Российская академия наук
Сибирское отделение
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Новосибирский национальный исследовательский государственный
университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ)

На правах рукописи

Одаренко Кирилл

Разработка новых подходов терапевтического ингибирования эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Марков Андрей Владимирович

Новосибирск, 2026

Содержание

Список сокращений 6

Введение 8

1. Обзор литературы 14

Введение 14

1.1. Молекулярно-биологическая характеристика эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) 15

1.1.1. Молекулярные и структурные изменения в клетках в процессе ЭМП 15

1.1.2. Сигнальные пути ЭМП 17

1.1.3. Частичный ЭМП 20

1.1.4. Участие ЭМП в инициации опухолей 21

1.1.5. Участие ЭМП в метастазировании 21

1.1.6. Мезенхимально-эпителиальный переход 22

1.1.7. Связь ЭМП с приобретенной лекарственной устойчивостью 23

1.1.8. Подобные ЭМП процессы в опухолях нейроэктодермального происхождения 26

1.2. Подавление ЭМП как стратегия терапии онкологических заболеваний 30

1.2.1. Разработка ингибиторов ЭМП с использованием мишень-ориентированного подхода 30

1.2.2. Разработка анти-ЭМП препаратов с использованием фенотип-ориентированного подхода 47

1.2.3. Перепрофилирование лекарственных агентов для ингибирования ЭМП и пронейрально-мезенхимального перехода (ПМП) опухолевых клеток 55

Заключение 61

2. Материалы и методы 63

2.1. Материалы 63

2.1.1. Реактивы и препараты 63

2.1.2. Оборудование 65

2.1.3. Буферы и растворы 65

2.1.4. Праймеры для PCR 67
2.1.5. Культуры клеток 67
2.1.6. Культивирование клеток 67
2.1.7. Лабораторные животные 68
2.1.8. Используемые данные 68
2.1.9. Программное обеспечение 71
2.2. Методы 71
2.2.1. Анализ жизнеспособности клеток 71
2.2.2. Анализ фенотипических проявлений ЭМП в опухолевых клетках 72
2.2.3. Оценка морфологии клеток 75
2.2.4. Тест зарастания царапины 76
2.2.5. Миграция и инвазия трансвелл 76
2.2.6. Оценка адгезионной способности клеток 77
2.2.7. RT-qPCR 77
2.2.8 Вестерн-блот 78
2.2.9. Иммунофлуоресцентное окрашивание 79
2.2.10. Проточная цитометрия 79
2.2.11. Анализ синергического действия пара-метиланилида солоксолона (пМАС) и темозоломида (TMZ) 82
2.2.12. Иммуноферментный анализ 82
2.2.13. Анализ клоногенной способности 83
2.2.14. Анализ роста опухолевых сфероидов 83
2.2.15. Молекулярный докинг 84
2.2.16. Исследование эффекта соединений с помощью мышиных моделей *in vivo* 85
2.2.17. Реанализ транскриптомных данных 87
2.2.18. *In silico* перепрофилирование лекарственных препаратов 90
2.2.19. Статистический анализ 91
3. Результаты и обсуждение 92

Введение 92

3.1. Исследование способности солоксолон метила (СМ) ингибировать ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека 94

3.1.1. Оценка влияния СМ и триоксолон метила (ТМ) на миграцию клеток аденокарциномы легкого человека 94

3.1.2. Оценка влияния СМ на TGF-β1-индуцированный ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека 96

3.2. Исследование способности СМ ингибировать лептин-индуцированное усиление метастатического потенциала клеток нейробластомы мыши 99

3.2.1. Исследование влияния лептина на НМП клеток нейробластомы мыши 100

3.2.2. Оценка влияния СМ на лептин-индуцированное усиление метастатического потенциала клеток НБ 101

3.2.3. Исследование молекулярного механизма действия лептина и СМ в клетках НБ 102

3.3. Исследование способности амидных производных СМ ингибировать ПМП клеток глиобластомы человека 105

3.3.1. Скрининг ингибирующей активности амидов солоксолона в отношении ПМП клеток глиобластомы человека 105

3.3.2. Оценка влияния пара-метиланилид солоксолона (пМАС) на TGF-β1-индуцированный ПМП клеток глиобластомы человека 107

3.3.3. Исследование молекулярного механизма ингибирования ПМП клеток глиобластомы под действием пМАС 109

3.3.4. Исследование влияния пМАС на чувствительность клеток глиобластомы к цитотоксическому действию TMZ 111

3.4. Исследование влияние СМ и пМАС на опухолевую прогрессию *in vivo* 116

3.5. Исследование роли *ADAMTS6* в ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека ... 120

3.5.1. Оценка регуляторного потенциала *ADAMTS6* с помощью анализа генных сетей 120

3.5.2. Верификация роли *ADAMTS6* как потенциального регулятора ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека 124

3.5.3. Исследование ингибирования *ADAMTS6* как стратегии подавления ЭМП в клетках аденокарциномы легкого человека *in vitro* 127

3.5.4. Связь ADAMTS6 с клинико-патологическим профилем пациентов с АЛ 132

3.6. Поиск потенциальных ингибиторов ПМП клеток глиобластомы в библиотеке низкомолекулярных соединений с помощью перепрофилирования, основанного на анализе транскриптомных данных 134

3.6.1. Определение генной сигнатуры ПМП 134

3.6.2. *In silico* перепрофилирование с использованием подходов connectivity map и сетевой фармакологии 139

3.6.3. Исследование способности соединения-лидера SP600125 ингибировать ПМП клеток глиобластомы человека *in vitro* 143

Заключение 149

4. Выводы 151

5. Список литературы 152

Приложение 189

Список сокращений

ADAMTS6 – дезинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновыми мотивами 6

DMSO – диметилсульфоксид

DOX – доксорубицин

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

NAC – N-ацетил-L-цистеин

PBS – фосфатно-солевой буфер

RNA-seq – секвенирование РНК

scRNA-seq – секвенирование РНК одиночных клеток

TMZ – темозоломид

U87 – клеточная линия U-87 MG глиобластомы человека

АЛ – аденокарцинома легкого

АФК – активные формы кислорода

ВКМ – внеклеточный матрикс

ГБ – глиобластома

ГСК – глиобластомные стволовые клетки

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ИФ – иммунофлуоресценция

КР – колоректальный рак

МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход

НБ – нейробластома

НМП – норадренергическо-мезенхимальный переход

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ОК – олеаноловая кислота

пМАС – пара-метиланилид солоксолона

ПМП – пронейрально-мезенхимальный переход

ПРП – плоскоклеточный рак пищевода

ПРПР – плоскоклеточный рак полости рта

РЖ – рак желудка

РМЖ – рак молочной железы

РПЖ – рак поджелудочной железы

РПрЖ – рак предстательной железы

РСК – раковые стволовые клетки

РШМ – рак шейки матки

РЭ – рак эндометрия

РЯ – рак яичников

СМ – солоксолон метил

СТА – солоксолон триптамид

ТМ – триоксолон метил

ТФ – транскрипционный фактор

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

Введение

Актуальность работы

В 2022 году в мире было зарегистрировано около 20 миллионов новых случаев онкологических заболеваний и 9,7 миллионов смертей от них [1]. В 2019 году в России эти показатели составили 639000 и 294400 соответственно [2]. Высокая смертность от рака, уступающая только заболеваниям сердечно-сосудистой системы, указывает на необходимость создания новых стратегий терапии данного класса заболеваний [3]. Ключевыми препятствиями на пути современной противоопухолевой терапии являются метастазирование и приобретение опухолями лекарственной устойчивости. В случае карцином, опухолей эпителиального происхождения, метастазирование включает проникновение опухолевых клеток в окружающие здоровые ткани, распространение через кровеносную или лимфатическую систему и колонизацию ими отдаленных органов с образованием вторичных опухолей (метастазов) [4]. Системное метастазирование редко наблюдается при глиобластоме (ГБ), наиболее распространенной опухоли головного мозга. Вместо этого клетки ГБ осуществляют локальную инвазию тканей головного мозга, вызывая размытие границ опухоли и затрудняя ее полное хирургическое удаление [5]. Лекарственная устойчивость опухолей во многом связана с популяцией раковых стволовых клеток (РСК), способных переживать терапевтическое воздействие в спящем (дормантном) состоянии и обеспечивать рецидив опухоли [6]. Таким образом, для повышения эффективности лечения необходимо как подавление метастатического потенциала опухолевых клеток, так и устранение РСК-опосредованной резистентности.

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) является одним из активно исследуемых молекулярных механизмов опухолевой прогрессии. В ходе ЭМП эпителиальные опухолевые клетки, изначально слабоподвижные и прочно связанные друг с другом, переходят в мезенхимально-подобный фенотип, утрачивая межклеточные контакты и приобретая высокий миграционный и инвазивный потенциал [7]. ЭМП индуцируется многими факторами опухолевого микроокружения; в его регуляции принимают участие сигнальные пути TGF-β, WNT/β-катенин, HIF-1α, Hippo/YAP и NOTCH и транскрипционные факторы SNAI1/2, ZEB1/2 и TWIST1/2 [8]. Клетки, перешедшие в мезенхимальный фенотип, распространяются из первичной опухоли, после чего они могут проходить обратный мезенхимально-эпителиальный переход и давать начало метастазам [7]. Кроме того, сигнальные пути ЭМП индуцируют повышение уровней мастер-регуляторов РСК в опухолевых клетках, тем самым увеличивая их устойчивость к радио- и химиотерапии [6]. Для опухолей нейроэктодермального происхождения, ГБ и нейробластомы (НБ), выявлены специфические типы ЭМП: пронейрально-мезенхимальный переход (ПМП) и норадренергическо-мезенхимальный переход (НМП) соответственно. Хотя

механизмы регуляции ПМП, НМП и классического ЭМП различаются, влияние данных процессов на функциональные характеристики опухолевых клеток схоже и включает усиление инвазивного потенциала и лекарственной устойчивости [9,10].

Учитывая ключевую роль ЭМП в патогенезе многих онкологических заболеваний, этот процесс является перспективной терапевтической мишенью. Хотя ингибиторы сигнальных путей ЭМП демонстрировали высокий противоопухолевый эффект в доклинических исследованиях, в клинических испытаниях они не обеспечили значимого подавления прогрессирования опухолей [8]. Поэтому актуальной задачей является поиск более эффективных способов подавления ЭМП, для чего в настоящее время используются три основные стратегии.

