

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-97-105>

Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на формирование фенотипа опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки человека

М.В. Васильева¹, Н.В. Хромова¹, С.В. Бойчук^{2–4}, П.Б. Копнин¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49;

³Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;

⁴ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Павел Борисович Копнин pbkopnin@mail.ru

Введение. Рак легкого и колоректальный рак являются одними из самых распространенных типов злокачественных новообразований, характеризующихся неблагоприятным прогнозом. Опухолевая прогрессия обусловливается aberrантной активностью межклеточных сигнальных путей, которая может возникать за счет мутаций в генах, кодирующих их компоненты. В частности, онкогенная роль рецептора NOTCH1 сигнального пути Notch доказана для различных типов рака, включая рак легкого и колоректальный рак. В рамках настоящего исследования мы изучали важность продукции рецептора NOTCH1 для прогрессии данных типов злокачественных новообразований.

Цель исследования – изучение роли экспрессии *NOTCH1* в поддержании пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток (ОСК) карцином легкого и толстой кишки человека.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на полученных ранее клеточных линиях карцином легкого A549 и толстой кишки HCT116 человека с подавленной экспрессией *NOTCH1*. В первую очередь было изучено влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к метастазированию клеток A549 и туморогенность клеток A549 и HCT116 при их введении иммунодефицитным бестимусным мышам линии BALB/c nu/nu. Далее были проведены тесты *in vitro* по определению пула и фенотипа ОСК в культуре опухолевых клеток: цитофлуориметрический анализ активности ABC-транспортёров (выявление способности к выведению красителя во внешнюю среду) и анализ колониеобразования в полужидкой среде. В заключение определены доля клеток в культуре, продуцирующих маркер ОСК (CD133), методом проточной цитофлуориметрии и уровень экспрессии некоторых генов, продукты которых ассоциированы с фенотипом ОСК (*NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*), с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению числа экспериментальных животных с метастазами и количества сформированных метастатических очагов, а также к увеличению минимальной прививочной дозы. Активность ABC-транспортёров, способность к неприкрепленному росту, доля CD133-положительных клеток в культуре и экспрессия генов, продукты которых связаны с поддержанием пула и фенотипа ОСК, снижались при подавлении экспрессии *NOTCH1* в обеих клеточных линиях.

Заключение. Экспрессия гена, кодирующего рецептор NOTCH1, важна для поддержания пула и фенотипа ОСК карцином легкого и толстой кишки человека. Полученные данные могут представлять ценность при разработке противоопухолевых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: рак легкого, колоректальный рак, сигнальный путь Notch, опухолевая прогрессия, метастазирование, опухолевые стволовые клетки

Для цитирования: Васильева М.В., Хромова Н.В., Бойчук С.В., Копнин П.Б. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на формирование фенотипа опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки человека. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):97–105.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-97-105>

The effect of *NOTCH1* knockdown on the phenotype of human lung and colon cancer stem cells

M.V. Vasileva¹, N.V. Khromova¹, S.V. Boichuk²⁻⁴, P.B. Kopnin¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;

³Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University;

18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia;

⁴Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia

Contacts: Pavel Borisovich Kopnin pbkopnin@mail.ru

Introduction. Lung and colorectal cancers are the most common cancer types, characterized by a poor prognosis. Tumor progression is also caused by the aberrant activity of intercellular signaling pathways, which can arise due to mutations in genes encoding their components. In particular, the oncogenic role of NOTCH1 receptor of Notch signaling pathway has been proven for various cancer types, including lung and colorectal cancers. In this research, we delved deeper into the importance of NOTCH1 receptor expression for the progression of these malignancies.

Aim. To investigate the importance of *NOTCH1* expression in maintaining the cancer stem cell (CSC) pool and phenotype of human lung and colon cancers.

Materials and methods. Experiments were performed on previously obtained *NOTCH1* knockdown cell lines of human lung A549 and colon HCT116 carcinomas. First of all, we studied the effect of *NOTCH1* knockdown on the metastatic ability of A549 cells and the tumorigenicity of A549 and HCT116 cells when injected to immunodeficient BALB/c nu/nu mice. Next, we carried out *in vitro* tests to determine CSC pool and phenotype in tumor cell culture: cytofluorimetric analysis of ABC-transporters activity to exclude dye to the external environment and analysis of colony formation in a semi-liquid medium. In conclusion, we assessed the proportion of cells in the culture producing the CSC marker – CD133 using flow cytometry and the expression level of some genes associated with CSC phenotype (*NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*) using real-time polymerase chain reaction.

Results. *NOTCH1* knockdown decreased the number of experimental animals with metastases, the number of formed metastatic foci and increased in the minimum cell inoculation dose. The activity of ABC-transporters, the ability for un-attached growth, the proportion of CD133-positive cells in culture, and the expression of genes associated with maintaining of CSC pool and phenotype decreased under *NOTCH1* knockdown in both cell lines.

Conclusion. *NOTCH1* expression is important for maintaining CSC pool and phenotype of human lung and colon carcinomas. The obtained data may be valuable in the development of anticancer therapies.

