

На правах рукописи

КУТОВА ОЛЬГА МИХАЙЛОВНА

**Роль межклеточных контактов в формировании резистентности
опухолевых сфероидов к терапевтическим воздействиям**

1.5.2. – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2022

Работа выполнена на кафедре биофизики Института биологии и биомедицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород

Научный руководитель: **Балалаева Ирина Владимировна,**
кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биофизики Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Официальные оппоненты: **Александрова Антонина Юрьевна,**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
Акасов Роман Александрович,
кандидат наук (признаваемый в РФ PhD), старший научный сотрудник лаборатории лазерной биомедицины Института фотонных технологий РАН ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН

Ведущая организация ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава России

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, г. Нижний Новгород, проспект Гагарина, д. 23. С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2022/1282/diss-Kutova-1282.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Формирование лекарственной устойчивости злокачественных опухолей вызывает необходимость пересмотра и оптимизации современных подходов к лечению. Решение такой задачи требует детального изучения механизмов лекарственной устойчивости, работающих на разных уровнях организации опухоли. Одно из центральных мест в изучении биологии опухолей и характера их ответа на терапию на сегодняшний день отводится особенностям трехмерной структуры опухолевой ткани.

Нормальное формирование и функционирование тканей в многоклеточном организме зависит от скоординированной регуляции количества клеток, степени их дифференцировки, морфологии и взаимного расположения. Такая координация поддерживается за счет сложной сети связей между клетками, где их физиологические функции регулируются набором сигналов, получаемых клеткой от соседних клеток и внеклеточной среды. Непосредственное взаимодействие клеток между собой и внеклеточным матриксом реализуется за счет белковых комплексов межклеточных контактов (адгезивных, плотных, щелевых контактов и десмосом) и контактов клетка-матрикс (фокальных контактов и полудесмосом), занимающих одно из центральных мест в путях внутриклеточной сигнализации [St Croix, Kerbel, 1997; Janiszewska et al., 2020]. Нарушение скоординированной работы белков контактов в нормальной ткани может вести к созданию условий, способствующих злокачественной трансформации. В опухолевой ткани совокупность перекрестных взаимодействий опухолевых клеток, клеток стромы и внеклеточного матрикса, а также сопутствующих специфических физико-химических условий создает так называемое микроокружение опухоли (МО) [Anderson, Simon, 2020], в пределах которого работа белков контактов служит успешному приспособлению малигнизированных клеток к условиям среды. В основе этого приспособления лежит способность опухолевых клеток претерпевать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), который позволяет клеткам мигрировать и обеспечивает как инвазию в близлежащие к опухоли ткани, так и процесс метастазирования. Для успешного заселения дальних метастатических ниш опухолевые клетки должны претерпеть обратный процесс – мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП) [Du et al., 2017; Bakir et al., 2020]. В последнее время накапливается множество сведений, подтверждающих, что процесс ЭМП-МЭП не бинарен, и опухолевые клетки демонстрируют высокую фенотипическую пластичность, которая во многом и обуславливает успешное прогрессирование опухоли, ее рецидив после лечения и развивающуюся лекарственную устойчивость [Aggarwal et al., 2021; Rubtsova et al., 2021].

Показано, что на фоне ЭМП запускаются или усиливаются различные механизмы устойчивости опухолей к терапии [Comaills et al., 2016; De Las Rivas et al., 2021], исходом работы которых в основном является невозможность взаимодействия противоопухолевого агента с его мишенью или, при успешном взаимодействии, – нарушение последующей эффекторной цепи событий. Эти механизмы могут быть обусловлены на генетическом уровне [Mansoori et al., 2017; Bukowski et al., 2020] и на уровне функционирования клетки [Robey et al., 2018; Hraběta et al., 2020; Kaur et al., 2020]. Кроме того ЭМП может способствовать развитию в опухоли иммуносупрессивного микроокружения, которое, с одной стороны, препятствует уничтожению опухоли иммунными клетками [Wang et al., 2021], а с другой – усиливает пролиферативный и инвазивный потенциал опухоли

за счет привлечения иммунных клеток, в норме отвечающих за регенерацию ткани [Labani-Motlagh et al., 2020].

Процесс ЭМП сопряжен с перестройкой адгезивного поведения клетки в целом и, соответственно, с изменениями состава и уровней представленности белков адгезии [Aggarwal et al., 2021]. Изучение механизмов, связывающих изменения в профиле представленности белков адгезии и возникновение лекарственной устойчивости, таким образом, откроет перспективы создания более совершенных терапевтических агентов и подходов к лечению.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было исследование механизмов формирования лекарственной устойчивости опухоли с участием межклеточных контактов на примере сфероидов аденокарциномы яичника с гиперэкспрессией онкомаркера HER2.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ эффективности терапевтических агентов различной молекулярной массы на монослойной культуре и опухолевых сфероидах.
2. На модели опухолевых сфероидов определить глубину проникновения терапевтических агентов различной молекулярной массы.
3. Проанализировать уровень экспрессии рецептора-мишени на опухолевых клетках в разных условиях культивирования как возможный фактор изменения резистентности опухолей к таргетной терапии.
4. Провести анализ взаимосвязи между уровнем экспрессии белков межклеточных контактов и резистентностью опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям при переходе к трехмерному культивированию *in vitro*.
5. Проанализировать сопоставимость профиля экспрессии белков межклеточных контактов в сфероидах *in vitro* и ксенографтных моделях опухоли *in vivo*.

Научная новизна. Получены сфероиды для ряда линий клеток аденокарциномы яичника человека и охарактеризованы их ростовые и морфологические особенности.

Определена глубина проникновения терапевтических агентов различной молекулярной массы в сфероид и показано, что для высокомолекулярного агента она не превышает 70 мкм, выступая, таким образом, как один из факторов развития устойчивости.

Впервые проведено комплексное исследование белков-представителей всех типов межклеточных контактов при формировании трехмерной структуры клетками аденокарциномы яичника. Установлено, что в клетках исследуемых линий отсутствует белок адгезивных контактов, эпителиальный маркер, E-кадгерин. Наибольшая представленность была обнаружена для белка щелевых контактов коннексина-43. В клетках аденокарциномы яичника с более выраженным метастатическим потенциалом было выявлено статистически значимое более высокое содержание белка десмосом десмоглеина-2. В целом, при переходе к трехмерному культивированию было выявлено снижение представленности большинства исследованных в работе белков межклеточных контактов.

Продемонстрировано, что профиль представленности белков межклеточных

контактов в сфероидах на основе клеток аденокарциномы яичника линий SKOV-3 и SKOV-3.ip до некоторой степени отражает таковой в модели опухоли *in vivo*, однако имеются значимые отличия между моделями.

Научно-практическая значимость. Получены новые знания о вкладе трехмерной структуры опухолей, в частности, межклеточной адгезии, в развитие устойчивости опухолей к терапевтическим воздействиям. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при создании новых противоопухолевых агентов и разработке подходов к лечению онкологических заболеваний для преодоления устойчивости опухолей с учетом ее комплексной природы.

Основные выводы и результаты работы будут использованы в учебном процессе в рамках курсов для студентов ННГУ им. Н.И. Лобачевского, обучающихся по биологическим и медицинским специальностям.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При переходе к трехмерному культивированию клетки аденокарциномы яичника человека приобретают устойчивость к терапевтическим агентам различной природы: цитостатическому антибиотику доксорубицину и рекомбинантному HER2-специфичному таргетному токсину DARPIn-LoPE.
2. Глубина проникновения высокомолекулярного противоопухолевого таргетного токсина белковой природы в сфероиды не превышает 70 мкм, что может выступать как фактор формирования устойчивости сфероидов к его действию.
3. При переходе к трехмерной организации опухолевых клеток в условиях *in vitro* происходит снижение представленности белков-представителей межклеточных контактов. Потеря межклеточной адгезии может служить маркером эпителиально-мезенхимального перехода и свидетельствует о приобретении клетками более агрессивного фенотипа.

Личный вклад автора. Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение экспериментов, обработку и интерпретацию полученных результатов. Совместно с соавторами автор принимал участие в подготовке научных статей и докладов на семинарах и конференциях.

Достоверность научных результатов. Надежность используемых методов исследования вместе с воспроизводимостью результатов подтверждает достоверность научных результатов. Кроме того, аргументы и выводы, основанные на научных результатах, совпадают с результатами независимых исследований в литературе.

Апробация. Основные результаты работы были представлены на международных и российских научных мероприятиях: III научно-практической конференции «Исследования и разработки – 2016» (Москва, 2016); III Всероссийском научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Нижний Новгород, 2017); XVI Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школе (Москва, 2019); Всероссийской с международным участием школо-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление»

(Нижний Новгород, 2018, 2019, 2020); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2020); 11-ой Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2021); 45-ом Международном конгрессе FEBS (Любляна, Словения, 2021); 7-ой Международной электронной конференции по медицинской химии (Базель, Швейцария, 2021).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 работы, включая 7 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus, РИНЦ), входящих в список ВАК.

Структура и объем работы. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов работы, описания результатов и их обсуждения, заключения, выводов, цитируемой литературы. Объем составляет 142 страницы машинописного текста, иллюстрированного 21 рисунком и 1 таблицей. Список литературы включает 338 источников.

Благодарности. Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (проекты № 17-74-10227 и 19-74-20168) и РФФИ (проекты № 17-00-00122 и 19-34-90159).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, посвященный рассмотрению структуры и функций белков межклеточных контактов и контактов клетка-матрикс, их роли в регуляции клеточной пролиферации и миграции, а также участию белков контактов в формировании опухолевого микроокружения и фенотипа опухолевых клеток.

В главе 2 перечислены использованные в работе материалы и оборудование, описаны методики исследований.

Клеточные культуры. Исследования проведены на культурах клеток аденокарциномы яичника человека со сверхэкспрессией рецептора-онкомаркера HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2) SKOV-3, SKOV-3-kat, стабильно экспрессирующей красный флуоресцентный белок TurboFP635 [Balalaeva et al., 2015], и SKOV-3.ip.

Получение сфероидов производили с использованием планшетов из пластика со сверхнизкой адсорбцией. Рост сфероидов контролировали путем измерения их размеров и расчета объема.