- **Фенотип-ориентированный подход** используют для поиска ингибиторов ЭМП в библиотеках низкомолекулярных соединений. Его первый этап обычно включает скрининг таких библиотек по влиянию на одно из фенотипических проявлений ЭМП, например, изменение морфологии клеток. Затем для лидерных соединений проводится масштабный анализ их эффектов на другие параметры ЭМП, включая усиление миграции, инвазии и экспрессии мезенхимальных генов в опухолевых клетках [11,12]. Перспективными кандидатами на роль ингибиторов ЭМП являются цианоенон-несущие полусинтетические тритерпеноиды. В частности, для производного олеаноловой кислоты CDDO-Me (бардоксолон метил) была показана способность подавлять мезенхимальный переход в клетках ГБ [13] и плоскоклеточной карциномы [14]. Однако, его терапевтический потенциал остается ограниченным из-за низкого проникновения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), отсутствия данных о влиянии на ЭМП в опухолях других типов и фрагментарных представлений о молекулярных механизмах этого эффекта. В этой связи исследование солоксолон метила, отечественного структурного аналога CDDO-Me на основе 18βH-глицирретовой кислоты [15,16], и его амидных производных, способных эффективно проникать в ткани мозга [17], может способствовать более глубокому пониманию анти-ЭМП потенциала цианоенон-содержащих тритерпеноидов и молекулярных основ их действия на фенотипическую пластичность опухолевых клеток.
- **Мишень-ориентированный подход** применяют в тех случаях, когда для определенного белка установлена ключевая роль в регуляции ЭМП. Это позволяет рассматривать данный белок как мишень для рационального дизайна новых ингибиторов [18–20]. Примерами таких мишеней могут служить LEPR, рецептор лептина, и внеклеточные протеазы семейства ADAMTS, участвующие в активации TGF-β из латентной формы. Известно, что гормон жировой ткани лептин способен

индуцировать ЭМП [21], а ингибиторы LEPR демонстрировали высокий противоопухолевый потенциал в доклинических исследованиях, снижая инвазивность и стволовость опухолевых клеток эпителиального происхождения [22,23]. Несмотря на выявленную проопухолевую активность лептина в клетках нейробластомы [24], его влияние на НМП не изучалось, вследствие чего остается неизвестным, может ли блокада лептинового сигнального пути служить стратегией подавления мезенхимальной пластичности клеток нейробластомы и агрессивности их роста. В случае белков семейства ADAMTS, прямая связь с ЭМП выявлена для ADAMTS1, чье ингибирование подавляло ЭМП и метастатический потенциал опухолевых клеток [25]. Согласно ряду исследований другие члены семейства ADAMTS также связаны с индукцией ЭМП [26,27], однако их терапевтическое значение недостаточно изучено. В частности, в клетках аденокарциномы легкого (АЛ) ЭМП сопровождается активацией гена *ADAMTS6* [28], что может указывать на возможное участие кодируемой им протеазы в регуляции этого процесса. Тем не менее ADAMTS6 до настоящего времени не рассматривалась в качестве мишени для анти-ЭМП терапии.

- **Перепрофилирование лекарств** направлено на выявление анти-ЭМП потенциала у известных агентов, изначально предназначенных для терапии других патологических состояний. Для работы с объемными библиотеками соединений с этой целью все чаще применяют методы *in silico*. В частности, с помощью анализа транскриптомных сигнатур методом connectivity map удалось идентифицировать ряд новых ингибиторов ЭМП [29,30]. Однако до сих пор неизвестно, можно ли адаптировать подобные *in silico* подходы к молекулярно-генетическим особенностям ГБ для поиска ингибиторов ПМП.

Перечисленные выше пробелы в понимании механизмов и терапевтического контроля ЭМП/ПМП/НМП определяют актуальные направления исследований, продвижение в которых позволит приблизиться к расшифровке основ управления фенотипической пластичностью опухолевых клеток.

Цель и задачи исследования

Целью работы является поиск подходов к ингибированию эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток.

В ходе исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить влияние солоксолон метила на эпителиально-мезенхимальный переход опухолевых клеток, а также на процессы, регулируемые в этих клетках лептином.

2. Выявить эффективные ингибиторы пронейрально-мезенхимального перехода клеток глиобластомы среди производных солоксолон метила, содержащих в положении С-30 амидные группы различной структуры.
3. Оценить влияние подавления гена *ADAMTS6* на эпителиально-мезенхимальный переход клеток аденокарциномы легкого.
4. С использованием *in silico* метода connectivity map идентифицировать ингибиторы пронейрально-мезенхимального перехода в библиотеке известных лекарственных агентов и верифицировать их активность на клетках глиобластомы *in vitro*.

Научная новизна работы

Впервые установлено, что цианоенон-содержащие тритерпеноиды (на примере солоксолон метила (СМ)) подавляют приобретение клетками А549 аденокарциномы легкого человека мезенхимального фенотипа, индуцированного трансформирующим ростовым фактором TGF-β1.

Впервые описано влияние адипокина лептина на злокачественные характеристики клеток нейробластомы. Показано, что лептин усиливает миграцию клеток Neuro2a нейробластомы мыши, но при этом не индуцирует их НМП. Тритерпеноид СМ снижает эффект лептина в клетках Neuro2a за счет ингибирования сигнального пути ERK1/2.

Впервые выявлены низкомолекулярные ингибиторы ПМП клеток глиобластомы человека в библиотеке амидов солоксолона. Лидерное соединение пара-метиланилид солоксолона (пМАС) эффективно ингибирует TGF-β1-индуцированный ПМП клеток U87 глиобластомы человека. Кроме того, пМАС подавляет стволовые характеристики клеток, включая их способность к самообновлению и внутриклеточную активность альдегиддегидрогеназы (ALDH), а также повышает чувствительность клеток к цитотоксическому агенту темозоломиду. Показано, что пМАС в режиме монотерапии или в комбинации с темозоломидом эффективно подавляет рост ГБ человека в модели подкожных ксенографтов *in vivo*.

Впервые показана ключевая роль гена *ADAMTS6* в регуляции ЭМП клеток аденокарциномы легкого *in silico*. Показано, что нокаут *ADAMTS6* ингибирует ЭМП клеток А549 аденокарциномы легкого человека за счет подавления сигнального пути NF-κB.

Анализ транскриптомных данных и метод connectivity map были впервые использованы для поиска ингибиторов ПМП в библиотеке одобренных и экспериментальных лекарственных препаратов. Показано, что антрапиразолон SP600125 эффективно ингибирует ПМП, индуцированный TGF-β1 и гипоксией, в клетках U87 глиобластомы человека *in vitro*.

Практическая значимость работы

Практическая значимость работы заключается в разработке новых подходов к ингибированию ЭМП, которые могут быть применены в терапии онкологических заболеваний. В частности, был идентифицирован новый ингибитор ЭМП, СМ, обладающий значительным антиметастатическим потенциалом. Были выявлены два новых ингибитора ПМП, пМАС и SP600125, которые могут быть включены в существующие схемы лечения глиобластомы для снижения инвазии опухолевых клеток и повышения их чувствительности к химиотерапии темозоломидом. Кроме того, протеаза ADAMTS6 была определена как перспективная терапевтическая мишень для разработки ингибиторов ЭМП.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Полусинтетический тритерпеноид солоксолон метил ингибирует эпителиально-мезенхимальный переход клеток A549 аденокарциномы легкого человека, а также снижает прометастатический эффект лептина на клетки Neuro2a нейробластомы мыши.
2. Полусинтетический тритерпеноид пара-метиланилид солоксолона ингибирует пронейрально-мезенхимальный переход клеток U87 глиобластомы человека, снижая их инвазивный потенциал и повышая чувствительность к темозоломиду за счет подавления сигнального пути TGF-β/SMAD2/3.
3. Солоксолон метил и пара-метиланилид солоксолона проявляют высокую противоопухолевую активность на опухолевых моделях *in vivo*: солоксолон метил подавляет метастазирование клеток B16 меланомы мыши в легкие, а пара-метиланилид солоксолона замедляет рост опухолей U87 глиобластомы человека.
4. Ген *ADAMTS6* вовлечен в регуляцию эпителиально-мезенхимального перехода клеток A549 аденокарциномы легкого человека.
5. Идентифицированный методом connectivity map антрапиразолон SP600125 подавляет пронейрально-мезензимальный переход клеток U87 глиобластомы человека *in vitro*.

Публикации и апробация результатов

По материалам диссертации опубликовано 5 экспериментальных статей и 1 обзор в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus: International Journal of Molecular Sciences, Molecules, Frontiers in Pharmacology, Pharmaceuticals. Результаты работы представлены на 9 международных и всероссийских конференциях.

Личный вклад автора

Реанализ транскриптомных данных, компьютерное моделирование и эксперименты на клеточных моделях выполнены автором лично. Планирование экспериментов, анализ и

обсуждение результатов проведены под руководством к.б.н. Маркова А. В., концепция работы разработана совместно с чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. Зенковой М. А. Синтез полусинтетических производных 18βH-глицирретовой кислоты выполнен в Лаборатории физиологически активных веществ (ЛФАВ) Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (НИОХ СО РАН) под руководством к.х.н. Саломатиной О. В. и чл.-корр. РАН, д.х.н., проф. Салахутдинова Н. Ф. Клетки A549, нокаутные по гену *ADAMTS6,* были получены и охарактеризованы в Лаборатории геномного редактирования (ЛГР) Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН (ИХБФМ СО РАН) Матвеевой А. М. под руководством к.х.н. Степанова Г. А. Эксперименты по исследованию эффекта соединений на мышиных моделях были выполнены в Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот (ЛБНК) ИХБФМ СО РАН под руководством к.м.н. Сеньковой А. В. Конфокальная микроскопия проведена совместно с к.б.н. Марковым О. В. (ЛБНК ИХБФМ СО РАН).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 193 страницах, включает 41 рисунок, 7 таблиц и 1 приложение. Список литературы содержит 376 источников.