Keywords: lung cancer, colorectal cancer, Notch signaling pathway, tumor progression, metastasis, cancer stem cells

For citation: Vasileva M.V., Khromova N.V., Boichuk S.V., Kopnin P.B. The effect of *NOTCH1* knockdown on the phenotype of human lung and colon cancer stem cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(2):97–105. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-97-105>

ВВЕДЕНИЕ

Рак легкого и колоректальный рак являются одними из самых распространенных типов злокачественных новообразований (ЗНО), характеризующихся неблагоприятным прогнозом. По данным Национального института онкологии США (National Cancer Institute, NCI), в 2023 г. на рак легкого и бронхов приходилось 12,2 % всех диагностированных случаев онкологических заболеваний и 20,8 % случаев летальных исходов от данной патологии, а на колоректальный рак — 7,8 и 8,6 % случаев соответственно [1, 2].

Опухолевая прогрессия обуславливается aberrантной активностью межклеточных сигнальных путей, которая может возникать за счет мутаций генов, кодирующих их компоненты. В частности, онкогенная роль рецептора NOTCH1 — сигнального пути Notch — дока-

зана для многих типов рака. По данным о геномных исследованиях портала Национального института онкологии США «Общедоступные сведения о геномных данных» «Атласа ракового генома» (Genomic Data Commons, The Cancer Genomic Atlas, GDC TCGA) [3, 4], соматические мутации и увеличение числа копий *NOTCH1* часто встречаются при аденокарциноме легкого и толстой кишки (рис. 1, а). На основании статистического анализа, выполненного с помощью онлайн-инструмента по исследованию функциональной геномики (Xena Functional Genomics Explorer, Калифорнийский университет, Санта-Круз; <https://xenabrowser.net/>), соответствующих выборок GDC TCGA, можно заключить, что количество матричной РНК (мРНК) *NOTCH1* достоверно повышено в первичных опухолевых очагах данных типов рака (рис. 1, б).