Получение моделей опухоли *in vivo*. В качестве трехмерных моделей опухоли *in vivo* были получены ксенографтные опухоли в иммунодефицитных мышях линии Balb/c nude путем прививки клеток в двух локализациях – подкожной и интраперитонеальной. Проведение исследований разрешено Комиссией по биоэтике ННГУ им. Н.И. Лобачевского (протокол №21 от 22.10.2018).

Противоопухолевые агенты. В рамках работы были использованы цитостатический антибиотик доксорубицин (Верофарм, Россия) и рекомбинантный таргетный токсин DARPIn-LoPE, созданный на основе HER2-специфического

каркасного белка DARPin-9_29 (направляющий модуль) и низкоиммуногенного фрагмента псевдомонадного экзотоксина А, лишённого собственного связывающего домена, а также Т- и В-клеточных эпитопов (токсический модуль). DARPin-LoPE был получен путем наработки в клетках *Escherichia coli* штамма BL21(DE3) путем их трансформации плазмидой, кодирующей DARPin-LoPE, с последующей очисткой методами высокоэффективной жидкостной хроматографии [Sokolova et al., 2019].

Анализ цитотоксичности DARPin-LoPE и доксорубицина. Для оценки цитотоксичности исследуемых агентов в отношении клеток, культивируемых в виде монослойной культуры и сфероидов, клетки обрабатывались DARPin-LoPE в диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^3 нМ или доксорубицином в диапазоне концентраций 0,027–20 мкМ при инкубировании в течение 72 ч. Жизнеспособность клеток в монослойной культуре оценивалась методом МТТ-теста [Mosmann, 1983]. Относительная жизнеспособность клеток в сфероидах оценивалась как процентное отношение усредненных объемов обработанных и контрольных сфероидов. Согласие результатов МТТ-теста и измерения объема сфероидов подтверждено в предварительном эксперименте.

Оценка глубины проникновения противоопухолевых агентов и БСА в сфероид. Визуализация проникновения доксорубицина была возможна за счет детекции его собственной флуоресценции. DARPin-LoPE и бычий сывороточный альбумин (БСА) были мечены аминореактивными красителями: FITC (ThermoFisher Scientific, США) или N-гидроксисукцинимидным производным DyLight650 NHS Ester (ThermoFisher Scientific, США), связывающимися с первичными аминогруппами. Сфероиды инкубировали в течение 2, 12 или 24 ч в ростовой среде, содержащей 1 мкМ DARPin-LoPE-FITC, 1 мкМ DARPin-LoPE-DyLight650 или 10 мкМ доксорубицин в темноте. Изображения сфероидов были получены с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO Duo (Carl Zeiss, Германия) с объективом EC Plan-Neofluar 20×/0.50.

Исследование представленности белков межклеточных контактов, виментина, интегрина $\beta 1$ и рецептора HER2. Исследуемые модели были дезагрегированы до одноклеточных суспензий, после чего клетки фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали антителами, специфичными к белкам-представителям основных типов межклеточных контактов: Е-кадгерину (адгезивные контакты), десмоглеину-2 (десмосомы), коннексину-43 (щелевые контакты), окклюдину и ZO-1 (плотные контакты); белку контактов клетка-матрикс интегрину $\beta 1$; белку промежуточных филаментов виментину или к рецептору HER2. Анализ интенсивности окрашивания исследуемых клеток производили методом проточной цитофлуориметрии с помощью клеточного сортера FACSAria III (Becton Dickinson, США) или цитометра BC CytoFlex S (Beckman Coulter, США). Уровень представленности белков интереса оценивали по показателю относительной флуоресценции (отношение интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных специфическими антителами, к интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных антителами изотипического контроля). Исследование локализации коннексина-43 производили путем окрашивания специфическими антителами пермеабелизованных и непермеабелизованных клеток.

Статистическая обработка данных. Анализ данных проводили с использованием программы GraphPad Prism (v. 6.01, GraphPad Software, Inc, США). Используются методы параметрической статистики (дисперсионный анализ, методы множественных сравнений).

Глава 3 содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

Получение сфероидов и их характеристика. Подбор условий культивирования сфероидов аденокарциномы яичника человека был проведен на линии клеток SKOV-3-kat (рис. 1А). Показано, что при больших плотностях посадки (500 и 1000 кл./лунку) динамика их роста описывается сигмоидой (рис. 1Б), что отражает рост, характерный для опухолей *in vivo* [Hjelstuen et al., 1996]. Влияние терапевтических агентов корректно оценивать в фазе активного роста сфероида, на которой отсутствует центральное некротическое ядро. Равномерная флуоресценция срезов сфероидов на 8 день роста при окрашивании акридиновым оранжевым, связывающимся с двухнитевыми нуклеиновыми кислотами (зеленый) и флуоресценция белка TurboFP635 (красный) по всей глубине сфероида свидетельствует о жизнеспособности клеток всех слоев сфероида и отсутствии некротического ядра в его центре (рис. 1В). Последующие эксперименты проводились до 8-го дня роста сфероидов.

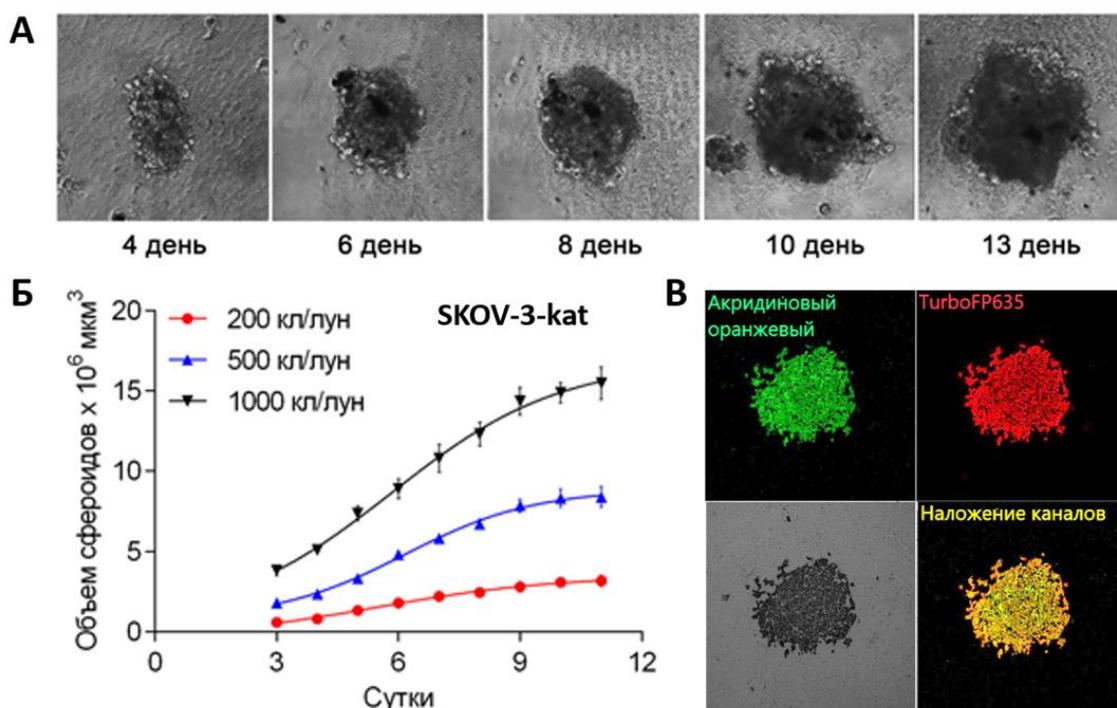


Рис. 1. Получение и характеристика сфероидов аденокарциномы яичника человека SKOV-3-kat.

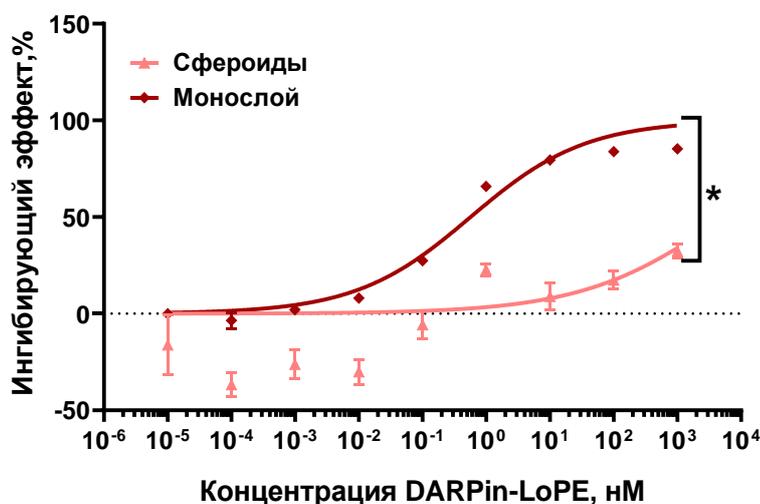
А, Морфология сфероидов SKOV-3-kat на разные дни роста. Размер изображений 550×550 мкм.

Б, Кривые роста сфероидов SKOV-3-kat, полученных при разной плотности посадки клеток. День «0» – посадка клеток в планшет.

В, Конфокальная микроскопия срезов сфероидов SKOV-kat на 8-й день роста (окраска акридиновым оранжевым). Представлены изображения в проходящем свете, в каналах регистрации флуоресценции акридинового оранжевого (λ_{ex} 458 нм, λ_{em} 505-552 нм) и флуоресцентного белка TurboFP635 (λ_{ex} 594 нм, λ_{em} 600-740 нм), а также наложенные изображения в двух каналах. Размер изображений 707×707 мкм

Цитотоксичность доксорубицина и DARPin-LoPE в отношении монослойной культуры и сфероидов *in vitro*. Результаты исследования эффективности токсического действия DARPin-LoPE в отношении монослойной культуры и сфероидов SKOV-3-kat показали, что жизнеспособность клеток в монослое значительно снижалась уже при субнанолярных концентрациях таргетного токсина (IC_{50} 0,6 нМ), в то время как существенного ингибирования роста сфероидов не удалось достичь даже при концентрациях DARPin-LoPE, достигающих 1 мкМ (рис. 2А). Степень выраженности эффекта доксорубицина также варьировала в монослойной культуре и сфероидах, однако обнаруженные различия оказались не такими существенными, как в случае таргетного токсина): рассчитанные значения IC_{50} доксорубицина для клеток в монослое и в сфероидах различались менее, чем на порядок (177 нМ для монослоя и 774 нМ для сфероидов) (рис. 2Б). Тем не менее, эти различия также были статистически значимы.