1. Обзор литературы

Введение

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – биологический процесс, в ходе которого эпителиальные клетки претерпевают молекулярные и функциональные изменения, в результате чего они частично или полностью перенимают мезенхимальную идентичность. Для эпителиальных клеток характерно образование слоев за счет формирования прочных межклеточных связей, включающих десмосомы, адгезивные, щелевые и плотные контакты. Поверхности клеток, обращенные к внешней стороне и базальной мембране, отличаются по составу и функции, то есть для организации эпителия характерна апико-базальная полярность. В отличие от них, мезенхимальные клетки имеют слабые межклеточные контакты и развивают переднезаднюю полярность за счет образования актиновых стресс-фибрилл и интегрин-содержащих фокальных контактов, которые облегчают активную миграцию клеток [31].

Впервые ЭМП был продемонстрирован в работе Хей и Гринберга 1982 года, где клетки мигрировали из зрелого и зародышевого эпителиев, помещенных в коллагеновый гель [32]. На снимках электронного микроскопа мигрировавшие клетки были неотличимы от мезенхимальных клеток: имели вытянутую форму, цитоплазму, богатую секреторными органеллами, и мембрану с выступами в виде псевдоподий и филоподий [32]. В 1990-х годах было установлено, что функции ЭМП зависят от биологического контекста, что привело в 2008 году к выделению трех типов ЭМП: типа I, являющегося механизмом эмбриогенеза; типа II, участвующего в регенерации тканей и фиброзе; и типа III, ассоциированного с прогрессированием злокачественных заболеваний [7].

Важное значение во всех трех типах ЭМП имеет его обратимость и возвращение к эпителиальному фенотипу в результате мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП). Например, во время эмбриогенеза клетки аксиальной мезодермы подвергаются ЭМП, чтобы отделиться от эпибласта, после чего они проходят МЭП, чтобы внедриться в энтодерму и сформировать хордальную пластинку [33]. При повреждении кожи кератиноциты претерпевают ЭМП, чтобы мигрировать в рану, а затем возвращаются в эпителиальное состояние для успешного ее заживления – блокирование этого процесса способствует фиброзу и образованию рубцов [34]. Опухолевые клетки проходят ЭМП при инвазии, а затем МЭП – при формировании метастазов в лимфатических узлах [35].

В настоящем обзоре основное внимание уделяется ЭМП III типа, его роли в прогрессировании опухолей и его связи с другими механизмами злокачественности: воспалением, стволовыми свойствами и лекарственной устойчивостью.

1.1. Молекулярно-биологическая характеристика эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП)

1.1.1. Молекулярные и структурные изменения в клетках в процессе ЭМП

Исследования *in vitro* показали, что при ЭМП опухолевые клетки претерпевает значительные изменения на молекулярном уровне (Рис. 1А). Транскрипционные факторы (ТФ) SNAIL (SNAI1), SLUG (SNAI2), ZEB1/2 и TWIST1/2 связываются с последовательностями E-бокс в ДНК [36–41]. Это приводит к подавлению экспрессии генов, характерных для эпителиальных клеток, включая *CDH1* [42–45], *OCLN* [46], *CLDN1/3/4/7* [46–48], *TJP1* [18,44,49] и *KRT8/17/18/19* [18,46,50], и одновременно к активации генов мезенхимальной дифференцировки, таких как *CDH2* [42,43,45,51], *VIM* [42–44,51], *FN1* [18,43,50] и *MMP2/9* [18,49]. Посттрансляционные модификации и взаимодействие с белками-партнерами переключают ТФ между репрессорной и активаторной функциями. В частности, TWIST1 взаимодействует с комплексом ремоделирования нуклеосом и деацетилазы NuRD для репрессии эпителиальных генов, тогда как его ацетилирование по лизинам 72 и 76 стимулирует связывание с комплексом гистоновой ацетилтрансферазы NuA4/TIP60 и активацию мезенхимальных генов [50]. По умолчанию ZEB1 действует как транскрипционный репрессор, но при связывании с коактиваторами P300 и YAP переключается на усиление транскрипции генов, ассоциированных с ЭМП [52–54]. Кроме того, ТФ ЭМП формируют взаимоподдерживающие регуляторные связи, подавляя экспрессию микроРНК miR200/203/205, которые нацелены на их собственные мРНК [37].

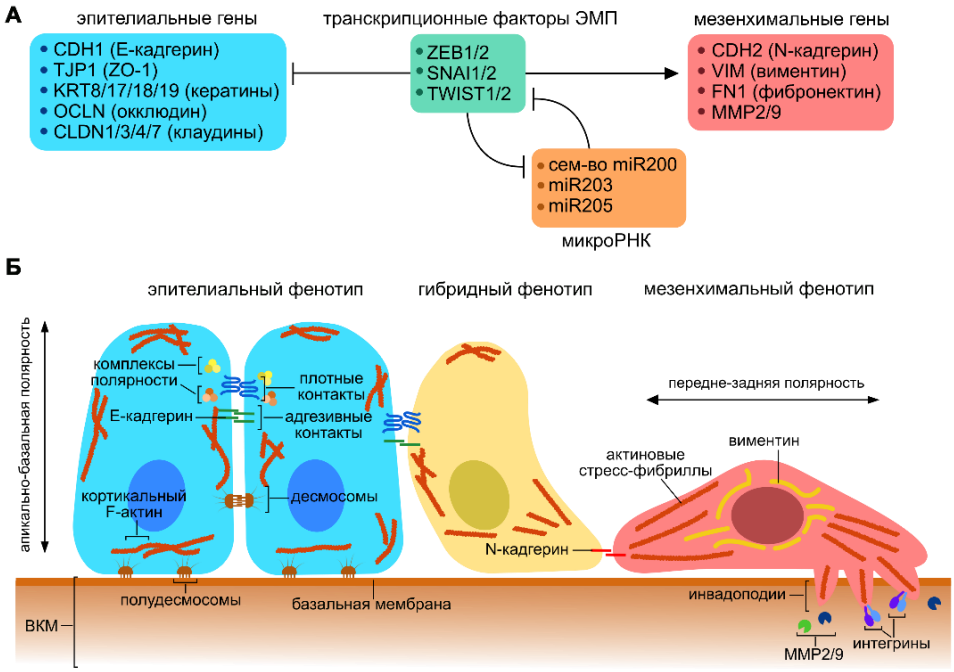

Рисунок 1. ЭМП опухолевых клеток. (**А**) В ходе ЭМП ТФ ZEB1/2, SNAI1/2 и TWIST1/2 подавляют экспрессию эпителиальных генов и активируют экспрессию мезенхимальных генов.

(**Б**) Переход от эпителиального к мезенхимальному фенотипу сопровождается потерей комплексов полярности, ослаблением межклеточных контактов, реорганизацией актинового цитоскелета и формированием выростов мембраны, что способствует усилению миграционной и инвазивной способности клеток.

Сдвиг транскрипционной программы ведет к кардинальным изменения клеточного фенотипа. Эпителиальные клетки имеют округлую форму и при выращивании в виде плотного монослоя формируют полигональную структуру, напоминающую “булыжную мостовую” (cobblestone). В отличие от них, мезенхимальные клетки, прошедшие ЭМП, имеют вытянутую ланцетовидную форму и редко образуют плотный монослой [49,55]. Такой переход сопровождается усилением миграционной и инвазивной активности клеток, которую *in vitro* оценивают с помощью теста зарастания царапины (scratch assay) и анализа миграции/инвазии в трансвелл-камерах (transwell migration/invasion assay) [18,42–44,46,47,49–51,56,57].

Усиление миграции и инвазии опухолевых клеток обеспечивается масштабной реорганизацией систем клеточной полярности, адгезии и цитоскелета (Рис. 1Б). Ключевым событием служит подавление комплексов полярности CRB3/PALS1/PATJ и PAR3/PAR6/aPKC, вызванное снижением уровней белков CRB3 и PAR3, а также дефосфорилированием PAR3 фосфатазой SHP2 [31,58,59]. Это нарушает сборку плотных контактов, в частности рекрутирование TJP1 и OCLN к мембране, что способствует отделению клеток от опухолевой массы и их миграции [58,59]. Кроме того, подавление PAR3 блокирует способность комплекса PAR3/PAR6/aPKC стимулировать убиквитинирование и протеасомную деградацию SNAI1, в результате чего последний стабилизируется и активирует транскрипционную программу ЭМП [60]. Эпителиальные адгезивные контакты, образованные взаимодействием E-кадгеринов (CDH1), заменяются мезенхимальными контактами на основе N-кадгеринов (CDH2), что значительно снижает прочность межклеточной адгезии [42,43,45,61,62]. Кортикальные пучки актина, расположенные под клеточной мембраной, перестраиваются в толстые параллельные стресс-фибриллы, пересекающие цитоплазму [63]. Через комплексы фокальной адгезии, состоящие из интегринов и ассоциированных с ними внутриклеточных белков, актин взаимодействует с ВКМ и участвует в образовании выростов на передней стороне клеток, псевдоподий и инвадоподий, обеспечивающих движение, сенсорные функции и инвазию [64–66]. Виментиновые (VIM) филаменты способствуют правильной организации стресс-фибрилл и фокальных контактов, усиливая механическую жесткость и сократительную способность клеток [67].

Опухолевые клетки инвазируют окружающие ткани, секретируя протеазы, которые разрушают ВКМ и тем самым облегчают их продвижение. Большую роль в этом процессе играют

матриксные металлопротеиназы 2 и 9 (MMP2/9), расщепляющие ламинин, коллагены IV/V и некоторые другие белки ВКМ [68–73]. Уровень MMP2/9 повышается при ЭМП, и помимо прямой деградации матрикса эти ферменты могут регулировать внутриклеточные сигнальные пути. Так, клетки опухолевого микроокружения секретируют трансформирующий ростовой фактор бета 1 (TGF-β1) в виде неактивного комплекса с латентно-ассоциированным полипептидом (LAP) и латентными TGF-β-связывающими белками (LTBP), которые прикрепляют его к ВКМ [74]. MMP2/9 расщепляют LAP, высвобождая TGF-β1, который затем активирует сигнальный путь SMAD2/3 в опухолевых клетках, что приводит к индукции их ЭМП: изменению морфологии, усилению миграции и инвазии, снижению уровня эпителиального маркера CDH1 и повышению уровней мезенхимальных маркеров CDH2, VIM и FN1 [70–73,75–77]. Таким образом, MMP2/9 выступают не только как эффекторы инвазии, но и как важные регуляторы ЭМП опухолевых клеток.