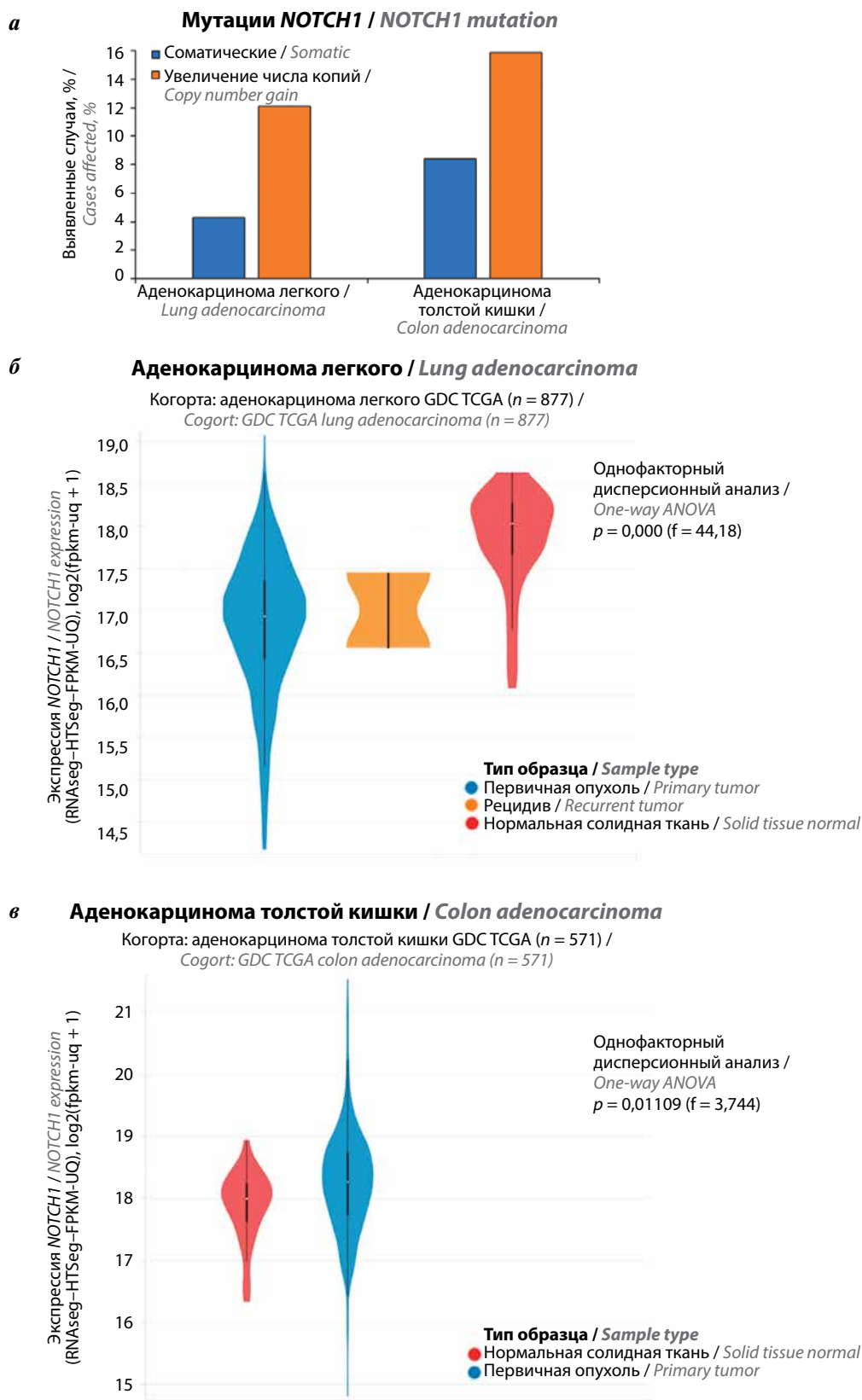


Рис. 1. Частота обнаружения мутаций NOTCH1 (а) и однофакторный дисперсионный анализ экспрессии NOTCH1 в образцах аденокарциномы легкого (б) и толстой кишки (в). GDC TCGA – портал «Общедоступные сведения о геномных данных» «Атласа ракового генома»
Fig. 1. NOTCH1 mutation rate (a) and one-way Anova of NOTCH1 expression (б) in lung and colon adenocarcinoma samples. GDC TCGA – Genomic Data Commons, The Cancer Genomic Atlas

Ранее методом РНК-интерференции нами были получены клетки линий карциномы легкого A549 и толстой кишки HCT116 человека с подавленной экспрессией *NOTCH1*. Мы изучили, как ее подавление влияет на их основные биологические характеристики *in vitro* и *in vivo*: морфологию, скорость пролиферации, способность к колониеобразованию в адгезивных условиях, миграционную активность и динамику роста подкожных ксенографтов. В результате было выявлено, что подавление экспрессии *NOTCH1* приводит к снижению злокачественных характеристик клеток обеих линий [5].

Исследование роли сигнального пути Notch и его компонентов в опухолевой прогрессии не теряет свою актуальность, поскольку для разработки высокоэффективных терапевтических стратегий требуется детальное изучение причин изменения характеристик опухолевых клеток. Популяция опухоль-инициирующих клеток была выявлена при изучении гетерогенной культуры клеток острого миелоидного лейкоза около 30 лет назад. Впоследствии клетки, обладающие способностью формировать опухоли *in vivo* и схожие по характеристикам со стволовыми клетками (СК) соответствующего гистогенетического происхождения, были обнаружены в подавляющем большинстве ЗНО. Они получили название опухолевых стволовых клеток (ОСК). На сегодняшний день доказано, что именно формирование и поддержание пула опухолевых клеток с фенотипом ОСК в значительной степени обеспечивают ключевые этапы опухолевой прогрессии: метастазирование, рецидивирование, формирование лекарственной устойчивости и пр. [6].

Таким образом, **цель исследования** — изучение влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к поддержанию пула и фенотипа ОСК карцином легкого и толстой кишки человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе использованы полученные ранее методом РНК-интерференции клеточные линии карцином легкого A549 (ATCC® CCL-185™) и толстой кишки HCT116 (ATCC® CCL-247™) человека с подавленной экспрессией *NOTCH1* (shNotch1) или *GFP* (shGFP, контроль) [5]. Клетки выращивали в среде для культивирования эукариотических клеток HyClone DMEM high glucose (Cytiva, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки HyClone Defined Fetal Bovine Serum (Cytiva, США) и 20 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия), в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C.

Эксперименты с участием лабораторных животных. Исследования проводили на самках иммунодефицитных бестимусных мышей линии BALB/c nu/nu в возрасте 7–8 нед, массой тела 15–20 г. Количество животных в каждой группе составляло 10 особей. По окончании экспериментов проводили эвтаназию животных

с последующим извлечением необходимого биологического материала.

Для анализа способности к метастазированию клеток линии A549 животным вводили в одну из долей легкого суспензию 10⁶ клеток в стерильном физиологическом растворе. Введение осуществляли поперек грудной клетки с правой стороны выше реберной дуги в верхней точке реберно-ключичной перпендикулярной линии. Длительность эксперимента составляла 28 сут. Образцы ткани легких, содержащие первичную опухоль и метастазы, подвергали иммуногистохимическому анализу. Анализ срезов проводили с помощью микроскопа Axioplan 2 с использованием объектива 100×/1,30 (Carl Zeiss, Германия). Количество метастатических очагов подсчитывали вручную.

Для определения минимальной прививочной дозы (анализ туморогенности) клеток линий A549 или HCT116 животным подкожно вводили суспензии, содержащие концентрации клеток в диапазоне 0,125–2 × 10⁶, в стерильном физиологическом растворе. На 7-е сутки после введения пальпацией определяли наличие сформированного ксенографта.

Цитофлуориметрический анализ. Для анализа способности к исключению клетками красителя использовали родамин 123 (R8004, Sigma-Aldrich, США) и пропидий йодид (P4170, Sigma-Aldrich, США). Сигнал детектировали на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) [7].

Для анализа доли CD133-положительных клеток в культуре клетки фиксировали 2 % раствором параформальдегида, затем холодным (–20 °C) чистым метанолом. Клетки инкубировали с первичными антителами к CD133 (ab19898, Abcam, США), затем со вторичными антителами Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ с использованием программного обеспечения Cell Quest software (BD Biosciences, США).

