках контрольных культур МСКД RBP, которая принята за единицу.

Ингибитор Т-бутиловый эфир N-[N-(3,5-дифторфенацетил)-L-аланил]-S-фенилглицина (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester – DAPT) (D5942, Sigma-Aldrich) в концентрации 10 мкмоль и селективные ингибиторы рецепторов TGF- β 1 SB-525334 (S8822, Sigma-Aldrich), SB-505124 (S4696, Sigma-Aldrich) в концентрации 10 наномоль добавляли один раз в культуральную среду при посеве опухолевых на мезенхимальные клетки. Фактор TGF- β 1 (T7039, Sigma-Aldrich) добавляли один раз в культуральную среду до концентрации 10 мкг/мкл при пассаже клеток. Эксперименты начинали не ранее чем через 72 часа после добавления веществ. ИФА TGF- β 1 в культуральной среде проводили с использованием набора Bio-Plex Pro™ TGF- β 3-plex Panel (171-W4001M, Bio-Rad). Уровень продукции TGF- β 1 на диаграмме был нормирован относительно его продукции клетками контрольной культуры МСКд-Notch1⁺, который принят за единицу.

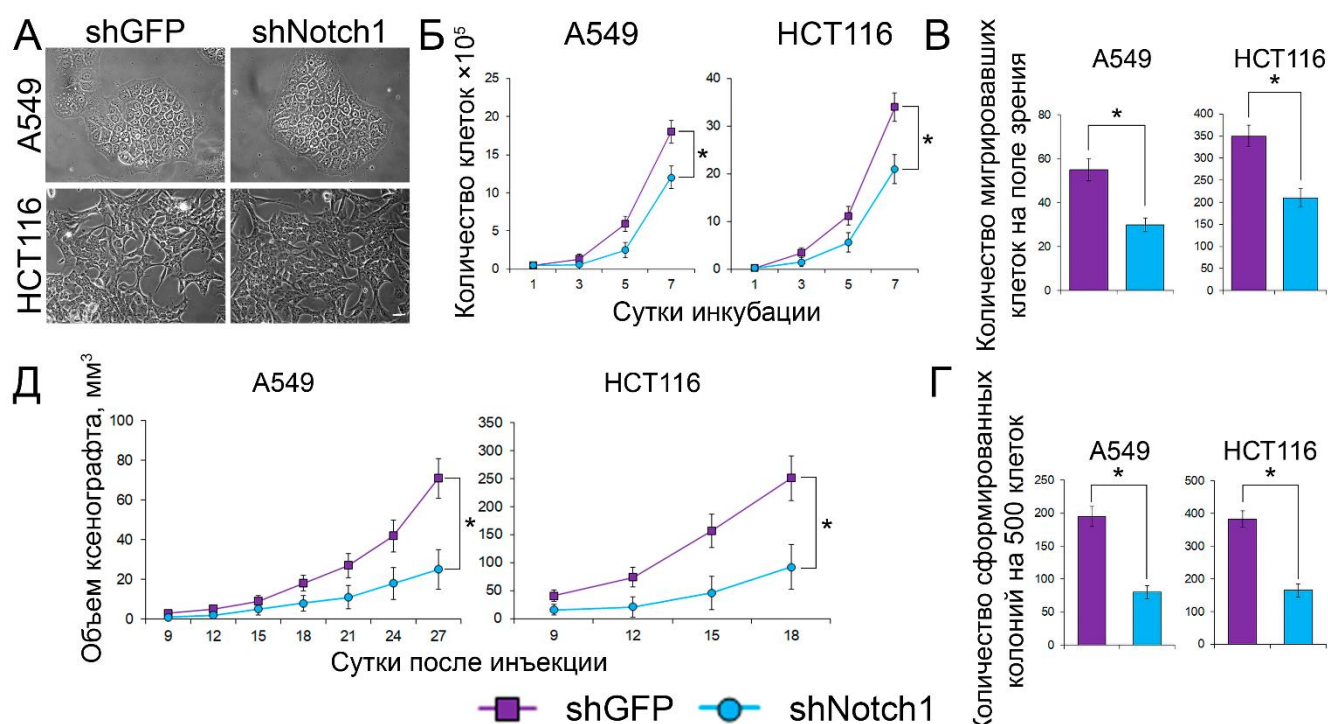
Эксперименты *in vivo* проводили на самках иммунодефицитных бестимусных мышей линии BALB/c nu/nu возрастом 7–8 недель, весом 15–20 г. Для определения скорости роста ксенографтов лабораторным животным подкожно вводили суспензию клеток (10⁶ опухолевых, 2,5×10⁶ мезенхимальных клеток). Линейные параметры ксенографтов («длина» и «ширина») измеряли раз в 3 суток в течение 2,5–3 недель. Объём ксенографта рассчитывали по формуле: «ширина»² × «длина» × 0,5, где «ширина» ≤ «длина». Для определения минимальной прививочной дозы (анализ туморогенности) готовили суспензии с различной концентрацией клеток, на 7-е сутки после введения пальпацией определяли наличие сформированного ксенографта. Для анализа способности к метастазированию лабораторным животным вводили суспензию 10⁶ опухолевых клеток в одну из долей лёгкого, затем анализировали наличие метастазов в других долях. Длительность эксперимента составляла 28 суток. Иммуногистохимический анализ проводили по стандартному протоколу с окраской гематоксилин-эозином. Анализ полученных срезов проводили с помощью микроскопа Axiovert 200, количество метастазов в долях лёгкого подсчитывали вручную. Данные на диаграммах и графиках представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA версии 13.3. Для оценки различий между группами применяли U-критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Значимость экспрессии *NOTCH1* для прогрессии карцином лёгкого и толстой кишки человека

Исходные клетки A549 и HCT116 и клетки обеих контрольных сублиний (shGFP) характеризовались прерывистыми и фрагментированными межклеточными контактами, а

клетки с подавленной экспрессией *NOTCH1* (shNotch1) – более эпителиоидными (Рисунок 1А). Подавление экспрессии *NOTCH1* в клетках А549 и НСТ116 снижало скорость их пролиферации (Рисунок 1Б), миграционную активность (Рисунок 1В), эффективность колониобразования в адгезивных условиях (Рисунок 1Г) и темпы опухолевого роста *in vivo* (Рисунок 1Д). Таким образом, подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к ослаблению злокачественных характеристик клеток рака лёгкого и толстой кишки человека.