1.1.2. Сигнальные пути ЭМП

Многие факторы опухолевого микроокружения, включая ростовые факторы [78–81], гипоксию [82–84], повышенную механическую жесткость ВКМ [85] и воспаление [54,86–88], индуцируют ЭМП опухолевых клеток. Внешние сигналы индуцируют изменения в транскриптоме клеток (Рис. 1А) посредством активации сигнальных путей, наиболее важными среди которых являются TGF-β, WNT/β-катенин, HIF-1, Hippo и NOTCH.

TGF-β играет ключевую роль в гомеостазе тканей, подавляя пролиферацию клеток. Однако в ходе опухолевой прогрессии клеточный ответ на этот цитокин изменяется: его цитостатическое действие утрачивается, и, наоборот, TGF-β начинает стимулировать пролиферацию и метастатический потенциал [89]. В частности, TGF-β индуцирует ЭМП как через свой классический сигнальный путь SMAD2/3, так и через активацию неклассических сигнальных каскадов PI3K/AKT, ERK1/2 и JNK. В классическом пути TGF-β связывается с рецептором TGF-β типа 2 (TβRII), который рекрутирует и фосфорилирует рецептор TGF-β типа 1 (TβRI). Активированный TβRI фосфорилирует ТФ SMAD2 и SMAD3, после чего они образуют комплекс с SMAD4, перемещаются в ядро и запускают экспрессию генов, ассоциированных с ЭМП, включая *SNAI1* [42,78,90]. TGF-β также стимулирует репрессивные комплексы поликомб 1 и 2 (PRC1/2) к подавлению экспрессии эпителиальных генов *CDH1*, *MIR200A* и *CGN* [81,91]. В частности, гистоновая деметилаза KDM2B привлекает к промоторам PRC1, который убиквитинирует гистон H2A по остатку Lys119 (H2AK119Ub). Эта метка рекрутирует комплекс PRC2, метилтрансфераза EZH2 которого триметилирует гистон H3 по остатку Lys27 (H3K27me3), что приводит к подавлению транскрипции [91]. Кроме стимуляции TGF-β1, активация сигнального пути SMAD2/3 может происходить вследствие повышения экспрессии

генов-активаторов этого пути (*MECP2* и *MYOCD*) и снижения экспрессии генов-ингибиторов (*QKI-5* и *RGS6*) в опухолевых клетках. Метил-CpG-связывающий белок 2 (MECP2) за счет регуляции на уровне транскрипции повышает уровень протеазы FURIN, которая процессирует TGF-β1 в аппарате Гольджи, усиливая активацию SMAD2/3 в клетках рака поджелудочной железы (РПЖ) [78]. Транскрипционный коактиватор миокардин (MYOCD) повышает стабильность комплекса SMAD3/4, усиливая его ядерную транслокацию и активацию гена-мишени *SNAI1*. Кроме того, SMAD2/3 усиливает транскрипцию гена *MYOCD*, образуя петлю положительной обратной связи [42]. Связывающий РНК белок QKI-5 ускоряет деградацию мРНК *TGFBR1*, что приводит к снижению трансляции TβRI и подавлению ЭМП [79]. Ингибитор G-белков RGS6 дестабилизирует взаимодействие между SMAD2/3 и SMAD4, что также приводит к блокировке ЭМП [80].

WNT/β-катениновый путь регулирует самообновление и дифференциацию клеток в процессе эмбрионального развития. Нарушение регуляции этого пути тесно связано с инициацией и прогрессированием различных видов рака, что отчасти объясняется его важной ролью в запуске ЭМП [92]. Присоединение сигнальных белков WNT к рецептору FZD (Frizzled) или корецептору LRP5/6 вызывает фосфорилирование белка DVL (Dishevelled), который затем удаляет GSK3β (киназу-3 бета гликогенсинтазы) из «комплекса разрушения» APC/AXIN. Комплекс теряет способность фосфорилировать β-катенин (CTNNB1), в результате чего последний избегает протеасомной деградации, перемещается в ядро и вместе с ТФ TCF/LEF индуцирует экспрессию генов ТФ ЭМП [93,94], включая *ZEB1* [95], *SNAI1* [96] и *SNAI2* [97]. ТФ RUNX2 запускает глобальное ремоделирование хроматина, облегчающее связывание TCF/LEF со специфическими сайтами на ДНК [98]. Клетки обладают механизмами ингибирования сигнального пути WNT/β-катенин, однако они подавляются в процессе онкотрансформации. Гомеобоксный белок HOXC6 блокирует секрецию DKK1, антагониста LRP5/6 [44], а субъединица шаперона TRiC CCT5 нарушает взаимодействие CDH1 и β-катенина, вызывая транслокацию последнего в ядро [93].

Быстрый рост и недостаточное кровоснабжения снижают содержание кислорода в опухоли. Это активирует сигнальный путь индуцируемого гипоксией фактора-1 (HIF-1), который не только переключает метаболизм клеток на гликолиз и стимулирует ангиогенез, но и индуцирует их ЭМП [99]. HIF-1 состоит из конститутивной субъединицы HIF-1β и кислород-чувствительной субъединицы HIF-1α. При нормоксии пролилгидроксилазы (PHD) гидроксилируют HIF-1α по остаткам пролина [83], после чего лигазы VHL [84] и CBX4 [100] присоединяют к нему убиквитин и SUMO соответственно, тем самым стимулируя протеасомную деградацию. Гипоксия подавляет гидроксилирование, в результате чего HIF-1α стабилизируется, перемещается в ядро и в комплексе с HIF-1β и корегуляторами активирует экспрессию генов,

ассоциированных с ЭМП, включая *TWIST1* и *SNAI1* [82]. Помимо регуляции транскрипции, HIF-1α активирует ГТФазу RHOA, которая через киназу ROCK1 фосфорилирует LIM-киназу (LIMK) и легкую цепь миозина (MLC), запуская реорганизацию актинового цитоскелета с образованием стресс-фибрилл и филоподий [101]. Сигнальные пути HIF-1 и WNT/β-катенин образуют синергическое взаимодействие. В условиях гипоксии HIF-1α образует комплекс с β-катенином и активирует экспрессию гена *TCF7L2*, в то время как комплекс β-катенин/TCF регулирует усиление миграционной и инвазивной активности опухолевых клеток [102].

Сигнальный путь Hippo участвует в эмбриональном развитии и регенерации тканей. Не имея специальной пары лиганд–рецептор, он активируется различными факторами микроокружения [103]. Путь Hippo включает киназы MST1/2 и LATS1/2, ингибирующие транскрипционные коактиваторы YAP и TAZ через фосфорилирование. В опухолевых клетках подавление каскада MST1/2/LATS1/2 индуцирует перемещение YAP/TAZ в ядро, где они в комплексе с ТФ TEAD1–4 активируют гены, ассоциированные с ЭМП, включая *SNAI2* [103–105]. Путь Hippo играет важную роль в ЭМП, индуцированном механическим стрессом и гипоксией. Повышенная жесткость опухоли, вызванная синтезом и реорганизацией ВКМ, создает механическое напряжение, которое через натяжение актомиозиновых волокон передается на YAP, индуцируя его ядерную транслокацию [85,106,107]. Пептидилпролилизомераза PIN1 стимулирует ЭМП, индуцированный механическим стрессом, за счет повышения уровней актин-связывающего белка кофилина-1 (CFL1) и фибриллярного актина (F-актина) [85]. Гипоксия индуцирует повышение уровня актин-связывающего белка фасцина-1 (FSCN1) через сигнальный путь AKT/RAC1, что приводит к реорганизации актина, подавлению LATS1 и активации YAP [108].

Рецепторы NOTCH1–4 и их лиганды DLL1/3/4 и JAG1/2 являются трансмембранными белками, обеспечивающими межклеточные взаимодействия, играющие важную роль в эмбриогенезе, тканевом гомеостазе и прогрессировании опухолей. После связывания лиганда металлопротеаза ADAM и γ-секретаза расщепляют NOTCH, высвобождая внутриклеточный домен NICD, который перемещается в ядро и регулирует транскрипцию генов-мишеней в комплексе с ТФ CSL/RBPJ и коактиватором MAML [109]. NOTCH1 стимулирует ЭМП в опухолевых клетках различного гистогенеза [110–113], в то время как действие NOTCH3 зависит от контекста: он индуцирует ЭМП при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) и раке желудка (РЖ), но ингибирует данный процесс при раке молочной железы (РМЖ) [114–116]. Интересно, что NOTCH1 поддерживает дифференцировку клеток плоского эпителия путем повышения экспрессии *NOTCH3*. Однако TGF-β переключает NOTCH1 на активацию генов, ассоциированных с ЭМП, что приводит к опосредуемой ТФ ZEB1 репрессии *NOTCH3* и индукции мезенхимального фенотипа в клетках плоскоклеточного рака пищевода (ПРП) [117].

Фосфорилирование киназой CDK8 и убиквитинирование Е3-лигазой FBXW7 направляют внутриклеточный домен NOTCH1 (N1ICD) на протеасомную деградацию. Однако в опухолевых клетках белки-партнеры N1ICD могут препятствовать этим модификациям: субъединица 4 фактора репликации С (RFC4) предотвращает взаимодействие с CDK8 и FBXW7 [111], а ромбовидный белок 2 (RHBDL2) привлекает деубиквитиназу OTUD7B [118]. N1ICD активирует экспрессию гена *RFC4*, что создает контур положительной обратной связи [111].

Помимо описанных выше сигнальных путей, важную роль в индукции ЭМП играет воспалительное микроокружение, формирующееся в процессе взаимодействия опухолевых клеток с М1/М2 макрофагами, нейтрофилами, лимфоцитами и другими иммунными клетками. Способностью индуцировать ЭМП обладают многие ассоциированные с воспалением молекулы: цитокины TGF-β, интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли-альфа (TNF-α), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующего фактор (GM-CSF), хемокины семейства CC CCL2 и CCL22, а также внеклеточные везикулы, секретируемые опухоль-ассоциированными макрофагами [87,119–124]. Молекулярные механизмы ЭМП, индуцированного воспалением, подробно рассмотрены в нашем недавнем обзоре [125].