Анализ способности к колониеобразованию в полужидкой среде. Клетки высевали в количестве 200 шт. на 10-сантиметровую чашку Петри с неадгезивным для эукариотических клеток покрытием дна, инкубировали 14 сут в полужидкой среде (2,6 % раствор метилцеллюлозы и среда HyClone DMEM, содержащая 20 % эмбриональной телячьей сыворотки, в пропорции 1:1), окрашивали водным раствором кристаллического фиолетового («ПанЭко», Россия) и охлаждали до 4 °C в течение 10 ч. Количество и размер колоний рассчитывали с помощью программы Total Lab версии 2.0, используя модуль Colony Counter (Nonlinear Dynamics, США).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Реакцию проводили на амплификаторе для полимеразной цепной реакции (ПЦР) Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США) с использованием реагента SYBR Green I («Евроген», Россия). С помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, США) получены значения Ct для целевых и референсного (*TUBA1A*) генов. Относительные уровни

Таблица 1. Праймеры и размеры соответствующих продуктов полимеразной цепной реакции

Table 1. Primers and the size of the corresponding polymerase chain reaction products

Ген Gene	Последовательности праймеров (5'→3') Primer sequences (5'→3')	Размер продукта, п.о. Product size, b.p.
<i>NANOG</i>	F-AAGGTCCCGGTCAAGAAACAG R-CTTCTGCGTCACACCATTGC	237
<i>POU5F1</i>	F-GTGTTTCAGCCAAAAGACCATCT R-GGCCTGCATGAGGGTTTCT	156
<i>SOX2</i>	F-TGGACAGTTACGCGCACAT R-CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	215
<i>TUBA1A</i>	F-GTTGGTCTGGAATTCTGTCAG R-AAGAAGTCCAAGCTGGAGTTC	288

Примечание. F – последовательность прямого праймера; R – последовательность обратного праймера.

Note. F – forward primer sequence; R – reverse primer sequence.

экспрессии вычислены с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Экспрессию каждого гена нормировали относительно его экспрессии в клетках shGFP соответствующей линии, которую принимали за единицу. Используемые в работе пары праймеров («Евроген», Россия) и размеры получаемых продуктов представлены в табл. 1.

Статистический анализ. Данные на диаграммах и графиках представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего по результатам минимум трех независимых экспериментов. Статистическую обработку первичных данных проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA версии 13.3. Для оценки различий между группами shGFP и shNotch1 применяли U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первую очередь мы изучили, может ли подавление экспрессии *NOTCH1* влиять на способность опухолевых клеток к метастазированию. Проведен эксперимент по ортотопическому введению ранее полученных клеток карциномы легкого человека A549 с подавленной экспрессией *NOTCH1* бестимусным иммунодефицитным мышам линии BALB/c nu/nu. В качестве контроля использовали клетки A549 с подавленной экспрессией *GFP*. Экспериментальным животным вводили клетки в одну из долей легкого и спустя время анализировали наличие метастазов в других его долях. Подавление экспрессии *NOTCH1* снизило частоту случаев метастазирования и количество метастатических очагов (рис. 2).

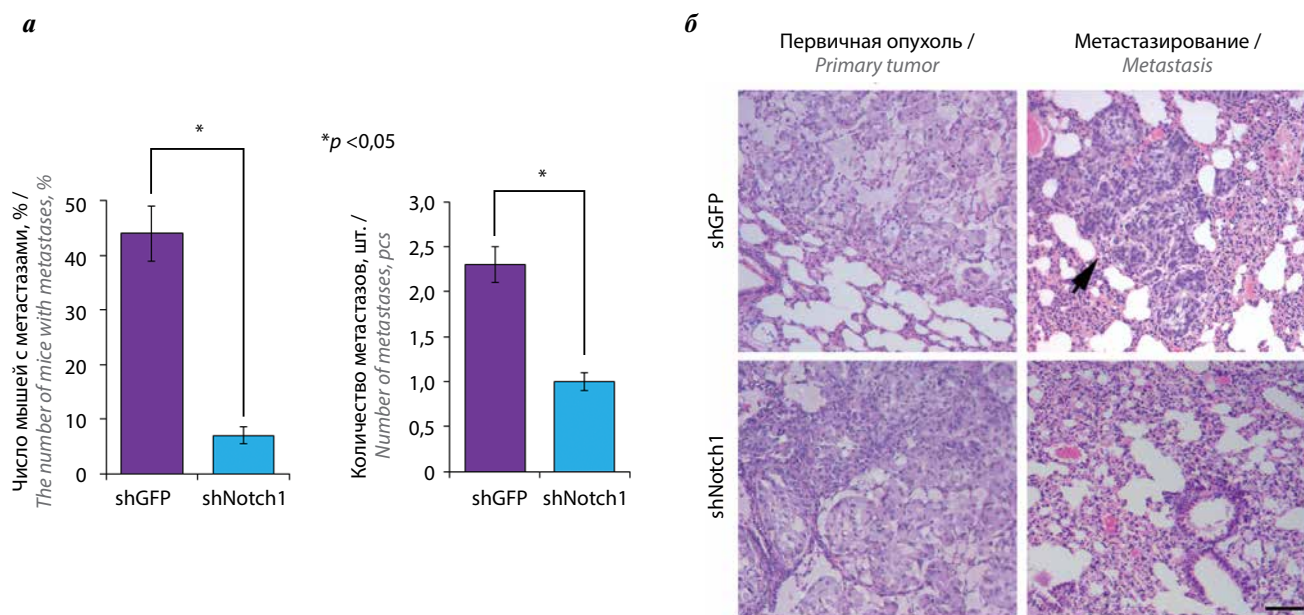


Рис. 2. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на способность клеток A549 к метастазированию. Статистический (а) и иммуногистохимический (б) анализы первичной опухоли в одной из долей легкого и метастазов в других. На рис. б стрелкой обозначен метастаз, масштаб 100 мкм
Fig. 2. The effect of *NOTCH1* knockdown on the ability of A549 cells to metastasize. Statistical (a) and immunohistochemical (b) analyses of the primary tumor located in one of the lung lobes and metastases in the others. In fig. б the arrow indicates metastasis, scale 100 μ m