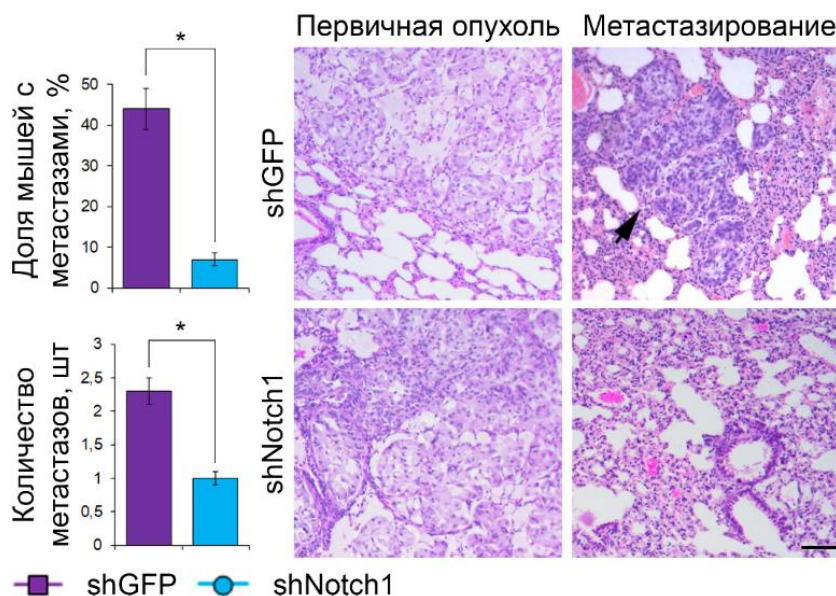
А. Микрофотографии клеток, масштаб – 20 мкм. Анализ скорости пролиферации (Б), миграционной активности (В) и способности к колониобразованию в адгезивных условиях (Г). Д. Динамика роста подкожных ксенографтов. * $p < 0,05$

Рисунок 1 – Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на морфологию и фенотип клеток А549 и НСТ116

Способность опухолевых клеток к метастазированию является одной из ключевых характеристик, определяющих опухолевую прогрессию, поэтому было изучено, как подавление экспрессии *NOTCH1* влияет на неё методом ортотопической ксенотрансплантации клеток А549. Подавление экспрессии *NOTCH1* снизило как частоту случаев метастазирования, так и количество самих метастазов (Рисунок 2).

Способность опухолевых клеток к метастазированию определяется, в том числе, пулом ОСК, поэтому был проведен один из первичных тестов по оценке доли ОСК в культуре – анализ туморогенности, которую определяли по минимальной прививочной дозе клеток *in vivo*.

Подавление экспрессии *NOTCH1* в клетках А549 и НСТ116 привело к увеличению минимальной прививочной дозы, то есть к снижению опухолевого потенциала (Таблица 2).



Подсчет количества метастазов, доли мышей с метастазами (слева) и иммуногистохимический анализ первичной опухоли в одной из долей лёгкого и метастазов в другой, стрелкой обозначен метастаз, масштаб – 100 мкм (справа). * $p < 0,05$

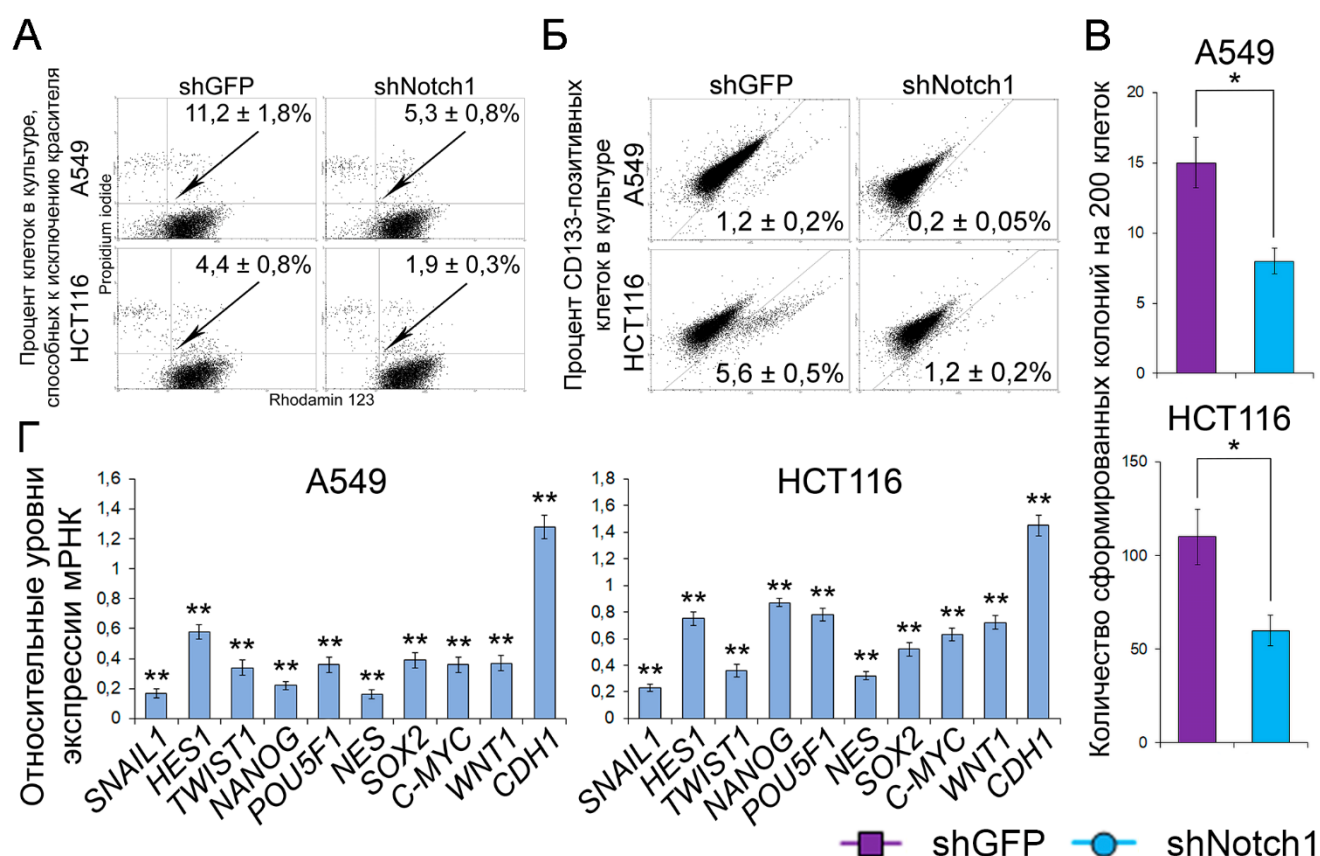
Рисунок 2 – Анализ способности к метастазированию клеток А549 при подавлении экспрессии *NOTCH1*