1.1.3. Частичный ЭМП

Недавние исследования с применением РНК-секвенирования отдельных клеток (scRNA-seq) и масс-цитометрии показывают, что под действием TGF-β опухолевые клетки могут реализовать две траектории дифференцировки: (1) полный ЭМП со сменой эпителиального фенотипа на мезенхимальный; и (2) частичный ЭМП с формированием гибридного фенотипа, сочетающего мезенхимальные и эпителиальные признаки [126,127]. Клетки мезенхимального фенотипа, теряя межклеточные контакты, мигрируют из опухоли по отдельности [128]. В отличие от них, клетки гибридного фенотипа сохраняют адгезивность и перемещаются в составе клеточных кластеров, где выступают в роли лидерных клеток, облегчающих продвижение более эпителиальных ведомых клеток [128,129]. ТФ NRF2 играет ключевую роль в стабилизации гибридного фенотипа. Нокдаун *NRF2* приводит к переходу клеток в полностью мезенхимальное состояние: увеличивает уровни ТФ ЭМП SNAI1 и ZEB1, стимулируя и подавляя экспрессию *VIM* и *CDH1* соответственно, и переключает клетки с коллективной на индивидуальную миграцию [129]. Анализ клинических данных РНК-секвенирования (RNA-seq) позволил оценить представленность фенотипов ЭМП в образцах опухолей пациентов с 25 типами рака. Выраженность этих фенотипов варьирует в зависимости от типа опухоли, однако прослеживается общая закономерность: на ранних стадиях доминирует эпителиальный фенотип, а на поздних возрастает доля клеток с гибридным и мезенхимальным фенотипами. Активация гибридной и мезенхимальной программ в опухоли отрицательно коррелирует с выживаемостью

пациентов [130]. Эксперименты на клеточных и животных моделях показывают, что частичный и полный ЭМП играют важную роль на двух стадиях опухолевой прогрессии: инициации и метастазирования.

1.1.4. Участие ЭМП в инициации опухолей

На мышиных моделях показано, что для инициация рака молочной железы, пищевода, поджелудочной железы и кишечника необходима индукция ЭМП [117,131–133]. Потеря гена *BRCA1* стимулирует повреждения ДНК, которые с высокой вероятностью запускают апоптоз в эпителиальных клетках молочной железы человека. Однако активация рецептора NOTCH1 подавляет этот летальный эффект, запуская через киназный каскад ATR/CHK1 восстановление контрольных точек клеточного цикла S/G2 и G2/M. Активирующая мутация *Notch1* значительно усиливает опухолеобразование в молочной железе мышей с нокаутом *Brca1* [132]. Делеция гена-супрессора опухолей *Trp53* сама по себе обладает слабым онкогенным действием, но в сочетании с активацией NOTCH1 она значительно усиливает инициацию опухолей в толстой кишке мышей. Установлено, что NOTCH1 индуцирует ЭМП за счет индукции WNT/β-катенинового пути, стимулируя инвазию опухолевых клеток в стенку кишечника [133]. Одновременная активация онкогена $Kras^{G12D}$ и делеция онкосупрессоров *Trp53, Cdkn2a* и *Cdkn2b* вызывает развитие опухолей поджелудочной железы у мышей. Мезенхимальные клетки, прошедшие ЭМП, обнаруживаются на ранних стадиях развития опухоли и по мере прогрессирования вытесняют эпителиальные клетки. Удаление клеток, подвергающихся ЭМП, с помощью методов генной инженерии подавляет инициацию опухолей, повышая выживаемость экспериментальных животных. Анализ полногеномного секвенирования клеток, выделенных из опухолей, показывает, что ЭМП связан с повышенной геномной нестабильностью, включая полногеномные дупликации и анеуплоидии (увеличение числа хромосом 6 и 11, потерю хромосом 4 и 15) [131]. Таким образом, ЭМП выступает в качестве эффекторного механизма для многих драйверных мутаций, стимулируя выживание и рост опухолевых клеток.

1.1.5. Участие ЭМП в метастазировании

Хотя способность ЭМП усиливать миграцию и инвазию опухолевых клеток была продемонстрирована *in vitro* (см. п. 1.1.1), подтверждение его участия в метастазировании *in vivo* оказалось непростой задачей, подтребовавшей разработки систем отслеживания клеточных линий. Первая такая система была предложена Гао и соавторами: в клетки РМЖ мыши ввели кассету с генами флуоресцентных белков *RFP* и *GFP*, а также вектор, несущий ген рекомбиназы *Cre* под контролем промотора мезенхимального гена *Fsp1* (фибробласт-специфический белок 1). По умолчанию клетки экспрессируют *GFP*, но активация *Fsp1* запускает Cre-опосредованную

рекомбинацию, которая удаляет ген *GFP* из кассеты, и клетки переключаются на экспрессию *RFP*, что изменяет их флуоресценцию. Выявление небольшой популяции RFP-положительных клеток в первичных опухолях при их отсутствии в легочных метастазах позволило предположить, что ЭМП не играет существенной роли в метастазировании [134,135]. Однако более поздние исследования показали, что активация *Fsp1* не позволяет идентифицировать все клетки, прошедшие ЭМП [136]. Люнд и коллеги разработали системы отслеживания клеток РМЖ, прошедших частичный и полный ЭМП, используя в качестве маркеров активность генов *Tnc* (тенасцин С) и *Cdh2* (N-кадгерин) соответственно. Опухолевые клетки чаще проходят частичный, а не полный ЭМП и впоследствии способны возвращаться в исходное эпителиальное состояние. Клетки, прошедшие частичный ЭМП, метастазируют в легкие раньше, чем клетки, прошедшие полный ЭМП, что может быть связано с более эффективным коллективным типом миграции, который они используют (см. п. 1.1.3). Генетические конструкции, уничтожающие клетки РМЖ при активации *Tnc* или *Cdh2*, снижают число метастазов в легких [128,137], что указывает на важную роль частичного и полного ЭМП в процессе метастазирования.

С помощью флуоресцентной системы отслеживания, активируемой повышенной экспрессией гена *Vim*, было показано, что метастазирование клеток РПЖ в легкие, печень и лимфатические узлы мышей почти полностью опосредовано клетками, прошедшими ЭМП [131]. Симеонов и соавторы адаптировали метод GESTALT для отслеживания клеток РПЖ мышей с помощью синтетических нуклеотидных баркодов. Согласно данным scRNA-seq, в ходе опухолевой прогрессии происходит отбор клеток с гибридным фенотипом, которые вносят решающий вклад в рост опухоли и метастазирование в печень, легкие и брюшину [138]. Кроме усиления миграции, ЭМП может способствовать метастазированию, стимулируя образование клеток РПЖ с базалоидным, рабдоидоподобным и стволоподобным фенотипами. Генетическая конструкция, уничтожающая клетки при активации *Vim*, подавляет опухолевую гетерогенность и блокирует метастазирование [131]. Вероятно, увеличение фенотипического разнообразия облегчает адаптацию метастазирующих клеток к микроокружению отдаленных органов, которое отличается от условий в первичной опухоли.

1.1.6. Мезенхимально-эпителиальный переход

Для успешного завершения метастатического каскада и образования вторичных опухолей опухолевые клетки должны пройти МЭП, что связано со снижением их инвазивного потенциала и усилением пролиферативной активности [31]. Этот процесс запускается взаимодействием эндотелиальных клеток с метастатическими клетками при их выходе из кровотока. В частности, эндотелиальный Е-селектин (SELE) связывается с рецептором GLG1 на поверхности опухолевых клеток и активирует их МЭП через WNT/β-катениновый путь. Нокаут *GLG1* значительно

снижает метастазирование в костный мозг в мышиной модели РМЖ [139]. Ключевую роль в регуляции МЭП играет гистоновая метилтрансфераза EZH2, которая подавляет экспрессию мезенхимальных генов путем внесения в их промоторы репрессивной хроматиновой метки H3K27me3. Нокаут *EZH2* подавляет метастазирование в легкие в мышиной модели АЛ [140].

1.1.7. Связь ЭМП с приобретенной лекарственной устойчивостью

За последнее десятилетие таргетная химиотерапия значительно улучшила результаты лечения онкологических заболеваний, однако лекарственная устойчивость (резистентность) остается ключевой проблемой для большинства типов опухолей [141]. Согласно недавним исследованиям, ЭМП ассоциирован не только с усилением инвазивности опухолевых клеток (см. п. 1.1.1), но и с приобретением ими устойчивости к широкому спектру химиопрепаратов. Это объясняется тем, что ЭМП является ключевым механизмом, придающим дифференцированным опухолевым клеткам свойства раковых стволовых клеток (РСК).

РСК – это минорная популяция опухолевых клеток (примерно 0,01 – 2% от массы опухоли), которая, тем не менее, играет значительную роль в развитии устойчивости к химиотерапии благодаря следующим свойствам [6]: (а) экспрессии генов ABC-транспортеров, осуществляющих выведение лекарственных препаратов из клетки [142]; (б) способности к обратимой блокаде клеточного цикла и переходу в спящее состояние, которое слабо восприимчиво к действию цитостатической терапии [142]; (в) повышенной активности альдегиддегидрогеназ (особенно ALDH1A1/A2/A3), которые детоксифицируют альдегиды, образующиеся в результате действия цитотоксических препаратов [143]; и (г) высокой способности к самообновлению и дифференцировке в активно делящиеся опухолевые клетки, что позволяет восстанавливать полностью функциональные опухоли (рецидивы) после окончания терапии [6].

Между ЭМП и приобретением опухолевыми клетками свойств РСК существует двунаправленная связь. С одной стороны, ключевые сигнальные пути ЭМП усиливают стволовые характеристики опухолевых клеток путем повышения уровня мастер-регуляторов плюрипотентности OCT4, NANOG, KLF4 и CD44. С другой стороны, эти же мастер-регуляторы модулируют экспрессию ТФ ЭМП ZEB2 и SNAI2 и активируют сигнальные пути TGF-β, WNT/β-катенин и Hippo/YAP/TAZ, способствуя переходу клеток к мезенхимальному фенотипу. Молекулярные механизмы этого двустороннего взаимодействия, а также его влияние на опухолевую прогрессию будут подробно рассмотрены ниже.