А



Б

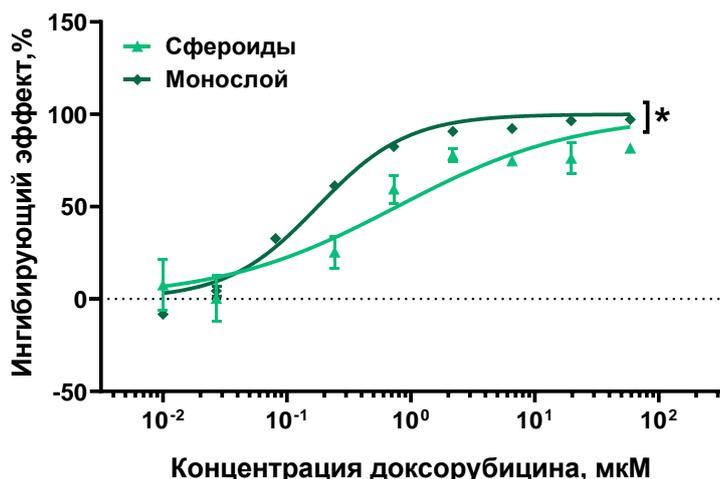


Рис. 2. Ингибирующий эффект DARPin-LoPE (А) и доксорубицина (Б) в отношении клеток линии SKOV 3-kat, культивируемых в виде сфероидов (светлоокрашенные кривые) и монослойной культуры (темноокрашенные кривые) после инкубации в присутствии исследуемых агентов в течение 72 ч. * – значимое отличие кривых ингибирующего эффекта исследуемых агентов в отношении монослойной культуры и сфероидов, критерий Фишера, $p < 0,05$).

Анализ глубины и динамики проникновения DARPin-LoPE, БСА и доксорубицина в сфероид. Для DARPin-LoPE, имеющего молекулярную массу 42 кДа, показано медленное накопление в клетках лишь поверхностных слоев сфероида, с проникновением на глубину около 50-70 мкм (при диаметре сфероида ~300 мкм) в течение 24 часов инкубации (рис. 3).

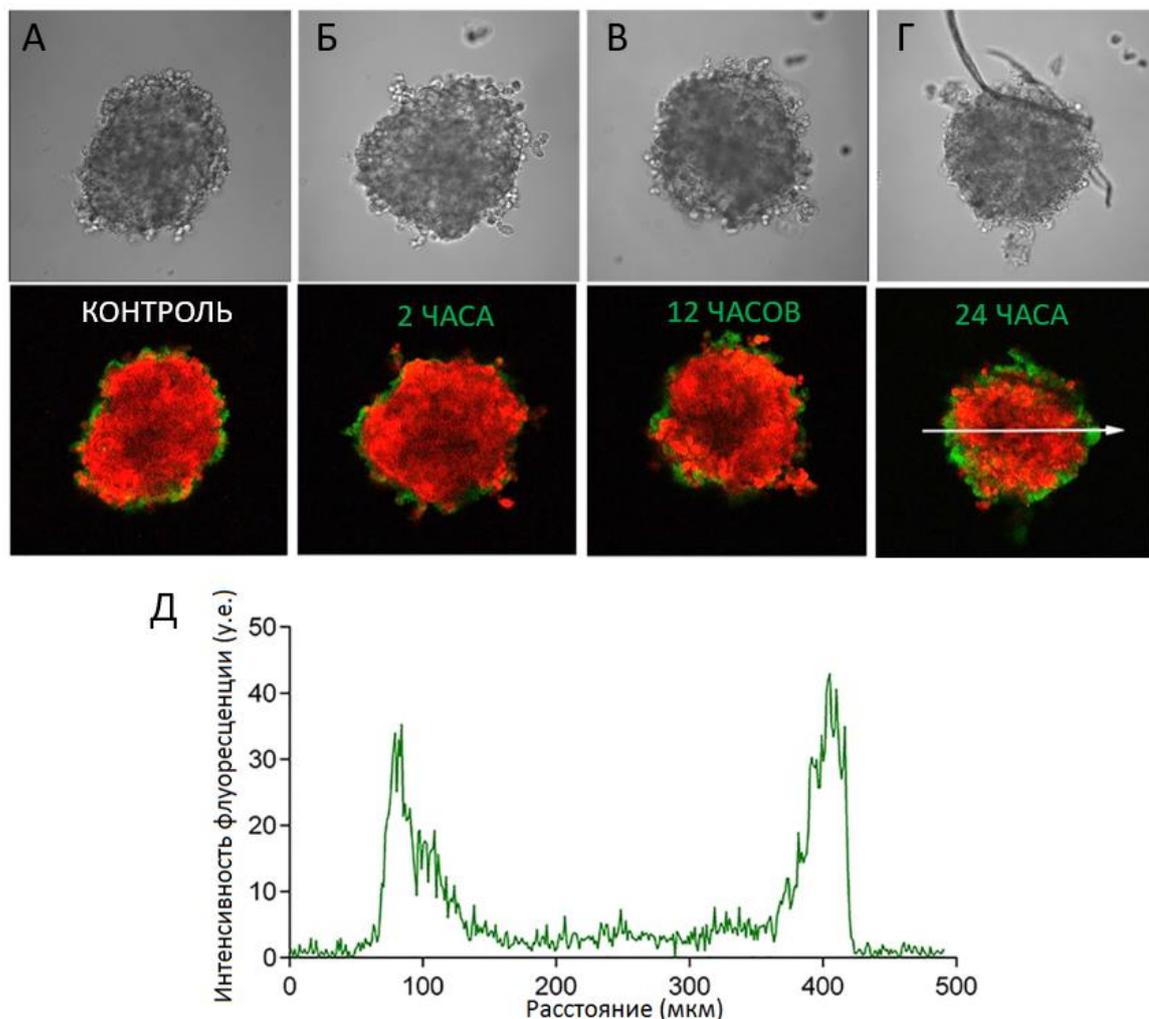


Рис. 3. Динамика проникновения адресного токсина DARPin-LoPE, меченного флуоресцентным красителем FITC (DARPin-LoPE-FITC), в сфероиды SKOV-3-kat.

А, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat в отсутствие DARPin-LoPE-FITC. Размер изображений 708×708 мкм.

Б, В, Г, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat через 2, 12 и 24 часа инкубации в присутствии DARPin-LoPE-FITC (соответственно). Представлены изображения в проходящем свете и наложенные изображения в каналах регистрации флуоресценции FITC (λex 488 нм, λem 500-560 нм) и флуоресцентного белка TurboFP635 (λex 594 нм, λem 600-740 нм). Размер изображений 708×708 мкм.

Д, Профиль интенсивности флуоресцентного сигнала в канале FITC вдоль стрелки, отмеченной на изображении Г

Низкомолекулярный агент доксорубицин ($M_r = 0,5$ кДа) при аналогичных условиях интенсивно проникает практически на всю глубину сфероида (рис. 4).

Для оценки вклада «барьера связывания», затрудняющего проникновение в опухоль высокоаффинных таргетных агентов, было исследовано проникновение меченного FITC бычьего сывороточного альбумина (БСА), имеющего молекулярную массу того же порядка (66 кДа), что и у DARPin-LoPE.

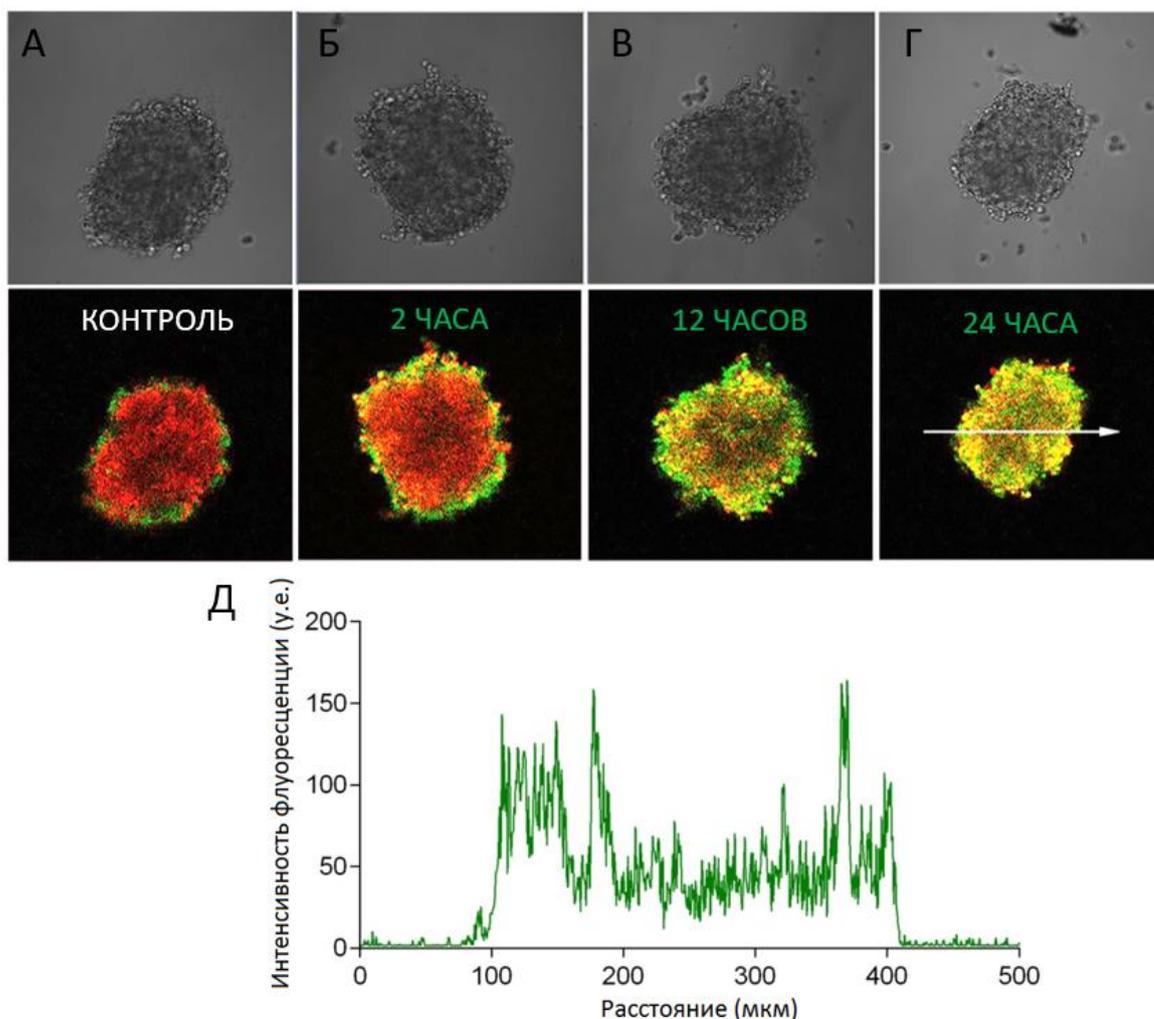


Рис. 4. Динамика проникновения доксорубина в сфероиды SKOV-3-kat. **А,** Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat в отсутствие доксорубина. Размер изображений 708×708 мкм. **Б, В, Г,** Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat через 2, 12 и 24 часов инкубации в присутствии доксорубина (соответственно). Представлены изображения в проходящем свете и наложенные изображения в каналах регистрации флуоресценции доксорубина (λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 517-614 нм) и флуоресцентного белка TurboFP635 (λ_{ex} 594 нм, λ_{em} 600-740 нм). Размер изображений 708×708 мкм. **Д,** Профиль интенсивности флуоресцентного сигнала в канале FITC вдоль стрелки, отмеченной на изображении Г