Таблица 2 – Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на опухоленность клеток А549 и НСТ116

Количество клеток в прививочной дозе, шт.	Число мышей со сформированными опухолями/ число мышей в группе, шт.	
	shGFP	shNotch1
Клеточная линия А549		
1×10^6	10/10	10/10
$0,5 \times 10^6$	10/10	10/10
$0,25 \times 10^6$	8/10	5/10
$0,125 \times 10^6$	6/10	0/10
Клеточная линия НСТ116		
2×10^6	10/10	8/10
1×10^6	10/10	5/10
$0,5 \times 10^6$	6/10	1/10
$0,25 \times 10^6$	2/10	0/10

Далее были проведены стандартные *in vitro* тесты по определению пула и фенотипа ОСК в культуре. Подавление экспрессии *NOTCH1* снижало долю клеток А549 и НСТ116, способных к исключению красителя (т.е. активность АВС-транспортеров) (Рисунок 3А) и продуцирующих

маркер ОСК – CD133 (Рисунок 3Б), а также способность к колониобразованию в полужидкой среде (Рисунок 3В). На основании анализа базы данных молекулярных путей KEGG PATHWAY Database (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) было выбрано несколько целевых генов сигнального пути Notch, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии. По данным ПЦР-РВ-анализа подавление экспрессии *NOTCH1* привело к снижению их экспрессии и повышению *CDH1* (Е-кадгерин, компонент адгезивных контактов) (Рисунок 3Г).



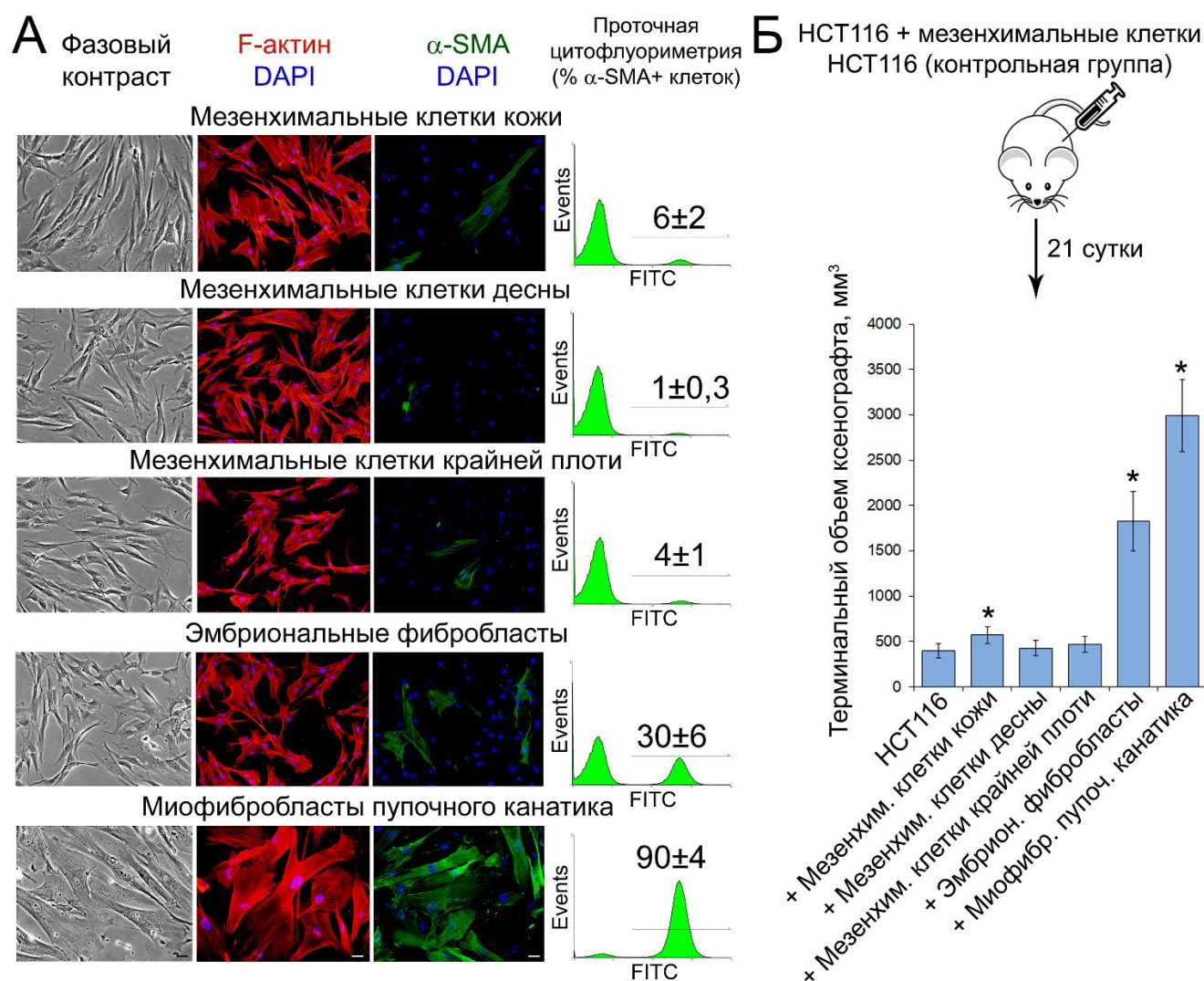
Цитофлуориметрический анализ активности ABC-транспортеров (А) и доли клеток, продуцирующих CD133 (Б). В. Анализ колониобразования в полужидкой среде. Г. ПЦР-РВ-анализ некоторых Notch-зависимых генов, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Рисунок 3 – Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к поддержанию пула и фенотипа ОСК A549 и HCT116

Таким образом, экспрессия *NOTCH1* вовлечена в прогрессию клеток линий карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека, в том числе в поддержание пула опухолевых клеток с фенотипом ОСК.