1.1.7.1. Участие сигнальных путей ЭМП в регуляции стволовых характеристик

Регулом ЭМП играет важную роль в приобретении опухолевыми клетками стволовых свойств. В частности, составляющие его ядро ТФ ZEB1/2 и TWIST1/2 демонстрируют более высокий уровень в стволовых клетках по сравнению с их дифференцированными аналогами. Нокдаун генов *ZEB1/2* приводит к снижению представленности РСК как в популяции клеток РМЖ, культивируемых *in vitro*, так и в ксенографтах, выращенных в молочных железах мышей [37]. Показано, что TWIST1 напрямую активирует транскрипцию генов *NANOG*, *CD44* и *SOX2*, кодирующих соответствующие факторы плюрипотентности. Гиперэкспрессия *TWIST1* вызывает увеличение доли РСК в популяции клеток ПРП *in vitro* [144]. Участие в усилении стволовых характеристик было также показано для основных сигнальных путей ЭМП (см. п. 1.1.2).

РСК поддерживают свое недифференцированное состояние за счет повышения уровня TWIST1 через активацию сигнального пути TGF-β/SMAD2. TGF-β1 или гиперэкспрессия *TWIST1* усиливают экспрессию генов *OCT4*, *NANOG* и *SOX2* в клетках колоректального рака (КР), что повышает их способность к самообновлению и образованию опухолей *in vitro* и *in vivo*: при высевании клеток на планшеты с низкой адгезией повышается число формируемых ими опухолевых сфероидов; при подкожном введении клеток мышам повышается вероятность образования ими ксенографтов [145]. Ассоциированный с рецептором TGF-β белок 1 (TGFBRAP1) поддерживает усиление стволовых свойств РСК под действием TGF-β1, повышая их устойчивость к мультикиназному ингибитору регорафенибу. В частности, TGFBRAP1 связывается с TβRI, что ингибирует убиквитинирование рецептора E3-лигазами SMURF1/2 и предотвращает его протеасомную деградацию. В результате TβRI фосфорилирует белки SMAD2/3, которые затем активируют гены, ассоциированные с ЭМП, а также *TGFBRAP1*, что приводит к формированию положительной обратной связи. Гиперэкспрессия *TGFBRAP1* повышает вероятность образования подкожных ксенографтов клетками гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) у мышей, а также усиливает рост сформировавшихся опухолей и снижает их чувствительность к регорафенибу [146].

WNT/β-катениновый путь оказывает стимулирующее влияние на стволовые характеристики опухолевых клеток за счет повышения уровня ТФ SOX2, играющего ключевую роль в поддержании недифференцированного состояния клеток [49,147]. Показано, что FZD7, рецептор WNT, и активируемый им сигнальный каскад DVL3/β-катенин (см. п. 1.1.2) усиливают стволовые характеристики опухолевых клеток, обуславливая их способность к формированию сфероидов, увеличение доли РСК в клеточной популяции и экспрессию генов-маркеров плюрипотентности [147,148]. Сходные фенотипические изменения запускает трансмембранный белок 1 семейства 4 L6 (TM4SF1), который индуцирует ядерную транслокацию β-катенина [49]. Оба пути, DVL3/β-

катенин и TM4SF1/β-катенин, повышают уровень MYC, который, в свою очередь, напрямую активирует транскрипцию гена *SOX2* [49,147]. Приобретение клетками КР стволовых характеристик под влиянием WNT/β-катенинового пути повышает их устойчивость к цитотоксическому действию винкристина, оксалиплатина и 5-FU [49,147]. Значимость пути WNT/β-катенин для опухолевой прогрессии была подтверждена на мышиных моделях: нокдаун генов *DVL3* или *TM4SF* подавляет рост клеток КР в виде подкожных ксенографтов, а также их метастазирование в легкие при внутривенном введении [147].

Гипоксическое микроокружение стимулирует переход опухолевых клеток в стволоподобное состояние. Показано, что инкубация клеток ГЦК в условиях гипоксии *in vitro* повышает уровень актин-связывающего белка FSCN1 через путь AKT/RAC1, но независимо от HIF-1α. Как следствие, усиливаются функциональные характеристики, ассоциированные со стволовостью, включая способность к образованию сфероидов, экспрессию генов-маркеров плюрипотентности и устойчивость к сорафенибу. Механистически, FSCN1 индуцирует перестройку актинового цитоскелета, которая негативно влияет на активацию пути Hippo (фосфорилирование LATS1 и YAP), что приводит к ядерной транслокации YAP [108]. Вклад YAP в формирование стволоподобного фенотипа независимо подтвержден на модели РМЖ: снижение уровня YAP в результате нокдауна гена его положительного регулятора *PAR1* уменьшает представленность РСК в популяции опухолевых клеток и, как следствие, подавляет их способность к образованию сфероидов [149]. Кроме того, активация YAP вносит существенный вклад в опухолевую прогрессию: ее подавление под влиянием нокдауна *FSCN1* и *PAR1* снижает рост опухолей и метастазирование в мышиных моделях [108,149].

Активный сигнальный путь NOTCH1 поддерживает недифференцированное состояние РСК. Лиганды DLL1 и JAG1 связываются с рецептором NOTCH1, индуцируя отщепление его внутриклеточного домена N1ICD, который затем перемещается в ядро и формирует комплекс с MAML1 и CSL для осуществления транскрипционной регуляции. N1ICD повышает уровень белков-регуляторов плюрипотентности и, как следствие, усиливает самообновление РСК различного гистогенеза [110,111,117,150]. В частности, он увеличивает уровень SOX2 посредством активации RAC1 [112]. Гиперэкспрессия *DLL1* ускоряет рост ортотопических ксенографтов РМЖ, увеличивая в них представленность РСК [150]. Аналогичный эффект показан для эктопической экспрессии *N1ICD* на модели подкожных ксенографтов ПРП [117]. Действие NOTCH1 по усилению стволовых характеристик дополнительно модулируется рядом белков, среди которых FAS, RFC4 и RAB4A выступают в роли индукторов [110–112], тогда как CDK8, NUMB и KRT19 – в роли ингибиторов этого процесса [111,112,151].

1.1.7.2. Влияние мастер-регуляторов РСК на ЭМП

Показано, что ряд характерных для стволовых клеток регуляторных белков оказывает стимулирующее воздействие на ЭМП опухолевых клеток. В частности, KLF4 и OCT4/NANOG индуцируют ЭМП через активацию сигнальных путей TGF-β1/SMAD2/3 [152] и WNT/β-катенин [153] соответственно. Гиперэкспрессия *OCT4* и *NANOG* вызывает фосфорилирование GSK3β и последующее повышение уровня β-катенина, что приводит к приобретению клетками НМРЛ мезенхимального фенотипа и увеличению их инвазивного потенциала. Она также повышает устойчивость клеток к гефитинибу, цисплатину, гемцитабину и салиномицину путем повышения уровня ABC-транспортера ABCG2. Коэкспрессия *OCT4* и *NANOG* в клетках НМРЛ при подкожном введении мышам приводит к формированию опухолей большего размера по сравнению с контролем [153]. Маркер стволовых клеток CD44 усиливает инвазию и миграцию, а также модулирует экспрессию маркеров ЭМП в клетках НМРЛ за счет активации классического пути Hippo (MST1/2/YAP/TEAD). Комплекс YAP/TEAD посредством транскрипционной регуляции повышает уровень ТФ SP1, который активирует транскрипцию гена *EHD1*. В свою очередь, кодируемый им белок EHD1, связываясь с CD44, предотвращает его лизосомальную деградацию, создавая контур положительной обратной связи. Гиперэкспрессия гена *EHD1* усиливает метастазирование клеток НМРЛ в легкие мышей при их внутривенном введении, однако введение в *EHD1* мутации, нарушающей связывание с CD44, почти полностью блокирует данный эффект [154]. Интересно, что фермент ALDH1A3 (активность которого служит маркером РСК) оказывает различное влияние на ЭМП в зависимости от типа рака. При РМЖ низкий уровень ALDH1A3 индуцирует ЭМП через переключение метаболизма РСК с окислительного фосфорилирования на гликолиз. Соответственно, нокдаун *ALDH1A3* стимулирует рост ортотопических ксенографтов РМЖ у мышей [155]. Наоборот, при КР высокий уровень ALDH1A3 стимулирует ЭМП через ингибирование miR-200 и усиление трансляции ее мишеней, ZEB1 и SNAI2. В условиях *in vivo* гиперэкспрессия *ALDH1A3* усиливает метастазирование ортотопических ксенографтов КР в печень и легкие [156].

1.1.8. Подобные ЭМП процессы в опухолях нейроэктодермального происхождения

Недавние исследования показали, что переход к мезенхимальному фенотипу возможен не только в эпителиальных, но и в неэпителиальных опухолях, таких как глиобластома (ГБ) и нейробластома (НБ). По функциональным последствиям этот процесс аналогичен ЭМП: опухолевые клетки приобретают вытянутую морфологию, увеличивают свой миграционный и инвазивный потенциал, а также стволовые свойства и становятся более устойчивыми к химиотерапии. Однако молекулярные изменения в этом процессе отличаются от классического ЭМП, поскольку клетки ГБ и НБ изначально не являются эпителиальными и относятся к

нейроэктодермальной ветви дифференцировки. В данном разделе рассматриваются особенности ЭМП-подобных процессов в неэпителиальных опухолях и их роль в опухолевой прогрессии.