Показано, что БСА демонстрирует плохое проникновение в сфероид SKOV-3-kat, аналогично DARPIn-LoPE (рис. 5), что подтверждает значительный эффект молекулярной массы белковых агентов на ограничение их проникновения в сфероиды.

Во избежание неверной интерпретации результатов из-за сильного поглощения и рассеяния синего и зеленого света в биологических тканях, глубина проникновения белков, меченных FITC, была верифицирована путем анализа проникновения DARPIn-LoPE, меченного красным флуоресцентным красителем DyLight650, в сфероиды, полученные из клеток нефлуоресцирующей линии SKOV-3 (рис. 6). В этом случае визуализируемая динамика накопления DARPIn-LoPE-DyLight была аналогична таковой для DARPIn-LoPE-FITC: глубина проникновения к 24 часам инкубации не превышала 50-70 мкм.

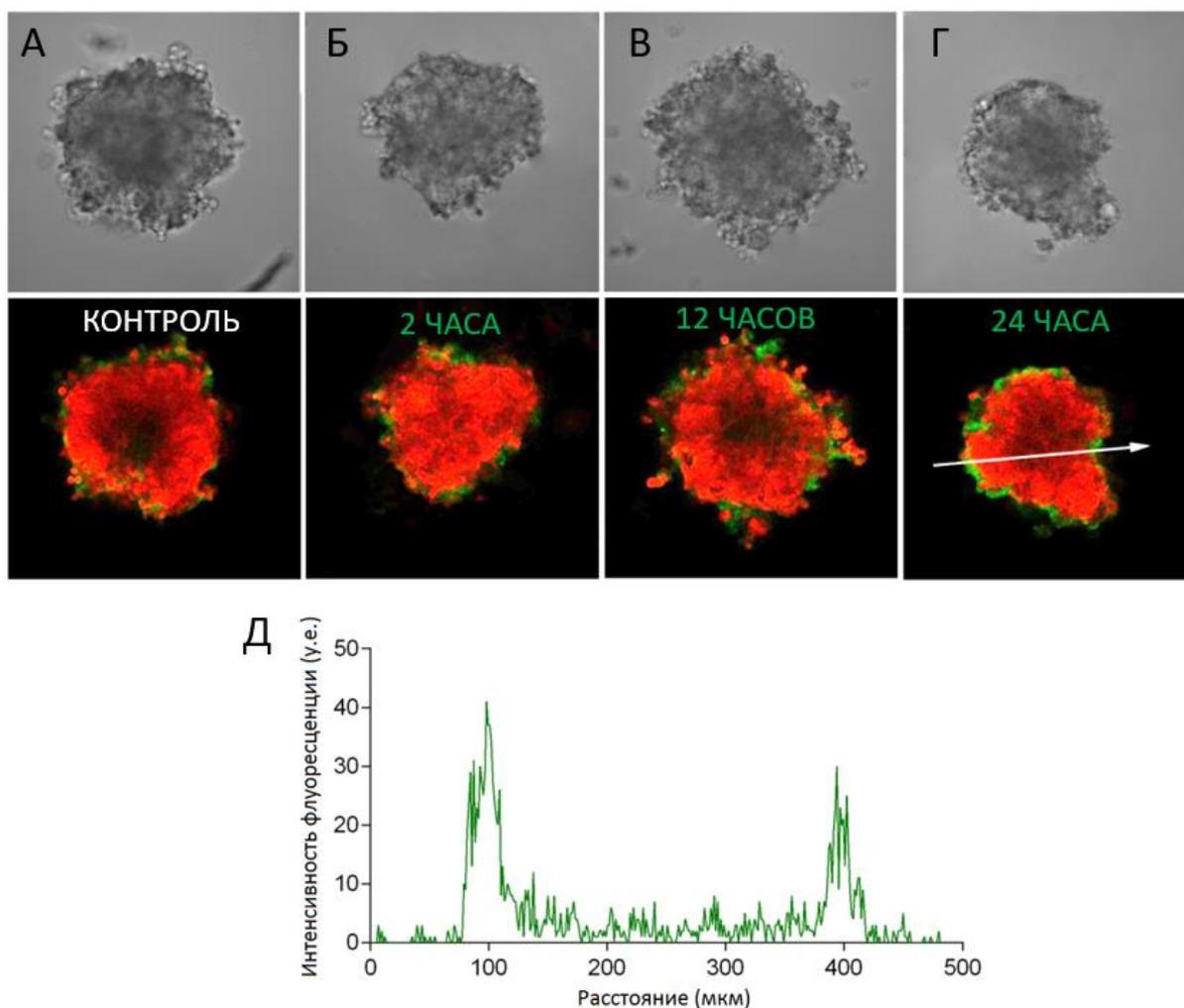


Рис. 5. Динамика проникновения бычьего сывороточного альбумина, меченного флуоресцентным красителем FITC (BSA-FITC), в сфероиды SKOV-3-kat.

А, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat в контроле в отсутствие BSA-FITC. Размер изображений 698×698 мкм.

Б, В, Г, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3-kat через 2, 12 и 24 часов инкубации в присутствии BSA-FITC (соответственно). Представлены изображения в проходящем свете и наложенные изображения в каналах регистрации флуоресценции FITC (лех 488 нм, лем 500-560 нм) и флуоресцентного белка TurboFP635 (лех 594 нм, лем 600-740 нм). Размер изображений 698×698 мкм.

Д, Профиль интенсивности флуоресцентного сигнала в канале FITC вдоль стрелки, отмеченной на изображении Г

Анализ участия рецептора-онкомаркера HER2 в формировании устойчивости опухолевых клеток в трехмерной структуре. Устойчивость к таргетным агентам может возникать из-за потери опухолевыми клетками молекул-мишеней этих агентов [Pietrantonio et al., 2016]. Исследование уровня представленности HER2 в клетках аденокарциномы яичника выявило, что он возрастает при переходе от монослойной культуры к трехмерному культивированию (рис. 7). Это свидетельствует о том, что повышение устойчивости сфероидов к таргетному токсину DARPIn-LoPE в наших экспериментах не может быть объяснено снижением уровня представленности его мишени.

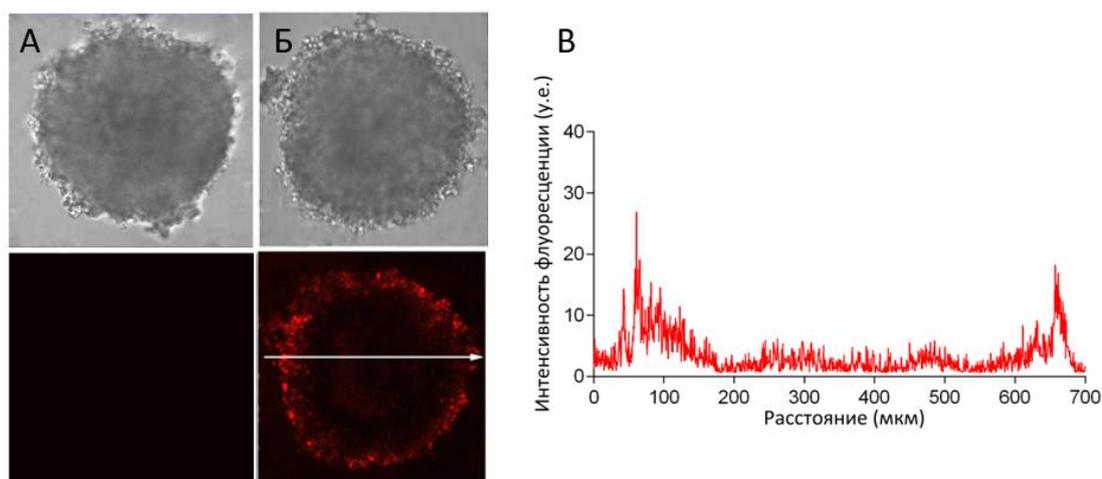


Рис. 6. Проникновение рекомбинантного таргетного токсина DARPin-LoPE, меченного флуоресцентным красителем DyLight650 (DARPin-LoPE-DyLight650), в сфероиды SKOV-3.

А, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3 в отсутствие DARPin-LoPE-DyLight650. Размер изображений 708×708 мкм.

Б, Конфокальная микроскопия сфероидов SKOV-3 через 24 часа инкубации в присутствии DARPin-LoPE-DyLight650. Представлены изображения в проходящем свете и в канале регистрации флуоресценции DyLight650 (λex 633 нм, λem 653-730 нм). Размер изображений 708×708 мкм.