Способность первичных культур мезенхимальных клеток человека стимулировать опухолевый рост рака толстой кишки

В результате совместного подкожного введения мышам линии BALB/c nu/nu клеток линии НСТ116 и первичных культур мезенхимальных клеток человека различной гистогенетической принадлежности (кожа, десна, крайняя плоть, эмбриональные фибробласты и миофибробласты пупочного канатика (МФПК)) была выявлена прямая зависимость между долей α -SMA-позитивных клеток в культуре и их способностью стимулировать опухолевый рост (Рисунок 4). Наиболее ярко выраженной опухоль-стимулирующей способностью обладали МФПК, которые характеризовались более 90% α -SMA-позитивных клеток в культуре.



А. Микрофотографии, иммунофлуоресцентное окрашивание F-актина, α -SMA (ядра – DAPI, масштаб – 100 мкм) и цитофлуориметрический анализ доли α -SMA-позитивных клеток в культурах. **Б.** Диаграмма терминальных объёмов подкожных ксенографтов, сформированных смесью мезенхимальных клеток и НСТ116. * $p < 0,05$

Рисунок 4 – Способность первичных культур мезенхимальных клеток стимулировать опухолевый рост клеток рака толстой кишки НСТ116 *in vivo*

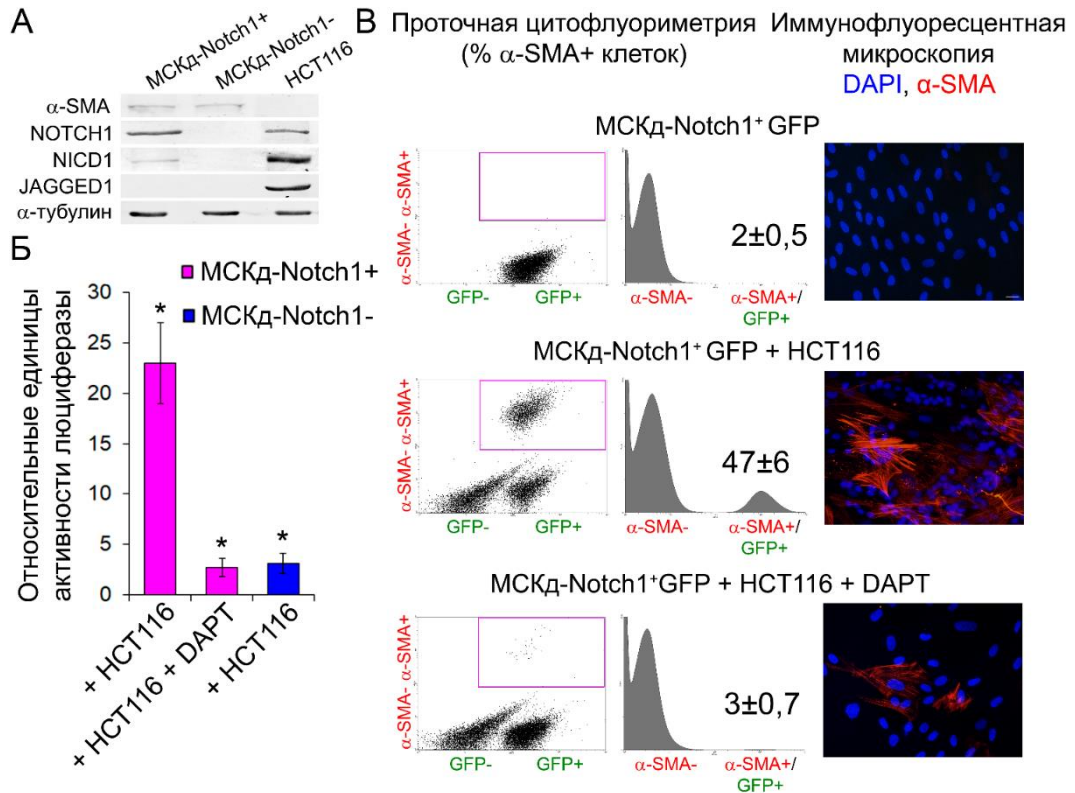
Notch-зависимый механизм α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

Одна из культур МСКд, характеризовавшаяся $2\pm 0,5\%$ α -SMA-позитивных клеток, обладала опухоль-стимулирующей способностью в отличие от второй культуры с $1\pm 0,3\%$ α -SMA-позитивных клеток. Было предположено, что опухоль-стимулирующая способность первой культуры МСКд может быть реализована посредством активности межклеточных сигнальных путей, обеспечивающих гетеротипические взаимодействия между опухолевыми и мезенхимальными клетками микроокружения, например Notch.

Действительно, МСКд, способные стимулировать опухолевый рост, характеризуются продукцией полноразмерного трансмембранного рецептора NOTCH1 (далее – МСКд-Notch1⁺), а вторые – нет (далее – МСКд-Notch1⁻). Клетки НСТ116 продуцируют лиганд сигнального пути Notch – JAGGED1 (Рисунок 5А), поэтому после контактного взаимодействия НСТ116 и МСКд-Notch1⁺ в мезенхимальных клетках может быть запущен сигнальный путь Notch. Основываясь на данном предположении, были проведены эксперименты по кокультивированию МСКд и НСТ116.