Таблица 2. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на туморогенность клеток *A549* и *HCT116*
Table 2. The effect of *NOTCH1* knockdown on tumorigenicity of *A549* and *HCT116* cells

Количество клеток в прививочной дозе, шт. The number of cells in inoculation dose, pcs	Число мышей со сформированными опухолями/число мышей в группе, шт. Number of mice with formed tumors/number of mice in the group, pcs	
	shGFP	shNotch1
Клеточная линия <i>A549</i> <i>A549 cell line</i>		
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 <i>HCT116</i> <i>HCT116 cell line</i>		
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

Способность опухолевых клеток к метастазированию может обуславливаться пулом клеток с фенотипом ОСК, поэтому мы провели анализ туморогенности (определение минимальной прививочной дозы) ранее полученных клеток карциномы легкого *A549* и толстой кишки *HCT116* человека с подавленной экспрессией *NOTCH1*. В качестве контроля использовали клетки соответствующей линии с подавленной экспрессией *GFP*. Подавление экспрессии *NOTCH1* привело к увеличению минимальной прививочной дозы клеток, т. е. к снижению их туморогенного потенциала, для обеих линий (табл. 2). Прививаемость клеток представлена как отношение числа мышей со сфор-

мированными ксенографтами к общему числу животных в группе.

Поскольку полученные данные свидетельствуют о потенциальной вовлеченности *NOTCH1* в поддержание пула клеток с фенотипом ОСК, мы провели стандартные тесты *in vitro* по определению таких клеток в культуре. Цитофлуориметрический анализ активности АВС-транспортеров выявил снижение доли клеток, способных к исключению красителя родамин 123, при подавлении экспрессии *NOTCH1* в обеих линиях (рис. 3, а). Эффективность колониеобразования в полужидкой среде клеток с подавленной экспрессией *NOTCH1* также уменьшилась в обеих линиях (рис. 3, б).

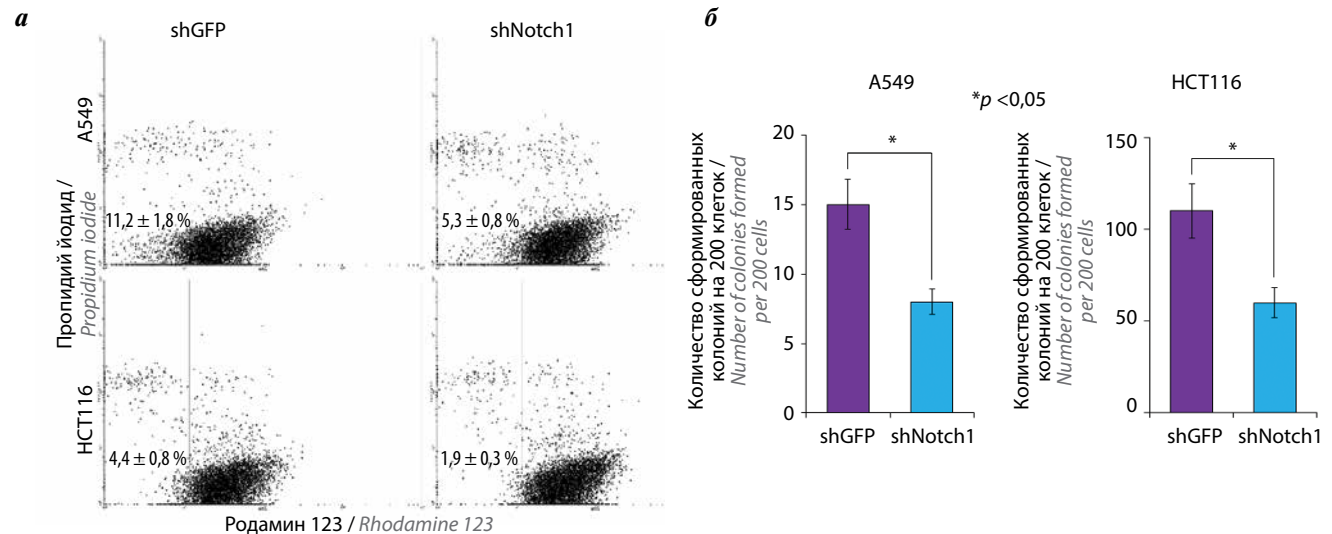


Рис. 3. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* на способность к поддержанию пула и фенотипа опухолевых стволовых клеток *A549* и *HCT116*. Цитофлуориметрический анализ активности АВС-транспортеров на способность к исключению красителя родамин 123 (а) и анализ колониеобразования в полужидкой среде (б)
Fig. 3. The effect of *NOTCH1* knockdown on the ability to maintain cancer stem cells pool and phenotype of *A549* and *HCT116* cells. Cytofluorimetric analysis of the activity of ABC-transporters for the ability to exclude the rhodamine 123 dye (a) and the ability of colony forming in a semi-liquid medium (b)