В, Профиль флуоресцентного сигнала в канале DyLight650 вдоль линии, указанной на изображении Б

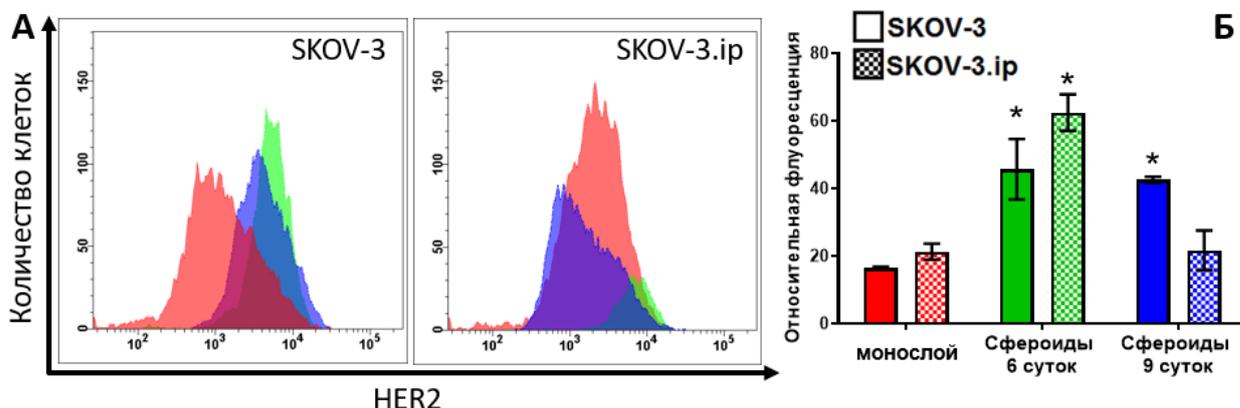


Рис. 7. Уровень представленности рецептора-онкомаркера HER2 в клетках SKOV-3 и SKOV-3.ip, культивируемых в монослойной культуре и сфероидах.

А, Распределение клеток SKOV-3 и клеток SKOV-3.ip в соответствии с интенсивностью флуоресценции после окрашивания антителами, специфичными к HER2. Красный – монослойная культура, зеленый – сфероиды на 6-й день роста, синий – сфероиды на 9-й день роста.

Б, Уровни представленности HER2 в монослойной культуре и сфероидах. * – значимое отличие от монослойной культуры (ANOVA, тест множественных сравнений Холма-Сидака, $p < 0,05$)

Профиль экспрессии белков контактов в моделях опухолевого роста *in vitro*. Данное исследование проводилось для оценки участия межклеточных взаимодействий в возникновении устойчивости опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям при формировании ими трехмерной структуры. Анализ проводился на клетках аденокарциномы яичника человека линий SKOV-3 и SKOV-3.ip при их культивировании в виде монослойной культуры и сфероидов

различного возраста (6 и 9 суток). Для данных линий клеток установлены различия в метастатическом потенциале и устойчивости к терапевтическим воздействиям: линия SKOV-3.ip получена путем интраперитонеальной инъекции клеток линии SKOV-3 иммунодефицитным мышам с последующим сбором клеток из асцита, более агрессивна и отличается более высоким уровнем экспрессии HER2 [Yu et al., 1993]. Полученные нами сфероиды из данных клеточных линий имели различную морфологию и ростовые характеристики: сфероиды обеих линий представляли собой рыхлые клеточные конгломераты, в то же время сфероиды на основе линии SKOV-3.ip формировались дольше (4 суток против 3-х для линии SKOV-3), росли быстрее (имели больший размер, чем сфероиды SKOV-3 на одинаковые сутки роста) и имели тенденцию к формированию облака из слабо прикрепленных клеток по периферии сфероида (рис. 8).

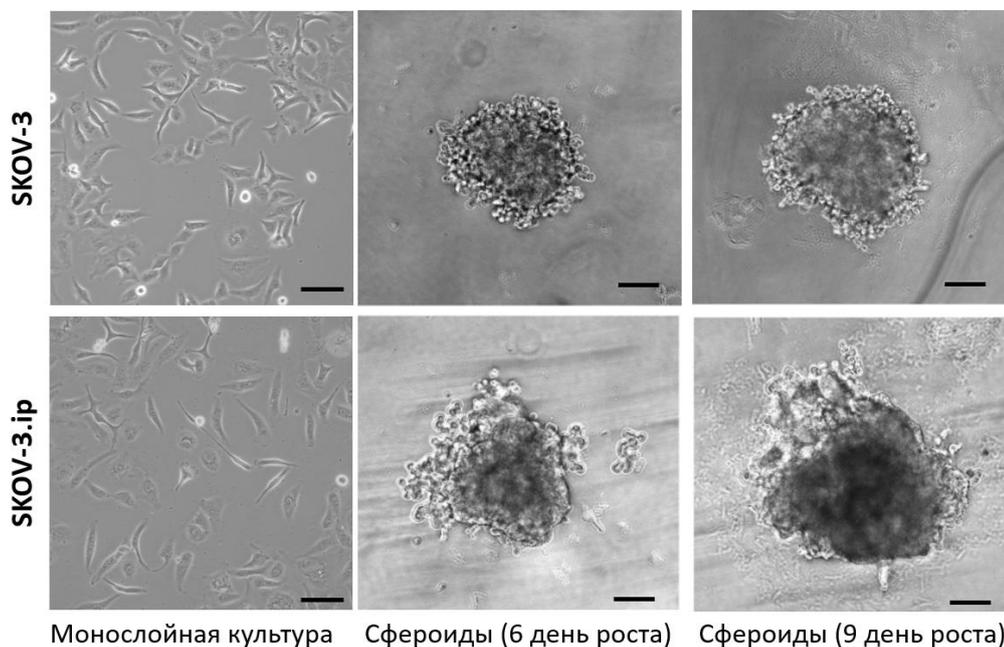


Рис. 8. Морфология клеток линий SKOV-3 и SKOV-3.ip и сфероидов, полученных из клеток этих линий на 6 и 9 день роста. Линейка – 100 мкм

Было показано что белок адгезивных контактов E-кадгерин как в монослойной культуре, так и в сфероидах обеих исследованных клеточных линий был представлен на крайне низком уровне (рис. 9 А, Б). Статистически значимых различий в уровне представленности между клетками в монослое и сфероидами выявлено не было. Такая потеря экспрессии E-кадгерина считается одним из признаков эпителиально-мезенхимального перехода, который обуславливает агрессивность и высокий метастатический потенциал опухоли [Bruner, Derksen, 2018]. Наблюдаемое отсутствие адгезивных контактов на основе E-кадгерина согласуется с мезенхимальной морфологией клеток исследуемых линий и особенностями структуры полученных из них сфероидов (Рис. 8).

Для белка десмосом десмоглеина-2 был также показан в целом невысокий уровень представленности и тенденция к снижению в сфероидах по сравнению с монослойной культурой, усиливавшаяся с возрастом сфероидов (рис. 9 В, Г), однако выявленные отличия не являются достоверными. Стоит отметить, что в линии SKOV-3.ip представленность десмоглеина-2 была значительно выше, чем в линии SKOV-3, независимо от условий культивирования.

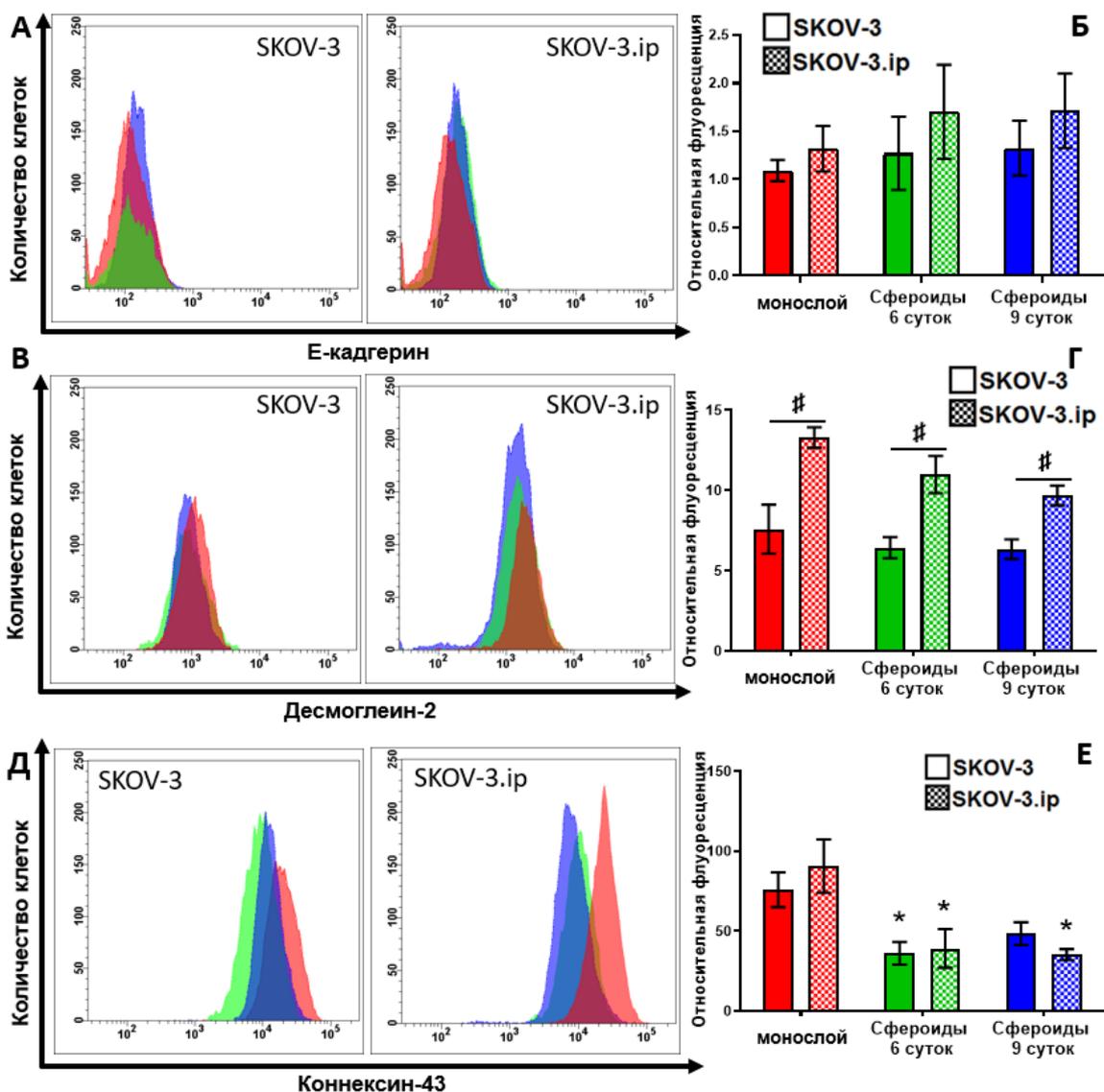


Рис. 9. Уровень представленности белков адгезивных контактов (Е-кадгерина), десмосом (десмоглеина-2) и щелевых контактов (коннексина-43) в клетках SKOV-3 и SKOV-3.ip, культивируемых в монослойной культуре и сфероиде.