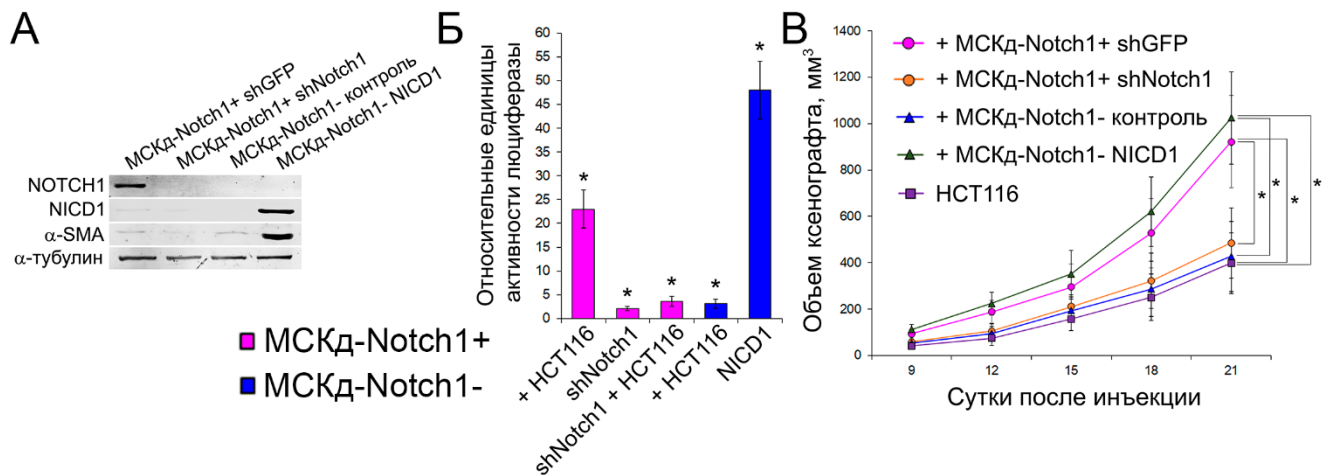
С помощью люциферазного анализа было выявлено повышение транскрипционной активности *NOTCH1* только в МСКд-Notch1⁺ RBP после их кокультивирования с НСТ116. Добавление ингибитора DAPT (полностью блокирует запуск сигнального пути Notch) в культуральную среду при кокультивировании МСКд-Notch1⁺ RBP и НСТ116 снизило транскрипционную активность *NOTCH1* в мезенхимальных клетках до исходного уровня (Рисунок 5Б). Контактное взаимодействие МСКд и НСТ116 приводило к увеличению доли α -SMA-позитивных клеток в культуре МСКд-Notch1⁺, в то время как доля α -SMA-позитивных клеток в МСКд-Notch1⁻ оставалась практически на исходном уровне (Рисунок 5В). Добавление DAPT в культуральную среду при кокультивировании МСКд-Notch1⁺ и НСТ116 снизило долю α -SMA-позитивных клеток практически до исходного уровня.

Для подтверждения вовлеченности экспрессии *NOTCH1* в изучаемый механизм были созданы модифицированные культуры МСКд-Notch1⁺ с подавленной экспрессией *NOTCH1* (shNotch1) и МСКд-Notch1⁻ с экзогенной экспрессией *NICD1*. В результате было выявлено значительное повышение продукции α -SMA в МСКд-Notch1⁻ *NICD1* (Рисунок 6А). Кокультивирование МСКд-Notch1⁺ shNotch1 RBP и НСТ116 не приводило к повышению транскрипционной активности *NOTCH1*, в то время как экзогенная экспрессия *NICD1* в МСКд-Notch1⁻ RBP повысила её (Рисунок 6Б). Кроме этого, подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к потере опухоль-стимулирующей способности МСКд-Notch1⁺, а экзогенная экспрессия *NICD1* в МСКд-Notch1⁻ – к её приобретению (Рисунок 6В).



А. Иммуноблоттинг. **Б.** Анализ транскрипционной активности *NOTCH1*. **В.** Цитофлуориметрический и иммунофлуоресцентный (ядра – DAPI, масштаб – 100 мкм) анализ доли α -SMA-позитивных MCKd-Notch1⁺ после контактного взаимодействия с HCT116. * $p < 0,05$

Рисунок 5 – Анализ компонентов сигнального пути Notch в MCKд и HCT116 и влияние их кокультивирования на запуск Notch в MCKд



А. Иммуноблоттинг. **Б.** Анализ транскрипционной активности *NOTCH1*. **В.** Динамика роста подкожных ксенографтов. * $p < 0,05$

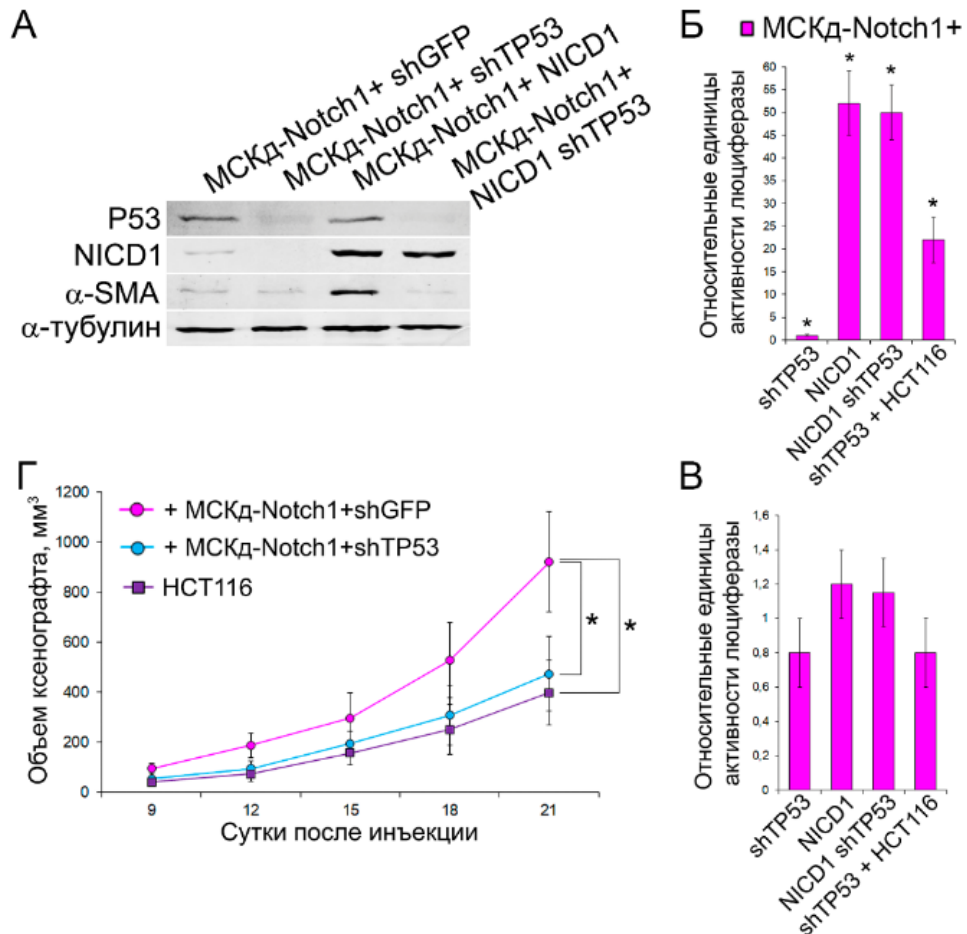
Рисунок 6 – Оценка вовлеченности экспрессии *NOTCH1* в α -SMA-позитивную дифференцировку MCKд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

Молекулы, вовлеченные в механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