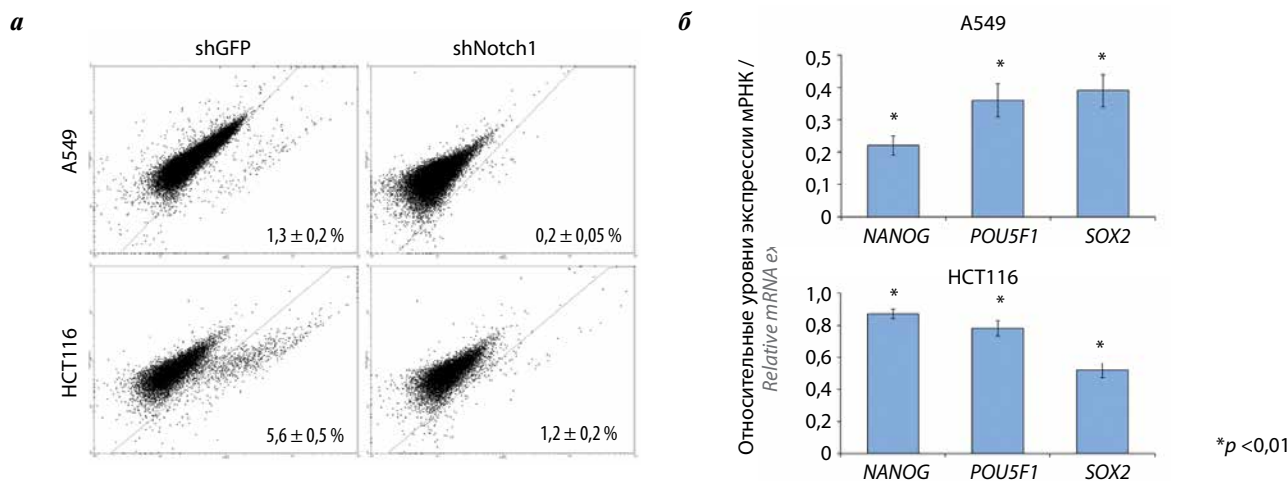


Рис. 4. Влияние подавления экспрессии *NOTCH1* в клетках A549 и HCT116 на продукцию маркера опухолевых стволовых клеток CD133 (а) и экспрессию некоторых генов, продукты которых вовлечены в поддержание данного фенотипа (б). мРНК - матричная РНК
Fig. 4. The effect of *NOTCH1* knockdown in A549 and HCT116 cells on the production of cancer stem cell marker CD133 (a) and the expression of some genes involved in maintaining of this phenotype (b). mRNA - matrix RNA

Современные методы детекции доли клеток в культуре с фенотипом ОСК часто основаны на анализе маркеров клеточной поверхности. Цитофлуориметрический анализ количества клеток, продуцирующих маркер ОСК CD133, выявил его уменьшение при подавлении экспрессии *NOTCH1* в обеих линиях (рис. 4, а). Увеличение уровня экспрессии генов, продукты которых вовлечены в поддержание стволовости, может также свидетельствовать о наличии пула клеток с фенотипом ОСК. По данным ПЦР в реальном времени подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению экспрессии некоторых генов, вовлеченных в поддержание стволовости (*NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*), в клетках обеих линий (рис. 4, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о снижении злокачественных характеристик клеток карцином легкого и толстой кишки человека при подавлении экспрессии *NOTCH1* [5]. С учетом того, что сигнальный путь Notch вовлечен в поддержание пула и фенотипа СК как при эмбриональном развитии, так и во взрослом организме, он также может принимать участие в поддержании пула и фенотипа ОСК при ЗНО. Активирующие мутации *NOTCH1* и *NOTCH3* выявлены у пациентов с аденокарциномой легкого. Данные мутации могут быть ассоциированы с потерей экспрессии гена *NUMB*, белковый продукт которого задействован в определении клеточной судьбы [8, 9]. На мышиной модели показано, что гиперпродукция функционального Notch1 способна вызывать образование аденокарциномы легкого и благоприятствует опухолевой прогрессии, в том числе метастазированию [10]. *NOTCH3* при *KRAS*-ассоциированной аденокарциноме легкого является ключевым акти-

ватором комплекса PKC ϵ -ELF3-NOTCH3, который задействован в асимметричном делении опухоле-иницирующих клеток, что обеспечивает их самообновление, клональную экспансию и опухолевую прогрессию [11].

В физиологии нормального желудочно-кишечного тракта активность сигнального пути Notch необходима для поддержания гомеостаза эпителия кишечника, в частности для регулирования дифференцировки бокаловидных и СК кишечных крипт толстой кишки. При колоректальном раке часто обнаруживаются значительное превышение продукции всех лигандов сигнального пути Notch и aberrантная активация рецептора *NOTCH1* [12]. Гиперактивность Notch при колоректальном раке способствует инвазии и метастазированию, например через активацию белкового комплекса NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF (индуцирует активацию тирозинкиназ ABL и фосфорилирование RHOGEF) [13].