1.1.8.1. Глиобластома

ГБ – самая распространенная первичная опухоль головного мозга с заболеваемостью 0,59 – 5 случаев на 100000 человек. С 2005 года схема лечения ГБ включает хирургическое удаление опухоли, комбинированную лучевую и химиотерапию с использованием ДНК-алкилирующего агента темозоломида (TMZ) и адъювантную терапию TMZ [157]. Несмотря на внедрение в клиническую практику дополнительных терапевтических вариантов, включая алкилирующие агенты на основе нитрозомочевины, антиангиогенное антитело бевацизумаб и поля переменного электрического тока, ответ ГБ на лечение остается крайне низким [158]. Медианная выживаемость пациентов с ГБ составляет около 15 месяцев, и только 4% пациентов выживают в течение пяти лет после постановки диагноза из-за высокой частоты рецидивирования [157,159]. Хотя ГБ редко метастазирует в отдаленные органы, она активно инвазирует ткани головного мозга, что значительно осложняет ее хирургическое удаление [5]. Развитие устойчивости ГБ к TMZ также способствует высокому уровню смертности пациентов. TMZ оказывает цитотоксическое действие за счет метилирования гуанинов ДНК по положению O^6 (O^6-MeG) и стимулирования продукции активных форм кислорода (АФК), которые вместе вызывают апоптоз клеток ГБ [160,161]. Соответственно, резистентность клеток ГБ опосредуется: (а) повышением уровня О-6-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT), которая удаляет метильные группы с O^6-MeG [162], и (б) увеличением сопряжения митохондриальной цепи переноса электронов с окислительным форсфорилированием, снижающим продукцию АФК, а также повышением уровней глутатиона (GSH) и супероксиддисмутазы 2 (SOD2), нейтрализующих уже образовавшиеся АФК [163,164]. Высокой устойчивостью к действию TMZ обладают глиобластомные стволовые клетки (ГСК) благодаря: (а) высокой активности систем ответа на повреждение ДНК и репликативный стресс, (б) высокой экспрессии генов ABC-транспортеров и (в) способности обратимо останавливать клеточный цикл и переходить в дормантное (спящее) состояние. После завершения терапии ГСК могут выйти из состояния покоя и дать начало дифференцированным опухолевым клеткам, что приводит к рецидиву ГБ [165].

Транскриптомный анализ установил три фенотипа клеток ГБ: классический, пронейральный и мезенхимальный [166,167]. Пронейральные клетки имеют более компактные размеры, короткие актиновые стресс-фибриллы, небольшое количество мембранных выростов (ламеллоподий) и экспрессируют маркерные гены *OLIG2*, *SOX2*, *PDGFRA*, *DLL3* и *CD24*. В отличие от них, мезенхимальные клетки имеют большие размеры за счет распластывания по подложке (спредингу) и образования ламеллоподий, обладают удлиненной

фибробластоподобной морфологией, длинными стресс-фибриллами, пронизывающими тело клетки, и характеризуются иным набором маркерных генов, включающим *CD44, MET, CDH2, VIM, FN1* и *COL5A1* [168–172]. Мезенхимальные клетки по сравнению с пронейральными формируют иммунологически активное микроокружение, стимулируя инфильтрацию опухоли макрофагами, микроглией, нейтрофилами и Т-клетками и индуцируя собственное уничтожение за счет активации Т-клеток [166,168,173]. При этом, данные клетки обладают повышенной миграционной и инвазивной активностью *in vitro* и инфильтрируют в мозг мышей при выращивании в виде ортотопических ксенографтов *in vivo* [168,174].

Ростовые факторы, повышение жесткости ВКМ, гипоксия и воспалительные медиаторы индуцируют пронейрально-мезенхимальный переход (ПМП) клеток ГБ: их вытягивание, усиление миграции и инвазии, активацию и подавление мезенхимальных и пронейральных генов соответственно [174–178]. Главную роль в регуляции ПМП играют кластер ТФ, регулируемый STAT3 и C/EBPβ, и транскрипционный коактиватор TAZ [179,180]. Мастер-регуляторные ТФ STAT3 и C/EBP увеличивают экспрессию генов, кодирующих ТФ BHLHE40, RUNX1 и FOSL2, расположенные ниже по регуляторной иерархии, и вместе с ними активируют транскрипцию мезенхимальных генов [180]. TAZ в комплексе с ТФ TEAD2/4 также запускает экспрессию мезенхимальных генов, но его мишени почти не пересекаются с регуломом STAT3 и C/EBPβ [179]. Индукция ПМП поддерживается классическими ТФ ЭМП SNAI1/2, ZEB1 и TWIST1 [181–184]. Были также идентифицированы гибридные клетки ГБ, экспрессирующие как пронейрональные, так и мезенхимальные гены. Их количество в опухоли увеличивается под влиянием гамма-излучения или TMZ и связано с развитием резистентности к обоим видам терапии. Гибридные клетки демонстрируют более высокий уровень синтетических процессов, включая транскрипцию и транспорт белков из цитоплазмы в ядро, а также повышенную активацию сигнальных путей репарации ДНК. Ядерно-цитоплазматический транспорт стабилизирует гибридный фенотип за счет повышения уровня ТФ MYC и эпигенетической регуляции его целевых генов, включая увеличение и уменьшение хроматиновых меток H3K4me3 и H3K27me3 в промоторах. Подавление этого процесса путем нокдауна *KPNA2*, кодирующего ключевой адаптерный белок ядерного импорта, подавляет гибридный фенотип и возвращает чувствительность клеток ГБ к терапии. Мыши с ортотопическими ксенографтами ГБ, нокаутными по *KPNA2*, демонстрируют более длительную выживаемость и лучший ответ на радиотерапию и лечение TMZ [185]. Индукция ПМП в ГСК, кроме усиления их инвазивной активности, стимулирует стволовые характеристики: способность к образованию сфероидов, уровни белков-маркеров стволовости NESTIN, CD133 и OCT4, экспрессию генов ABC-

транспортеров, устойчивость к цитотоксическому эффекту TMZ и радиотерапии, а также способность инициировать опухоли в мозге мышей [186–188].

1.1.8.2. Нейробластома

НБ – это опухоль симпатической нервной системы детей (средний возраст постановки диагноза 2 года). Наиболее частой локализацией НБ являются брюшная полость и мозговое вещество надпочечников. Выбор стратегии лечения при НБ основан на уровне риска, определяемом с помощью анатомической визуализации, гистологии и биохимических анализов: при низком уровне риска высока вероятность спонтанной регрессии опухоли, поэтому терапия ограничивается наблюдением или минимальным хирургическим вмешательством (пятилетняя выживаемость 97,9%); при высоком уровне риска часто происходит метастазирование в отдаленные органы, поэтому применяется более интенсивная терапия, включающая мультимодальную химиотерапию (цисплатин, винкристин, карбоплатин, этопозид и циклофосфамид), хирургическую резекцию, трансплантацию стволовых клеток и местную лучевую терапию. Оптимизация методов лечения позволила увеличить пятилетнюю выживаемость пациентов в группе высокого риска до 62,5% по сравнению с <20% в 1980-х годах [189].

Выделяют два фенотипа клеток НБ – норадренергический и мезенхимальный. Норадренергические клетки слабоподвижны, формируют полуприкрепленные сферы и их характерными маркерами является экспрессия *PHOX2A, PHOX2B* и *DBH*, в то время как мезенхимальные клетки активно мигрируют, адгезивны и экспрессируют *CD133, CD44, SNAI2, VIM* и *FN1* [190]. Норадренергические клетки обладают большей опухолеобразующей активностью при подкожном введении мышам [190]. Однако мезенхимальные клетки более устойчивы к цитотокическому действию цисплатина, доксорубицина (DOX) и этопозида [10,190,191], а также играют ключевую роль в метастазировании НБ [192]. При рецидивировании часто отмечается сдвиг опухолей в сторону мезенхимального фенотипа [190,193], что указывает на прохождение клетками НБ норадренергическо-мезенхимального перехода (НМП). Обнаружение гибридных клеток, сочетающих норадренергические и мезенхимальные маркеры [10,191], указывает на непрерывный характер данного процесса, по аналогии с частичными ЭМП и ПМП (см. 1.1.3, 1.1.8.1).

Ростовые факторы EGF и TNF-α и активирующая мутация $HRAS^{V12}$ индуцируют НМП [10,193], что связано со значительной перестройкой эпигенетического ландшафта: в норадренергических клетках ТФ PHOX2B, HAND2 и GATA2/3, а в мезенхимальных клетках ТФ AP-1, RARB, RUNX1 и PRRX1 активируют кардинально различающиеся комбинации супер-энхансеров [190,191,193]. PHOX2B играет важную роль в поддержании пролиферативного

потенциала [191], в то время как PRRX1 стимулирует миграционную способность и экспрессию мезенхимальных генов [190]. Рецепторы NOTCH1–3 играют роль переключателя эпигенетических профилей посредством повышения и снижения экспрессии генов ТФ, регулирующих мезенхимальный и норадренергический фенотип соответственно. Даже временная активация этих рецепторов приводит к долгосрочной индукции НМП, поскольку каждый из них активирует как собственный, так и паралогичные гены *NOTCH*, а также гены *JAG1* и *MAML2*, относящиеся к сигнальному пути NOTCH [194] (см. п. 1.1.2). Гаплонедостаточность гена *ARID1A*, кодирующего субъединицу комплекса ремоделирования хроматина BAF, выявляется примерно в 30% первичных НБ высокого риска. При моделировании данной мутации *in vitro* наблюдается изменение локусов прикрепления BAF, в результате чего активируется иной набор энхансеров. Эпигенетические изменения, вызванные мутацией *ARID1A* (в частности, активация *PHOX2B* и выключение *FN1*) запускают НМП, что приводит к снижению уровня белка PHOX2B и увеличению VIM, FN1 и SNAI2, а также приобретению клетками НБ устойчивости к цисплатину [195]. Повышение уровня polo-подобной киназы 4 (PLK4) в опухолях пациентов с НБ отмечается на поздних стадиях и при рецидивировании. Эксперименты на клеточных моделях показывают, что PLK4 индуцирует НМП клеток НБ за счет активации AKT. В мышиной ксенографтной модели НБ нокдаун *PLK4* замедляет рост опухолей, снижая в них уровни VIM и CDH2 и повышая CDH1, а также подавляет их метастазирование в печень [192].