На следующем этапе работы был изучен молекулярный механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности. Согласно литературным данным, опухолевый супрессор P53 дикого типа может регулировать экспрессию гена, кодирующего α -SMA, поэтому было решено проверить, может ли он быть задействован в данном механизме. Была создана модифицированная культура МСКд-Notch1⁺ NICD1 для проведения экспериментов без необходимости контактного взаимодействия МСКд и НСТ116. Методом РНК-интерференции в исходной МСКд-Notch1⁺ и модифицированной культуре МСКд-Notch1⁺ NICD1 была подавлена экспрессия *TP53*. Подавление экспрессии *TP53* не оказало влияния на продукцию NICD1, однако приводило к значительному снижению продукции α -SMA в культуре МСКд-Notch1⁺ NICD1 (Рисунок 7А). Подавление экспрессии *TP53* не оказало влияния на транскрипционную активность *NOTCH1* ни в исходных МСКд-Notch1⁺, ни при экзогенной экспрессии в них *NICD1*, ни при кокультивировании с НСТ116 (Рисунок 7Б). На основании полученных результатов, было решено изучить, как активность сигнального пути Notch влияет на транскрипционную активность *TP53*. Ни экзогенная экспрессия NICD1 в МСКд-Notch1⁺ и МСКд-Notch1⁺ shTP53, ни кокультивирование с НСТ116 клеток МСКд-Notch1⁺ shTP53 не приводили к изменению транскрипционной активности *TP53* (Рисунок 7В). Однако, подавление экспрессии *TP53* значительно снижало опухоль-стимулирующую способность МСКд-Notch1⁺ (Рисунок 7Г).

Таким образом, экспрессия *TP53* не задействована в индукции сигнального пути Notch в МСКд, однако она необходима для их дальнейшей α -SMA-позитивной дифференцировки и приобретения опухоль-стимулирующей способности, что свидетельствует о непосредственной вовлечённости P53 в качестве ко-фактора в изучаемый механизм.

На последнем этапе работы было решено изучить, продукцией каких молекул может быть обусловлена опухоль-стимулирующая способность дифференцированных МСКд-Notch1⁺. Согласно литературным данным, фактор роста опухолей TGF- β 1 играет значительную роль как в прогрессии опухолевых клеток, так и в приобретении фенотипа опухоль-ассоциированных фибробластов. Добавление TGF- β 1 в культуральную среду МСКд-Notch1⁺ значительно повысило долю α -SMA-позитивных мезенхимальных клеток в культуре, что свидетельствует о способности TGF- β 1 запускать механизм α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд-Notch1⁺.

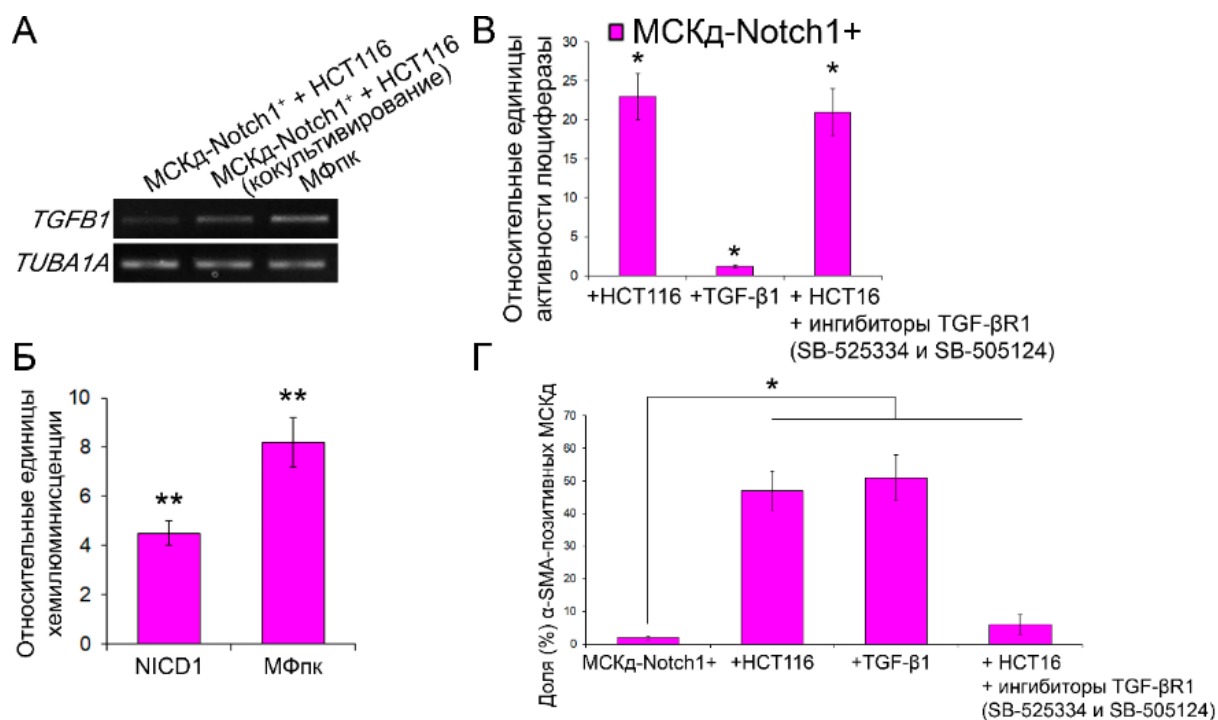


А. Иммуноблоттинг. Люциферазный анализ транскрипционной активности *NOTCH1* (**Б**) и *TP53* (**В**). **Г.** Динамика роста ксенографтов. * $p < 0,05$

Рисунок 7 – Роль P53 в механизме Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки MCKd с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

Анализ тотальной мРНК MCKd-Notch1⁺ и HCT116, культивированных совместно, выявил больше ПЦР-продукта *TGFBI* по сравнению со смесью мРНК MCKd-Notch1⁺ и HCT116, культивированных отдельно (Рисунок 8А). Уровень продукции TGF- β 1 в культуральную среду при экзогенной экспрессии *NICD1* в MCKd-Notch1⁺ возрастал по сравнению с исходной культурой (Рисунок 8Б). Таким образом, запуск сигнального пути Notch в MCKd приводит к повышению продукции ими TGF- β 1. Основываясь на полученных данных, было предположено, что α -SMA-позитивная дифференцировка MCKd-Notch1⁺ может осуществляться по механизму аутокринной регуляции через рецепторы TGF- β R1, которые присутствуют у MCKd-Notch1⁺. Ни добавление TGF- β 1 в культуральную среду MCKd-Notch1⁺ RBP, ни ингибиторов TGF- β R1 в культуральную среду при кокультивировании MCKd-Notch1⁺ RBP и HCT116 не оказало влияния на уровень транскрипционной активности *NOTCH1* (Рисунок 8В). Таким образом, активность сигнального пути Notch не зависит от TGF- β 1-сигналинга. Однако, добавление

ингибиторов TGF- β R1 в культуральную среду МСКд-Notch1⁺ снижало долю α -SMA-позитивных клеток как в исходной культуре, так и при кокультивировании с НСТ116 (Рисунок 8Г).