А, В, Д, Распределение клеток SKOV-3 и клеток SKOV-3.ip в соответствии с интенсивностью флуоресценции после окрашивания антителами, специфичными к Е-кадгерину (А), десмоглеину-2 (В) и коннексину-43 (Д). Красный – монослойная культура, зеленый – сфероиды на 6-й день роста, синий – сфероиды на 9-й день роста.

Б, Г, Е, Уровень относительной флуоресценции Е-кадгерина (Б), десмоглеина-2 (Г) и коннексина-43 (Е) в монослойной культуре и сфероиде. * – значимое отличие от монослойной культуры (ANOVA, тест множественных сравнений Холма-Сидака, $p < 0,05$); # - значимое различие уровня представленности десмоглеина-2 в исследуемых линиях клеток (t-критерий с поправкой Велча, $p < 0,05$)

Литературные данные о связи уровня экспрессии десмоглеина-2 и фенотипа опухоли противоречивы. Значительная часть исследователей придерживается точки зрения, что снижение экспрессии десмоглеина-2 сопряжено с усилением метастатического потенциала и агрессивности опухолевых клеток [Chidgey, Dawson, 2007; Garrod, Chidgey, 2008], в то же время есть свидетельства, что повышение его экспрессии в клетке также может приводить к более злокачественному фенотипу [Svirshchevskaya et al., 2019; Xie et al., 2019]. Зарегистрированные нами отличия в морфологии сфероидов, полученных из двух

линий клеток, могут быть связаны, среди прочих факторов, с более высокой представленностью десмоглеина-2 в клетках SKOV-3.ip. Механизм такого влияния требует дальнейшего изучения.

Белок щелевых контактов коннексин-43 был наиболее представленным для обеих клеточных линий (рис. 9 Д, Е). Было показано статистически значимое снижение его представленности в сфероиде по сравнению с монослойной культурой, более чем в 2 раза. Щелевые контакты и, в частности, коннексин-43, ответственны за поддержание нормального фенотипа ткани. Ранее было показано, что потеря экспрессии коннексина-43 или его неправильная локализация могут запускать процессы малигнизации и способствовать к увеличению агрессивности опухоли [Sirnes et al., 2012; Darr et al., 2011].

Исследование представленности белков плотных контактов показало, что в клетках обеих линий содержание окклюдина находится на среднем уровне, в сфероиде оно статистически значимо падает. Представленность ZO-1 была относительно низкой, различия между клетками, культивируемыми в разных условиях, были выявлены только для 9-дневных сфероидов SKOV-3.ip (рис. 10). Потеря белков плотных контактов также рассматривается как один из признаков приобретения клетками мезенхимального фенотипа [Tsukita et al., 2001; Zhang et al., 2011].

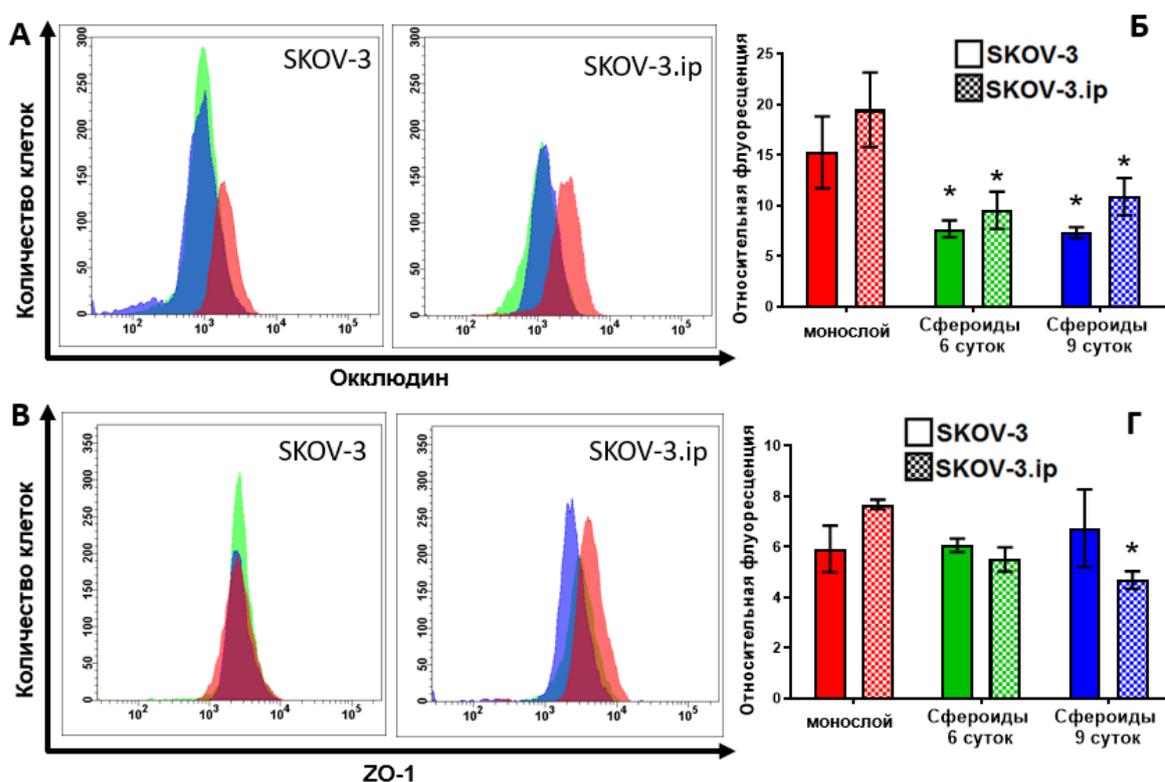


Рис. 10. Уровень представленности белков плотных контактов (окклюдина и ZO-1) в клетках SKOV-3 и SKOV-3.ip, культивируемых в монослойной культуре и сфероиде.

А, В, Распределение клеток SKOV-3 и клеток SKOV-3.ip в соответствии с интенсивностью флуоресценции после окрашивания антителами, специфичными к окклюдину (А) и ZO-1 (В). Красный – монослойная культура, зеленый – сфероиды на 6-й день роста, синий – сфероиды на 9-й день роста.

Б, Г, Уровень относительной флуоресценции окклюдина (Б) и ZO-1 (Г) в монослойной культуре и сфероиде. * – значимое отличие от монослойной культуры (ANOVA, тест множественных сравнений Холма-Сидака, $p < 0,05$)

Таким образом, в условиях *in vitro* было выявлено снижение представленности белков межклеточных контактов в трехмерных моделях опухоли по сравнению с монослойной культурой (рис. 9, 10). По литературным данным снижение представленности белков межклеточных контактов в целом свидетельствует о приобретении клетками мезенхимального фенотипа [Janiszewska et al., 2020]. Такое снижение количества белков контактов согласуется, в частности, с мезенхимальной морфологией клеток исследуемых линий и с рыхлым характером формируемых сфероидов (рис. 8). Наиболее принципиальное отличие между двумя линиями клеток, SKOV-3 и SKOV-3.ip, показано в отношении уровня экспрессии десмоглеина-2. Отметим также, что принципиального отличия между сфероидами разного возраста выявлено не было.

Для белка щелевых контактов коннексина-43 широко описана связь его неправильной локализации в клетке с агрессивным мезенхимальным фенотипом [Sirnes et al., 2012; Darr et al., 2011]. В ходе исследования локализации коннексина-43 в клетках аденокарциномы яичника человека линий SKOV-3 и SKOV-3.ip было обнаружено, что на фоне высокой общей представленности в обеих исследованных линиях, на поверхности клетки было представлено не более 20% от его общего количества (рис. 11). Факт «неправильной» локализации коннексина-43 в исследуемых линиях может свидетельствовать об их в целом высокой агрессивности.

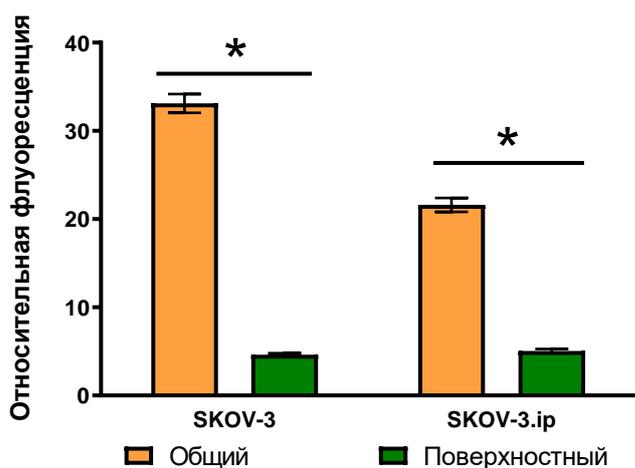


Рис. 11. Уровень общей представленности и представленности поверхностно расположенного коннексина-43 в клетках линий SKOV-3 и SKOV-3.ip. * – значимое отличие между общим и поверхностно расположенным белком (непарный t-критерий с поправкой Велча, $p < 0,05$)

Профиль экспрессии белков контактов в экспериментальных опухолях *in vivo*. Исследование сопоставимости профиля экспрессии белков межклеточных контактов в опухолях *in vivo* и в трехмерных моделях *in vitro* позволяет оценить адекватность применения последних для изучения биологии опухолей и их восприимчивости к терапевтическим воздействиям. Для данного исследования были получены ксенографтные опухоли аденокарциномы яичника человека в иммунодефицитных мышах в двух локализациях – подкожной и интраперитонеальной. Выбор двух локализаций был обусловлен тем, что подкожная ксенографтная модель является классической для моделирования опухолей эпителиального происхождения, в то время как интраперитонеальная модель представляется более релевантной для опухолей яичника, так как имитирует характерное для данного типа опухолей множественное метастазирование по брюшной полости [Deng et al., 2018].