Способность опухолевых клеток к метастазированию крайне важна для прогрессии, поэтому мы в первую очередь изучили, может ли подавление экспрессии *NOTCH1* повлиять на нее. В клетках линии карциномы легкого человека A549 подавление экспрессии *NOTCH1* действительно приводило к снижению частоты случаев метастазирования и количества метастазов при ортотопическом введении. К сожалению, данный эксперимент не удалось провести на клетках карциномы толстой кишки человека HCT116, однако все дальнейшие исследования выполнялись на обеих клеточных моделях.

Способность опухолевых клеток к метастазированию обусловлена пулом клеток с фенотипом ОСК. Анализ способности этих клеток формировать опухоли при их введении иммунодефицитным лабора-

торным животным признан «золотым стандартом» верификации ОСК в культуре [13]. В качестве объекта в данном эксперименте часто используют тип иммунодефицитных мышей nude («голый»), характеризующийся отсутствием волосяного покрова и тимуса, а наиболее предпочтительным способом введения считается ортотопическая трансплантация [14, 15]. Однако технически она далеко не всегда возможна, как и в нашем случае с клетками НСТ116, поэтому мы использовали подкожный способ введения опухолевых клеток, и этого оказалось достаточно для получения достоверных и воспроизводимых результатов. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к увеличению минимальной прививочной дозы клеток обеих линий, т. е. к снижению их туморогенного потенциала.

Кроме экспериментов *in vivo* есть и тесты *in vitro* по определению пула и фенотипа ОСК в культуре, наиболее часто применяемыми из которых являются анализ активности АВС-транспортёров и субстрат-независимое колониеобразование. Первый тест основан на способности как нормальных СК, так и ОСК с помощью трансмембранных белков семейства АВС-транспортёров удалять из клетки мелкие эндогенные молекулы, включая цитотоксичные вещества. Однако ОСК также могут использовать АВС-транспортёры для поддержания лекарственной устойчивости [16, 17]. Цитофлуориметрический анализ активности АВС-транспортёров проведен с использованием двойного окрашивания на пропидий йодид для исключения мертвых клеток и родамин 123. Подавление экспрессии *NOTCH1* снизило долю клеток, способных к исключению красителя, т. е. активность АВС-транспортёров, в обеих линиях. Второй тест основан на способности ОСК гораздо более эффективно формировать колонии из одиночных клеток и расти в виде сфероидов в неадгезивных условиях по сравнению с опухолевыми клетками [18]. Анализ колониеобразования в полужидкой среде выявил уменьшение количества колоний, сформированных клетками А549 и НСТ116 при подавлении экспрессии *NOTCH1*.

Современные методы детекции пула клеток с фенотипом ОСК часто основаны на анализе маркеров клеточной поверхности, а также экспрессии генов, продукты которых вовлечены в поддержание стволовости. CD133 (проминин-1) является трансмембранным гликопротеином, продуцируемым эмбриональными эпителиальными и гемопоэтическими СК [19]. CD133-положительные опухолевые клетки обнаружены в образцах ЗНО различной этиологии. Такие клетки, выделенные с помощью проточной цитофлуориметрии, способны формировать опухоли у иммунодефицитных мышей, оставаться в недифференцированном состоянии при культивировании на бессывороточной среде и характеризуются более злокачественным фенотипом [20–22]. По результатам анализа базы данных молекулярных путей KEGG PATHWAY Database [23] также были выбраны несколько целевых генов сигнального пути Notch, продукты которых играют значительную роль в эмбриогенезе и поддержании фенотипа СК, а следовательно, и ОСК: *NANOG*, *POU5F1* (*OCT4*) и *SOX2* [6]. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению доли CD133-положительных клеток и экспрессии вышеперечисленных генов в клетках А549 и НСТ116.

Исследования последних лет все больше говорят о нерациональности глобального ингибирования сигнального пути Notch при противоопухолевой терапии. Таким образом, возможно, более целесообразным представляется смещение вектора разработок в сторону нацеливания на подавление экспрессии Notch-зависимых генов, продукты которых вовлечены в поддержание пула и фенотипа ОСК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия гена, кодирующего рецептор NOTCH1, важна для поддержания пула и фенотипа ОСК карцином легкого и толстой кишки человека. Изучение вовлеченности сигнальных путей и их компонентов в поддержание пула клеток с фенотипом ОСК лежит в основе разработки высокоэффективных терапевтических стратегий, нацеленных на элиминацию ОСК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. National Cancer Institute. Cancer stat facts: lung and bronchus cancer. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>.
2. National Cancer Institute. Cancer stat facts: colorectal cancer. Available at: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>.
3. Genomic Data Commons, The Cancer Genomic Atlas. TCGA-LUAD. Available at: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-LUAD>.
4. Genomic Data Commons, The Cancer Genomic Atlas. TCGA-COAD. Available at: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-COAD>.
5. Васильева М.В., Хромова Н.В., Копнин Б.П. и др. Значимость экспрессии рецептора NOTCH1 для прогрессии карцином легкого и толстой кишки человека. Биохимия 2022;87(10):1505–13. DOI: 10.31857/S0320972522100153
Vasileva M.V., Khromova N.V., Kopnin B.P. et al. Significance of NOTCH1 expression in the progression of human lung and colorectal cancers. Biochemistry (Mosc.) 2022;87(10):1199–05. DOI: 10.1134/S0006297922100133
6. Battle E., Clevers H. Cancer stem cells revisited. Nat Med 2017;23(10):1124–34. DOI: 10.1038/nm.4409
7. Фармаковская М.Д., Хромова Н.В., Копнин Б.П., Копнин П.Б. Повышение туморогенного потенциала клеток рака ободочной кишки человека линии НСТ116 за счет увеличения содержания раковых стволовых клеток при подавлении экспрессии E-кадгерина. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-06-14
Farmakovskaya M.D., Khromova N.V., Kopnin B.P., Kopnin P.B. Increasing the tumorigenic potential of human colon cancer cells of the HST116 line by increasing the content of cancer stem cells while suppressing the expression of E-cadherin. Rossiyskiy

- bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(3):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-06-14
8. Yuan X., Wu H., Xu H. et al. Meta-analysis reveals the correlation of Notch signaling with non-small cell lung cancer progression and prognosis. *Sci Rep* 2015;5:10338. DOI: 10.1038/srep10338
 9. Liu L., Tao T., Liu S. et al. An RFC4/Notch1 signaling feedback loop promotes NSCLC metastasis and stemness. *Nat Comm* 2021;12(1):2693. DOI: 10.1038/s41467-021-22971-x
 10. Allen T.D., Rodriguez E.M., Jones K.D. et al. Activated Notch1 induces lung adenomas in mice and cooperates with Myc in the generation of lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2011;71(18):6010–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0595
 11. Ali S.A., Justilien V., Jamieson L. et al. Protein kinase C α drives a NOTCH3-dependent stem-like phenotype in mutant KRAS lung adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2016;29(3):367–78. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.02.012
 12. Tyagi A., Sharma A.K., Damodaran C. A review on Notch signaling and colorectal cancer. *Cells* 2020;9(6):1549. DOI: 10.3390/cells9061549
 13. Sonoshita M., Itatani Y., Kakizaki F. et al. Promotion of colorectal cancer invasion and metastasis through activation of NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF protein TRIO. *Cancer Discov* 2015;5(2):198–11. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0595
 14. O'Brien C.A., Kreso A., Jamieson C.H.M. Cancer stem cells and self-renewal. *Clin Cancer Res* 2010;16(12):3113–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2824
 15. Flanagan S.P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 1966;8(3):295–309. DOI: 10.1017/s0016672300010168
 16. Ozvegy-Laczka C., Cserepes J., Elkind N.B. et al. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist* 2005;8(1):15–26. DOI: 10.1016/j.drug.2005.02.002
 17. Wu C., Wei Q., Utomo V. et al. Side population cells isolated from mesenchymal neoplasms have tumor initiating potential. *Cancer Res* 2007;67(17):8216–22. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0999
 18. Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc* 2006;1(5):2315–9. DOI: 10.1038/nprot.2006.339
 19. Yin A.H., Miraglia S., Zanjani E.D. et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90(12):5002–12. DOI: 10.1182/blood.V90.12.5002
 20. Tirino V., Camerlingo R., Franco R. et al. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009;36(3):446–53. DOI: 10.1016/j.ejcts.2009.03.063
 21. Vermeulen L., Todaro M., Mello F.D. et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multilineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad USA* 2008;105(36):13427–32. DOI: 10.1073/pnas.0805706105
 22. Fujimoto K., Beauchamp R.D., Whitehead R.H. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology* 2002;123(6):1941–8. DOI: 10.1053/gast.2002.37065
 23. KEGG PATHWAY Database is a platform that provides wiring diagrams of molecular interactions, reactions and relations. Available at: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

Вклад авторов

М.В. Васильева: эксперименты *in vitro*, подготовка иллюстративного материала;
Н.В. Хромова: работа с лабораторными животными и биологическим материалом;
С.В. Бойчук: работа с базами данных, статистическая обработка данных;
П.Б. Копнин: дизайн и организация исследования, написание текста статьи.

Authors' contributions

M.V. Vasileva: *in vitro* experiments, preparation of illustrative material;
N.V. Khromova: work with laboratory animals and biological material;
S.V. Boichuk: work with databases, statistical data processing;
P.B. Kopnin: design and organization of the research, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.В. Васильева / M.V. Vasileva: <https://orcid.org/0000-0002-1974-3790>
Н.В. Хромова / N.V. Khromova: <https://orcid.org/0000-0001-8348-6760>
С.В. Бойчук / S.V. Boichuk: <https://orcid.org/0000-0003-2415-1084>
П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (грант № 23-15-00433, <https://rscf.ru/project/23-15-00433>).

Funding. This research was funded by the Russian Scientific Foundation (grant No. 23-15-00433, <https://rscf.ru/en/project/23-15-00433>).

Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance of bioethics rules

The research protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

The research was performed in accordance with all ethical standards for the animal treatment adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes.

Статья поступила: 01.03.2024. **Принята к публикации:** 13.05.2024.

Article submitted: 01.03.2024. **Accepted for publication:** 13.05.2024.