А. ПЦР-анализ экспрессии *TGFβ1* (МФкк – положительный контроль). **Б.** ИФА TGF- β 1 в культуральной среде МСКд-Notch1⁺ при экзогенной экспрессии *NICD1* (МФкк – положительный контроль). **В.** Люциферазный анализ транскрипционной активности *NOTCH1* в МСКд-Notch1⁺ RBP. **Г.** Цитофлуориметрический анализ доли α -SMA-позитивных клеток в культуре МСКд-Notch1⁺. * p < 0,05, ** p < 0,01

Рисунок 8 – Роль TGF- β 1 в механизме Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

Таким образом, запуск сигнального пути Notch в Notch1-позитивных МСКд стимулирует продукцию ими TGF- β 1, а дальнейшая α -SMA-позитивная дифференцировка МСКд в культуре может осуществляться по механизму аутокринной регуляции через рецепторы TGF- β R1.

Универсальность механизма Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд

В завершение работы было изучено, насколько универсальным является механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСКд. Контактное взаимодействие МСКд-Notch1⁺ и клеток линий немелкоклеточного рака лёгкого А549, толстой кишки LIM1215, фибросаркомы HT1080 и гепатокарциномы HEPG2 человека приводило к

повышению транскрипционной активности *NOTCH1* и увеличению доли α -SMA-позитивных МСКд-Notch1⁺ в культуре. Таким образом, был изучен механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСК с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности, реализуемый посредством контактного взаимодействия МСК, характеризующихся наличием рецептора NOTCH1, и опухолевых клеток, продуцирующих хотя бы один из лигандов сигнального пути Notch, который достоверно способен связываться с NOTCH1 (Рисунок 9).

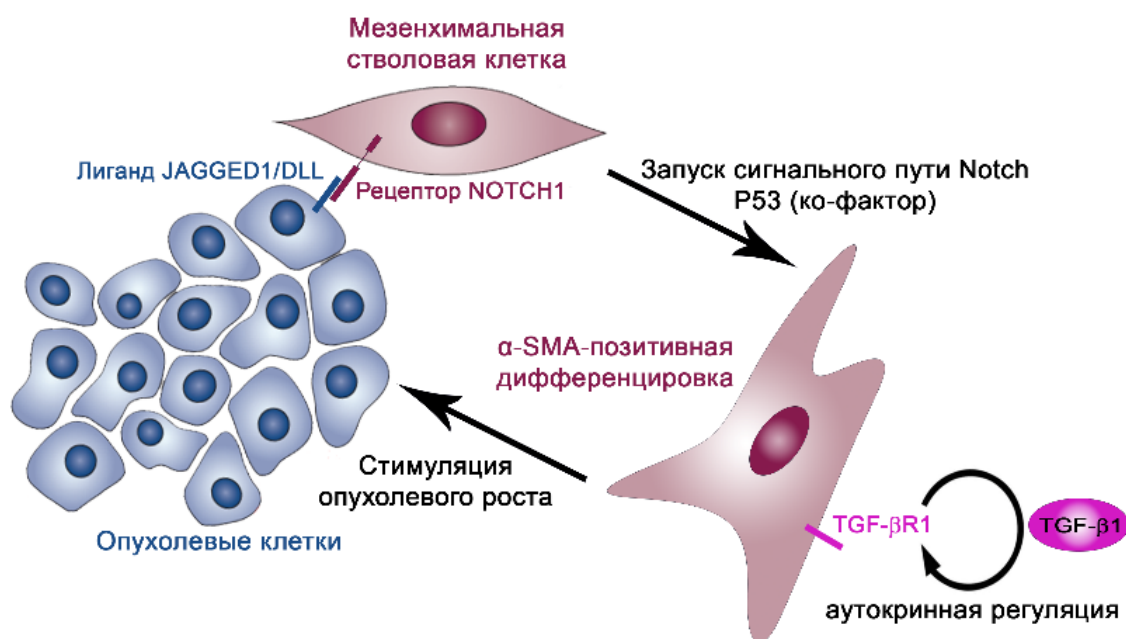


Рисунок 9 – Схема механизма Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСК с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия *NOTCH1* вовлечена в прогрессию клеток линий карцином лёгкого A549 и толстой кишки HCT116 человека, в том числе в поддержание пула опухолевых клеток с фенотипом опухолевых стволовых клеток.
2. Выявлена прямая зависимость между долей мезенхимальных клеток в культуре, позитивных по α -гладкомышечному актину (α -SMA), и их опухоль-стимулирующей способностью *in vivo*.
3. Взаимодействие JAGGED1-позитивных клеток линии HCT116 индуцирует запуск сигнального пути Notch в NOTCH1-позитивных мезенхимальных стволовых клетках, что приводит к их дифференцировке, позитивной по α -гладкомышечному актину, и приобретению опухоль-стимулирующей способности.

4. Опухолевый супрессор P53 вовлечён в качестве ко-фактора в механизм Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.

5. Фактор TGF- β 1 действует по механизму аутокринной регуляции при Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности.

6. Механизм α -SMA-позитивной дифференцировки NOTCH1-позитивных мезенхимальных стволовых клеток запускается при их взаимодействии с опухолевыми клетками различной гистогенетической принадлежности, продуцирующими лиганд(-ы) сигнального пути Notch – JAGGED1 или DLL.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Использованный комплексный подход к оценке злокачественности фенотипа опухолевых клеток может быть экстраполирован на другие клеточные линии и их генно-модифицированные производные. В первую очередь рекомендуется изучить клеточный фенотип, морфологию и провести тесты на скорость клеточной пролиферации, способность к колониобразованию в адгезивных условиях, миграционную активность, исследовать динамику роста ауто- или ксенографтов. Затем рекомендуется оценить пул и фенотип ОСК в исследуемой культуре следующими методами: анализ активности АВС-транспортёров на способность к исключению красителя/-ей, анализ колониобразования в полужидкой среде, анализ экспрессии и/или продукции специфических маркеров и анализ способности к метастазированию и туморогенности (предпочтительно ортотопическое введение). Дополнительно рекомендуется исследовать активность сигнальных путей и/или экспрессию их компонентов (на уровне мРНК и/или белка), связанных с исследуемыми молекулярными механизмами.