Исследование профиля представленности белков контактов клетка-клетка и дополнительно исследованные уровни представленности белка промежуточных

филаментов, мезенхимального маркера виментина и белка контактов клетка-матрикс интегрина $\beta 1$ в сфероидов и моделях опухоли *in vivo* выявило частичную соотносимость данных моделей (рис. 12).

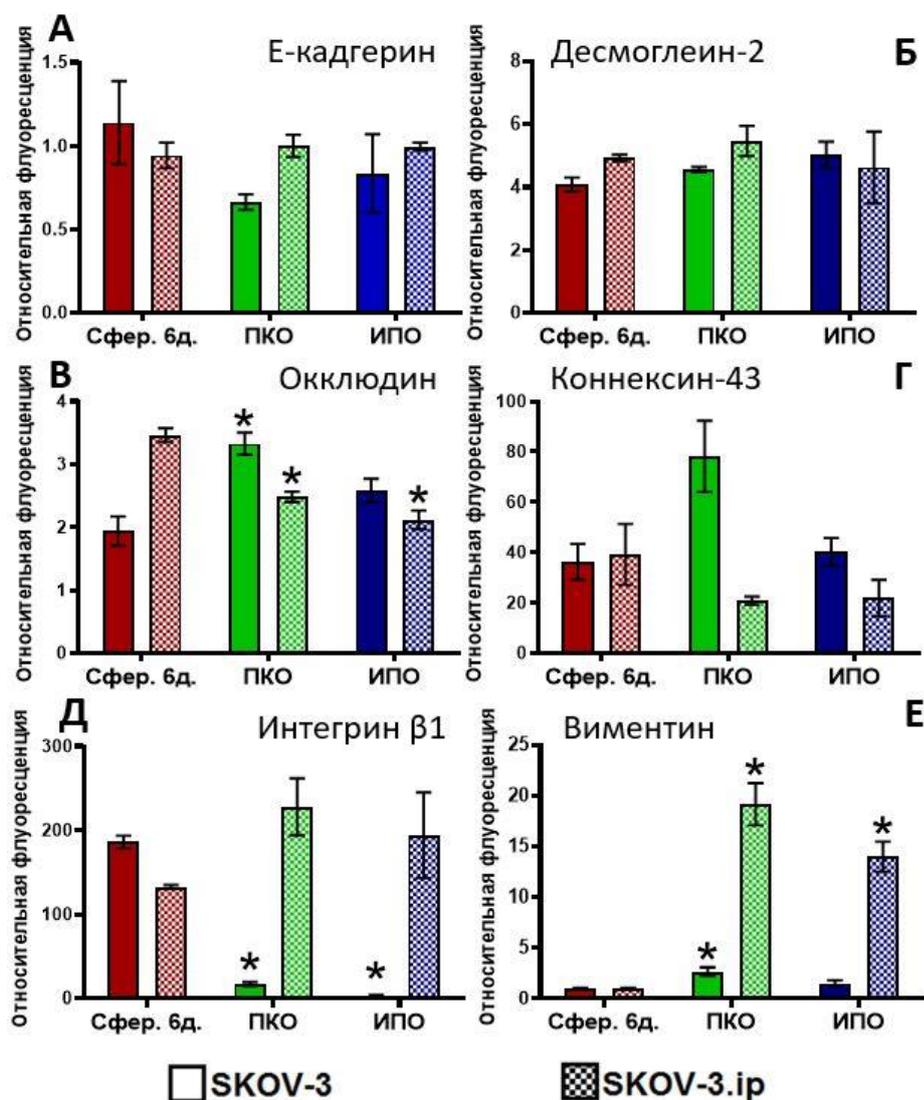


Рис. 12. Уровень представленности белков контактов клетка-клетка, клетка-матрикс и белка промежуточных фиаментов виментина в клетках SKOV-3 и SKOV-3.ip, выращенных в виде сфероидов и полученных из подкожно и интраперитонеально привитых ксенографтных моделей опухоли. Красный – сфероиды на 6 день роста, зеленый – клетки подкожно привитой опухоли, синий – клетки интраперитонеально привитой опухоли. * – значимое отличие от сфероидов (ANOVA, тест множественных сравнений Холма-Сидака, $p < 0,05$).

А-Г, Уровень представленности белков контактов клетка-клетка: Е-кадгерина, десмоглеина-2, окклюдина и коннексина-43.

Д, Уровень представленности белка контактов клетка-матрикс интегрина $\beta 1$.

Е, Уровень представленности белка промежуточных филаментов виментина

Это позволяет предположить, что с точки зрения формируемых взаимодействий клетка-клетка и клетка-матрикс в рамках трехмерной структуры опухоли, сфероиды во многом отражают черты опухолевой модели *in vivo*, однако не могут считаться ее полноценной заменой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время развивается точка зрения, согласно которой формирование лекарственной устойчивости опухолей связано с особенностями сложной трехмерной организации опухолевой ткани. Наряду с проблемами «логистики» терапевтических агентов и сохранения их функциональности в условиях опухоли все более пристальное внимание уделяется кооперации клеток опухолевой паренхимы и стромы для противостояния токсическому воздействию. Ярким примером такой кооперации может служить препятствие локальному достижению терапевтически значимой дозы вещества, обеспечивающего гибель клетки, путем его распределения через щелевые контакты, что показано при химиотерапии непосредственно для химиотерапевтического агента [Fu, 2014], для кальция, необходимого для запуска апоптоза [Lin et al., 2010], а также для активных форм кислорода [Su, Zhang, 2017].

В данной работе было продемонстрировано, что при переходе к трехмерному культивированию в виде сфероидов клетки аденокарциномы яичника формируют устойчивость к терапевтическим агентам различной природы. Среди возможных причин формирования устойчивости по отношению к высокомолекулярному HER2-специфичному таргетному токсину DARPIn-LoPE было показано его ограниченное проникновение в глубину сфероида. Причиной плохого проникновения могли стать как высокая молекулярная масса агента, так и характерное для высокоаффинных агентов чрезмерно стабильное связывание с мишенями в поверхностных слоях опухоли [Adams et al., 2001]. Ввиду того, что аналогичный по массе белок, не обладающий специфичностью к HER2, имел сопоставимую глубину проникновения, можно сделать вывод, что именно высокая молекулярная масса агента препятствует его проникновению в сфероид. Фактором устойчивости к таргетному агенту может также служить потеря опухолевыми клетками мишени данного агента. Однако продемонстрированное повышение представленности рецептора HER2 при переходе к трехмерному культивированию не позволяет рассматривать это изменение как прямой фактор формирования устойчивости к DARPIn-LoPE. Альтернативный механизм устойчивости к таргетной терапии при сохранении уровня представленности HER2 может заключаться в изменении нижележащих участников сигнального каскада по пути PI3k/Akt/mTOR [Kataoka et al., 2010].

В рамках исследования участия белков межклеточных контактов в возникновении лекарственной устойчивости было продемонстрировано снижение представленности белков большинства типов межклеточных контактов в клетках, сопровождающее формирование трехмерной структуры. Потеря белков межклеточных контактов свидетельствует о приобретении клетками более мезенхимального фенотипа. Аналогичное снижение представленности белков межклеточных контактов (E-кадгерина, ZO-1 и окклюдина) было показано при формировании сфероидов из клеток карциномы щитовидной железы (линия FRO) с одновременным повышением представленности интегрина $\beta 1$, что сопровождалось более высокой подвижностью клеток и усиливавшимся мезенхимальным фенотипом [Kim et al., 2020]. В нашей работе продемонстрирована высокая представленность интегрина $\beta 1$ как в сфероидах, так и в ксенографтных моделях опухоли *in vivo* на фоне низкой представленности белков межклеточных контактов. В опубликованных ранее работах других научных групп также упоминалось, что формирование сфероидов из клеток аденокарциномы яичника осуществляется

преимущественно за счет интегрин $\beta 1$, и клетки, выращенные в виде сфероидов, обладают более высокой инвазивностью [Casey et al., 2001; Sodek et al., 2009]. Это позволяет сделать предположение о том, что снижение межклеточной адгезии и повышение представленности интегрин $\beta 1$ могут рассматриваться как фактор развития клетками более злокачественного мезенхимального фенотипа и таким образом вносить вклад в возникающую устойчивость к терапевтическим агентам.

Большое количество исследований показывает связь между изменениями представленности транскрипционных факторов, регулирующих эпителиально-мезенхимальный переход (Snail/Slug, ZEB1,2, TWIST, YAP/TAZ), и формированием устойчивости как к классическим химиотерапевтическим, так и к таргетным агентам [Lee et al., 2017; Saxena, 2011; Ghiso et al., 2017]. Потеря опухолевой клеткой белков всех типов контактов может вести к приобретению ею также стволового фенотипа [Taube et al., 2010]. Устойчивость стволовых опухолевых клеток значительно превосходит таковую у обычных опухолевых клеток и может реализовываться за счет их возможности к самообновлению, перехода в покоящееся состояние, усиления классических механизмов устойчивости, характерных на уровне клетки [Phi et al., 2018]. При этом включение программы эпителиально-мезенхимального перехода в случае опухолевых клеток обычно не реализуется в полном объеме, чаще всего клетки претерпевают переход лишь частично, подстраиваясь под условия ткани. Такая пластичность может осуществляться за счет эпигенетической регуляции и создает огромную гетерогенность клеточных популяций в опухоли. Скорее всего, именно эта способность опухолевых клеток находиться в промежуточном состоянии позволяет им успешно метастазировать, так как дает возможность быстрого перехода как в сторону более мезенхимального фенотипа (для открепления, миграции), так и в сторону эпителиального (адаптация в новом микроокружении) [Sha et al., 2019]. В литературе отмечался такой переходный фенотип для использованных в работе линий клеток [Rosso et al., 2017; Klymenko et al., 2017].