Разработанную в рамках настоящего исследования клеточную модель можно использовать для воссоздания механизмов взаимодействия опухоли со стромальным микроокружением. При совместном культивировании опухолевых и мезенхимальных клеток рекомендуется сначала сеять на культуральный пластик последние в нескольких повторах, выращивать до субконфлюэнтного монослоя, считать, поверх сеять опухолевые клетки в равном количестве и, спустя 3–5 суток, проводить необходимые эксперименты. При подкожной ауто- или ксенотрансплантации лабораторным животным рекомендуется вводить смесь опухолевых и мезенхимальных клеток в пропорции 1:2,5–5. В качестве контроля рекомендуется подкожно ввести в противоположный бок такое же количество опухолевых клеток, как в смеси.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные данные вносят вклад в раскрытие механизмов канцерогенеза, осуществляемых посредством гетеротипических межклеточных взаимодействий через сигнальные пути. Перспективами дальнейшей разработки темы являются:

1. Поиск с помощью биоинформатических методов Notch-зависимых молекул, ассоциированных с механизмами опухолевой прогрессии, их подтверждение в лабораторных условиях, подбор и разработка соответствующих ингибиторов.

2. Изучение дистантного механизма Notch-индуцированной α -SMA-позитивной дифференцировки МСК с приобретением ими опухоль-стимулирующей способности, реализуемого посредством внеклеточных везикул опухолевых клеток, что вносит вклад в понимание механизмов формирования дистантных ниш при метастазировании.

3. Изучение влияния дифференцированных α -SMA-позитивных МСК, обладающих опухоль-стимулирующей способностью, на фенотип опухолевых клеток, в том числе на пул и фенотип ОСК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Notch-dependent crosstalk between stromal and neoplastic cells / V. Rybko, N. Khromova, M. Farmakovskaya, **M. Novikova**, B. Kopnin, P. Kopnin // European Journal of Cancer Supplements. – 2015. – Vol. 13. – № 1. – P. 48.

2. Роль белков Notch в процессах канцерогенеза / **М.В. Новикова**, В.А. Рыбко, Н.В. Хромова, М.Д. Фармаковская, П.Б. Копнин // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2. – № 3. – С. 30-42.

3. Роль Notch во взаимодействии трансформированных и нормальных клеток / В.А. Рыбко, Н.В. Хромова, М.Д. Фармаковская, **М.В. Новикова**, П.Б. Копнин // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2. – № 4. – С. 39.

4. Раздел 1. Фундаментальные основы молекулярной онкологии, сигнальные пути опухолевых клеток, Notch-сигналинг: Молекулярный канцерогенез / **М.В. Новикова**, П.Б. Копнин; под редакцией М.А. Красильникова и И.Б. Зборовской; Министерство здравоохранения Российской Федерации, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина. – Москва: ООО «Издательский дом «АБВ-пресс», 2016. – 416 с.; 148 × 210 мм. – Авт. указаны на с. 3–4. – Библиогр.: с. 25–33. – 500 экз. – УДК 616-006-02:577.2.

5. **Novikova, M.V.** Components of the Hepatocellular Carcinoma Microenvironment and Their Role in Tumor Progression / M.V. Novikova, N.V. Khromova, P.B. Kopnin // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – Vol. 82. – № 8. – P. 861-873.

6. Роль сигнального пути Notch в регуляции опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки / **М.В. Новикова**, Н.В. Хромова, В.А. Рыбко, В.Б. Дугина, Б.П. Копнин, П.Б. Копнин // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2018. – Т. 5. – № 4. – С. 51-52.

7. Notch signalling pathway plays a crucial role in maintaining the cancer stem cell population in lung and colorectal cancer / **M. Novikova**, N. Khromova, V. Rybko, V. Dugina, B. Kopnin, P. Kopnin // *ESMO Open*. – 2018. – Vol. 3. – № S2. – P. A52-A53.

8. Notch-dependent tumorigenic mechanism associated with exosome signaling / **M. Novikova**, N. Khromova, V. Rybko, B. Kopnin, P. Kopnin // *ESMO Open*. – 2018. – Vol. 3. – № S2. – P. A331–A332.

9. **Новикова, М.В.** Сигнальный путь Notch: двоякая роль в опухолевой прогрессии и терапевтические возможности при раке мочевого пузыря / М.В. Новикова, Б.П. Копнин, П.Б. Копнин // *Онкоурология*. – 2019. – Т. 15. – № 1. – С. 108–116.

10. Cytoplasmic actin isoforms influence on CSC-like properties / V. Dugina, **M. Novikova**, O. Sokova, B. Kopnin, P. Kopnin. // *Annals of Oncology*. – 2020. – Vol. 31. – № S5. – P. S1236.

11. Notch- and P53-dependent crosstalk between tumour and stromal cells / **M. Novikova**, V. Dugina, B. Kopnin, N. Khromova, P. Kopnin // *Annals of Oncology*. – 2020. – Vol. 31. – № S5. – P. S1236.

12. The Design, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrole-Based Carboxamides: The Novel Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine-Binding Site / S. Boichuk, A. Galembikova, K. Syuzov, P. Dunaev, F. Bikinieva, A. Aukhadieva, S. Zyкова, N. Igidov, K. Gankova, **M. Novikova**, P. Kopnin // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 19. – P. 5780. (**Журнал ВАК**)

13. Significance of NOTCH1 Expression in the Progression of Human Lung and Colorectal Cancers / **M.V. Vasileva**, N.V. Khromova, B.P. Kopnin, V.B. Dugina, P.B. Kopnin // *Biochemistry (Moscow)*. – 2022. – Vol. 87. – № 10. – P. 1199-1205. (**Журнал ВАК**)

14. Transcriptome of Lung Cancer Cells Resistant to the Cytotoxic Activity of Macrophages / O.V. Kovaleva, P.A. Podlesnaya, **M.V. Vasileva**, P.B. Kopnin, A.S. Balkin, A.O. Plotnikov, N.E. Kushlinskii, A.N. Gratchev // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2022. – Vol. 507. – № 1. – P. 312-317. (**Журнал ВАК**)