Имеющиеся на сегодняшний день данные об участии трехмерной структуры опухоли и, в частности, об участии белков межклеточных контактов в формировании ее устойчивости к лечению, разрознены и противоречивы. В значительной степени это обусловлено тем, что большая часть исследований акцентирует внимание на отдельных белках, и дизайн исследования строится на основе подавления или искусственной индукции экспрессии конкретного белка. Полученные нами данные о профиле представленности белков межклеточных контактов демонстрируют, что для клеток аденокарциномы яичника при формировании трехмерной структуры характерно снижение представленности белков межклеточных контактов и высокая представленность контактов клетка-матрикс. Низкая представленность белков контактов клетка-клетка в сфероидах отражает таковую в моделях опухоли *in vivo*, однако имеются существенные отличия моделей по белку контактов клетка-матрикс и мезенхимальному маркеру виментину. Эти данные в целом свидетельствуют об усилении мезенхимальности фенотипа клеток аденокарциномы яичника при формировании трехмерной структуры, тем более в условиях организма, что может являться фактором развития устойчивости опухоли к терапевтическому воздействию.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что при переходе к трехмерному культивированию в виде сфероидов клетки аденокарциномы яичника человека приобретают устойчивость к терапевтическим агентам различной природы: цитостатическому антибиотику доксорубину и рекомбинантному таргетному противоопухолевому токсину DARPIn-LoPE, причем для высокомолекулярного агента приобретаемая устойчивость более выражена.
2. Глубина проникновения HER2-специфичного таргетного токсина DARPIn-LoPE и сопоставимого по молекулярной массе бычьего сывороточного альбумина в толщу опухолевого сфероида со сверхэкспрессией HER2 совпадает и не превышает 70 мкм. Это свидетельствует о незначительной роли «барьера связывания» при развитии устойчивости к высокомолекулярному агенту за счет ограничения его проникновения.
3. Представленность рецептора-онкомаркера HER2 на клетках линий аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и SKOV-3.ip при переходе к трехмерному культивированию возрастает.
4. Клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3 и SKOV-3.ip характеризуются отсутствием экспрессии E-кадгерина. При переходе к культивированию клеток в сфероидах происходит снижение представленности белков межклеточных контактов, в том числе белка щелевых контактов коннексина-43 и белков плотных контактов окклюдина и ZO-1 на фоне низкой представленности белка десмосом десмоглеина-2. Снижение межклеточной адгезии служит маркером эпителиально-мезенхимального перехода и может свидетельствовать о приобретении клетками более агрессивного фенотипа.
5. Выявлено относительное сходство сфероидов аденокарциномы яичника человека и ксенографтных опухолевых моделей по представленности E-кадгерина, десмоглеина-2 и коннексина-43. В то же время, для линии SKOV-3 обнаружено значимое преобладание интегрина $\beta 1$ в сфероидах по сравнению с моделями *in vivo*. Для линии SKOV-3.ip обнаружено значимое преобладание виментина в моделях *in vivo* по сравнению со сфероидами и статистически значимый более низкий уровень представленности окклюдина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список ВАК:

1. Sokolova E.A., Proshkina G.M., **Kutova O.M.**, et al. Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPIn possesses a strong selective cytotoxic effect in vitro and a potent antitumor activity in vivo // J Control Release. – 2016. – Vol. 233. – P.48-56.
2. Sokolova E.A., Proshkina G.M., **Kutova O.M.**, Balalaeva I.V., Deyev S.M. The effect of the targeted recombinant toxin DARPIn-PE40 on the dynamics of HER2-positive tumor growth // Acta Naturae. – 2017. – Vol. 9. – Issue 3. – P. 103-107.
3. Sokolova E.A., **Kutova O.M.**, Grishina A.D., et al. Penetration efficiency of antitumor agents in ovarian cancer spheroids: the case of recombinant targeted toxin

DARPin-LoPE and the chemotherapy drug, doxorubicin // *Pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 11. – Issue 5. – Article No. 219.

4. Guryev E.L., Shilyagina N.Y., Kostyuk A.B., Sencha L.M., Balalaeva I.V., Vodeneev V.A., **Kutova O.M.** et al. Preclinical study of biofunctional polymer-coated upconversion nanoparticles // *Toxicol Sci*. – 2019. – Vol. 170. – Issue 1. – P. 123-132.

5. **Kutova O.M.**, Guryev E.L., Sokolova E.A., Alzeibak R., Balalaeva I.V. Targeted delivery to tumors: multidirectional strategies to improve treatment efficiency // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11. – Issue 1. – Article No. 68.

6. **Kutova O.M.**, Sencha L.M., Pospelov A.D., Dobrynina O.E., Brilkina A.A., Cherkasova E.I., Balalaeva I.V. Comparative analysis of cell-cell contact abundance in ovarian carcinoma cells cultured in two- and three-dimensional in vitro models // *Biology (Basel)*. – 2020. – Vol. 9. – Issue 12. – Article No. 446.

7. **Kutova O.M.**, Pospelov A.D., Krylova L.V., Gorshkova E.N., Balalaeva I.V. Adhesion proteins profile and localization in ovarian carcinoma cell lines // *Opera Medica et Physiologica*. – 2021. – Vol. 8. – Issue 2. – P. 43-54.

Материалы конференций

8. Deyev S.M., **Kutova O.M.**, Lebedenko E.N., Proshkina G.M., Schulga A.A., Sokolova E.A. Bifunctional recombinant protein agent based on pseudomonas exotoxin a fragment for targeted therapy of HER2-positive tumors // *Proceedings of the Scientific-Practical Conference «Research and Development – 2016»*. – Moscow, 2016. – P. 563-572.

9. **Кутова О.М.**, Соколова Е.А., Гурьев Е.Л., Деев С.М., Балалаева И.В. Анализ эффективности противоопухолевого рекомбинантного иммунотоксина на основе экзотоксина А и HER2 специфичного дарпина // Тезисы докладов 70-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2017. – С.99.

10. **Кутова О.М.**, Соколова Е.А., Гурьев Е.Л., Деев С.М., Балалаева И.В. Исследование эффективности противоопухолевого HER2-специфичного рекомбинантного иммунотоксина на основе дарпина и экзотоксина А // Тезисы докладов 21-й Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2017. – С. 228.

11. **Кутова О.М.** Анализ эффективности противоопухолевого рекомбинантного иммунотоксина на основе экзотоксина А и HER2-специфичного дарпина // Тезисы докладов участников III Всероссийского научного форума «Наука будущего – наука молодых». – Нижний Новгород, 2017. – С. 254-256.

12. **Кутова О.М.**, Соколова Е.А., Гурьев Е.Л., Деев С.М., Балалаева И.В. Анализ эффективности таргетного противоопухолевого токсина на основе экзотоксина А и дарпина, специфичного к рецептору HER2 // Тезисы докладов 71-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2018. – С. 126.

13. Морозова А.А., **Кутова О.М.**, Пескова Н.Н., Гурьев Е.Л., Балалаева И.В. Выделение H₂O₂-чувствительного белкового сенсора NuPer и изучение его спектральных характеристик // Тезисы докладов 71-ой Всероссийской с

международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2018. – С. 158.

14. **Кутова О.М.**, Соколова Е.А., Гришина А.Д., Гурьев Е.Л., Балалаева И.В. Влияние молекулярной массы противоопухолевых агентов на эффективность их проникновения в опухолевый сфероид *in vitro* // Тезисы докладов 72-ой Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2019. – С. 132.

15. **Кутова О.М.**, Соколова Е.А., Гурьев Е.Л., Балалаева И.В. Влияние размера противоопухолевых агентов на эффективность их проникновения в толщу опухолевого сфероида *in vitro* // Тезисы докладов 24-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пущино, 2020. – С. 336.

16. **Кутова О.М.**, Соколова Е.А., Балалаева И.В. Особенности профиля экспрессии белков межклеточных контактов в опухолевых клетках при различных условиях культивирования // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2020. – С. 119.

17. Симонова В.С., **Кутова О.М.**, Соколова Е.А., Балалаева И.В. исследование цитотоксичности противоопухолевых агентов на трехмерной культуре клеток аденокарциномы яичника человека с гиперэкспрессией рецептора HER2 // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2020. – С. 193.

18. Лубков Г.А., Соколова Е.А., **Кутова О.М.**, Деев С.М., Балалаева И.В. Исследование эффективности противоопухолевого таргетного рекомбинантного токсина на флуоресцирующей модели опухоли человека // Тезисы докладов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2020. – С. 127.

19. Сенча Л.М., **Кутова О.М.**, Добрынина О.Е., Брилкина А.А., Черкасова Е.И., Балалаева И. В. Сравнение экспрессии белков межклеточных контактов в клетках карциномы яичника, культивируемых в монослое и коллагеновом гидрогеле // Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», посвященной памяти проф. А.П. Веселова. – Нижний Новгород, 2021. – С. 197.

20. Сухова В.А., Крылова Л.В., Воловецкий А.Б., **Кутова О.М.**, Юдинцев А.В., Балалаева И.В., Воденеев В.А., Звягин А.В., Шилягина Н.Ю., Гурьев Е.Л. Исследование действия тераностических комплексов на основе антистоксовых нанофосфоров на опухолевых моделях *in vitro* и *in vivo* // Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», посвященной памяти проф. А.П. Веселова. – Нижний Новгород, 2021. – С. 213.

21. Филяева Н.И., Крылова Л.В., Воловецкий А.Б., **Кутова О.М.**, Гурьев Е.Л., Балалаева И.В., Воденев В.А., Звягин А.В., Шилягина Н.Ю. Анализ биораспределения тераностических комплексов на основе радиоактивных нанофосфоров и низкоиммуногенного таргетного белкового токсина в организме животных с ксенографтными опухолями человека // Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», посвященной памяти проф. А.П. Веселова. – Нижний Новгород, 2021. – С. 230.
22. **Кутова О.М.**, Сенча Л.М., Пospelов А.Д., Добрынина О.Е., Брилкина А.А., Черкасова Е.И., Балалаева И.В. Представленность белков межклеточных контактов в клетках карциномы яичника в условиях двухмерного и трехмерного культивирования // Тезисы докладов 11-ой международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». – Пушкино, 2021. – С. 180-185.
23. **Kutova O.**, Sokolova E., Guryev E., Deyev S., Balalaeva I. Efficiency evaluation of an anticancer recombinant targeted toxin based on DARPin and truncated exotoxin A // Abstracts of the 45th FEBS Congress. – Ljubljana, 2021. – P. 327.
24. Sencha, L.M., **Kutova, O.M.**, Dobrynina, O.E., Pospelov, A.D., Balalaeva, I.V. Phenotypic plasticity of ovarian carcinoma cells lead to higher resistance to treatment when cultivated in collagen-based 3D model // Proceedings of the 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. – Basel, 2021. Электронный ресурс. doi:10.3390/ECMC2021-11548.