1.2. Подавление ЭМП как стратегия терапии онкологических заболеваний

ЭМП играет важную роль на разных этапах онкогенеза: инициации злокачественных новообразований, их прогрессировании до метастатической стадии, а также в формировании лекарственной устойчивости (см. п. 1.1.4 – 1.1.7). Поэтому разработка терапевтических стратегий, направленных на подавление ЭМП опухолевых клеток, является актуальной задачей. В частности, для создания низкомолекулярных ингибиторов ЭМП применяются три подхода: (1) мишень-ориентированный, (2) фенотип-ориентированный и (3) перепрофилирование лекарств. В заключительной главе обзора рассматриваются теоретические основы этих стратегий, успешные примеры их реализации и перспективы дальнейшего развития.

1.2.1. Разработка ингибиторов ЭМП с использованием мишень-ориентированного подхода

Мишень-ориентированный подход основывается на предположении, что подавление одного ключевого регуляторного белка способно блокировать процесс ЭМП в опухолевых клетках. В доклинических исследованиях ингибирование ключевых сигнальных путей, регулирующих ЭМП (TGF-β, WNT/β-катенин, Hippo/YAP/TAZ и NOTCH), с помощью низкомолекулярных соединений существенно снижает агрессивность опухолевых клеток. Часть таких ингибиторов

уже продвинулась до клинических испытаний, однако их способность замедлять прогрессирование злокачественных опухолей у пациентов пока остается ограниченной (см. далее п. 1.2.1.1). Следовательно, актуальной задачей является разработка и тестирование альтернативных стратегий для эффективного подавления ЭМП. Помимо сигнальных каскадов, важную роль в запуске ЭМП играют внеклеточные протеазы, особенно семейства ММР и ADAMTS (см. далее п. 1.2.1.2, 1.2.1.3). Еще одним важным фактором является жировая ткань, которая выделяет специфические гормоны, называемые адипокинами. Установлено, что один из таких белков, лептин, индуцирует ЭМП при нескольких типах рака (см. далее п. 1.2.1.4). В данном разделе рассматриваются низкомолекулярные ингибиторы, направленные как против классических сигнальных путей ЭМП, так и против неклассических регуляторов – протеаз семейств MMP/ADAMTS и лептина. Обсуждается эффективность ингибиторов ЭМП на клеточных и животных моделях онкологических заболеваний, а также их внедрение в клиническую практику.

1.2.1.1. Сигнальные пути ЭМП как терапевтические мишени

Сигнальные пути TGF-β, WNT/β-катенин, Hippo/YAP/TAZ и NOTCH запускают ЭМП опухолевых клеткок *in vitro*, повышая их инвазивный потенциал и стволовые характеристики (см. п. 1.1.2, 1.1.7), а также стимулируют опухолевый рост и метастазирование *in vivo* [55,97,111,113,149,196]. Низкомолекулярные ингибиторы данных путей показывают высокий терапевтический потенциал в доклинических исследованиях, а некоторые из них достигли стадии клинических испытаний.

В контексте сигнального пути TGF-β исследования были направлены на ингибирование активации TGF-β и киназной активности его рецептора TβRI (Рис. 2). В дополнение к описанному выше MMP2/9-опосредованному расщеплению LAP (см. п. 1.1.1), TGF-β может активироваться интегринами, которые взаимодействуют с LAP и вызывают изменение его конформации [74]. Циленгитид (ингибитор интегринов αvβ3 и αvβ5) подавляет TGF-β1-индуцированный ЭМП в клетках НМРЛ с устойчивостью к ингибиторам рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), наквотинибу и осимертинибу [19]. Кроме того, он снижает миграцию, инвазию и экспрессию мезенхимальных генов в клетках ГБ с устойчивостью к TMZ [197]. Однако циленгитид не улучшал выживаемость пациентов с раком головы и шеи и глиобластомой в клинических испытаниях II/III фазы [198]. После активации TGF-β связывается с рецепторным комплексом TβRI/II, после чего TβRI фосфорилирует SMAD2/3. Галунисертиб, BIX02189, SB525334 и AZ12601011 присоединяются к TβRI и ингибируют его киназную активность [199,200]. Галунисертиб и BIX02189 снижают метастатический потенциал клеток РПЖ и НМРЛ соответственно за счет подавления TGF-β1-индуцированного ЭМП [199,200]. В свою очередь,

SB525334 и AZ12601011 снижают стволовые свойства опухолевых клеток, блокируя их способность к самообновлению и образованию сфероидов [146,152]. Ингибиторы TβRI демонстрируют высокий противоопухолевый эффект в мышиных моделях онкологических заболеваний: галунисертиб замедляет рост подкожных ксенографтов РМЖ, АЛ и ГБ [200]; BIX02189 уменьшает метастазирование АЛ в легкие [199]; SB525334 ингибирует инициацию опухолей клетками КР [152]; SB525334 и AZ12601011 замедляют рост подкожных ксенографтов ГЦК как в монотерапии, так в комбинации с регорафенибом [146]. На основании этих и других данных галусинертиб был выведен в клиническую разработку (фаза II): препарат улучшал выживаемость пациентов с ГЦК, тогда как при ГБ его активность была низкой [201,202].

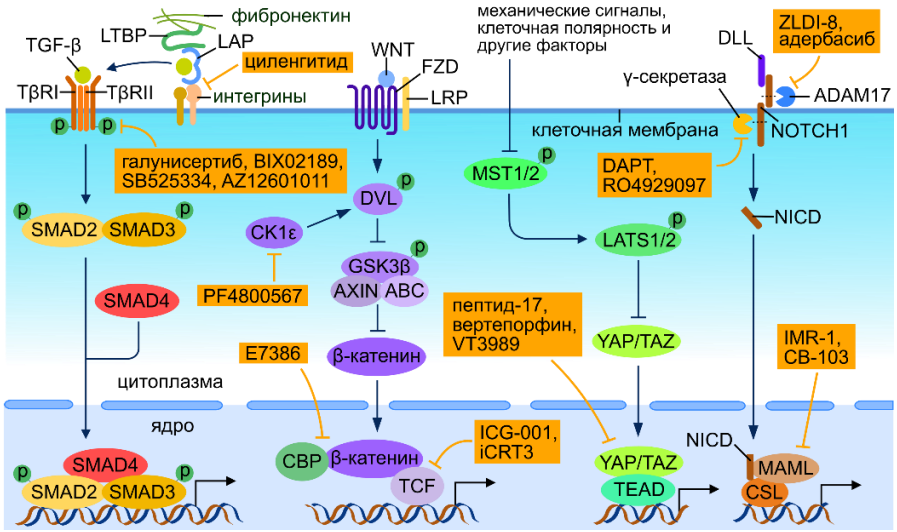

Рисунок 2. Ингибиторы сигнальных путей ЭМП. На схеме показаны ключевые сигнальные события, запускающие ЭМП опухолевых клеток, и низкомолекулярные соединения, которые их подавляют (выделены оранжевыми прямоугольниками).

Стратегии ингибирования WNT/β-катенинового пути нацелены на два ключевых этапа: CK1ε-опосредованное фосфорилирование DVL2, необходимое для дальнейшей активации β-катенина, и взаимодействие β-катенина с TCF и CBP, критическое для его транскрипционной активности (Рис. 2). PF4800567 (ингибитор CK1ε) снижает метастатический потенциал клеток КР *in vitro* и *in vivo* [203]. Доклинические испытания на моделях РМЖ показывают, что ICG-001 и iCRT3 (ингибиторы β-катенина/TCF) уменьшают стволовые свойства и инвазивный потенциал опухолевых клеток *in vitro* [18,204], а iCRT3 также подавляет рост опухолей и их метастазирование в лимфатические узлы *in vivo* [18]. В мышиных моделях E7386 (ингибитор β-катенина/CBP) блокирует развитие опухолей полости рта за счет ингибирования частичного ЭМП [205] и синергически подавляет рост ГЦК в комбинации с ленватинибом [206]. В фазе I клинических испытаний E7386 продемонстрировал благоприятный профиль безопасности у

пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта [207]; в настоящее время оценивается эффективность комбинации E7386 и ленватиниба в испытаниях фазы I/II при раке эндометрия [206].

Для подавления сигнального пути Hippo используют ингибиторы, нарушающие взаимодействие YAP и TEAD, включая пептид-17, вертепорфин и VT3989 (Рис. 2). Ингибируя ЭМП, пептид-17 и вертепорфин подавляют инвазивный потенциал опухолевых клеток [154,208,209], а вертепорфин также снижает их стволовые характеристики [154]. В мышиных моделях пептид-17 замедляет рост подкожных ксенографтов КР, а вертепорфин – метастазирование АЛ и КР в легкие [154,208,209]. Кроме того, вертепорфин может проникать через ГЭБ, что делает его перспективным кандидатом для терапии опухолей головного мозга. В частности, в ортотопической модели ГБ вертепорфин подавляет рост и инвазию опухолей в мозг мышей. Добавление вертепорфина в режим, включающий химиотерапию TMZ и радиотерапию, значительно повышает выживаемость мышей-опухоленосителей, что коррелирует с увеличением метилирования промотора *MGMT*, свидетельствующим о восстановлении чувствительности ГБ к TMZ [210]. Для взаимодействия с YAP/TAZ белки TEAD должны пройти аутопальмитоилирование – этот процесс ингибируется VT3989. На основании высокой эффективности, выявленной в доклинических исследованиях, VT3989 был переведен в клинические испытания для лечения мезотелиомы (фаза I/II), где была продемонстрирована безопасность соединения и объективный ответ опухоли на лечение [211].

Подавление пути NOTCH достигается путем воздействия на два ключевых этапа: расщепление NOTCH до NICD, катализируемое γ-секретазой и ADAM17, и взаимодействие NICD с CSL и MAML, необходимое для его транскрипционной активности (Рис. 2). DAPT и RO4929097 (ингибиторы γ-секретазы) подавляют NOTCH1-опосредованный ЭМП опухолевых клеток, снижая их инвазивность и стволовые характеристики [111,151,212]. В ксенографтных моделях DAPT замедляет рост рака головы и шеи, а RO4929097 – рака поджелудочной железы; кроме того, DAPT усиливает эффект доцетаксела, цисплатина или 5-FU при использовании в комбинированной терапии [212,213]. К сожалению, RO4929097 показал низкую эффективность в подавлении роста солидных опухолей в клинических испытаниях (фаза II) [214]. ZLDI-8 и адербасиб (ингибиторы ADAM17) проходили доклинические исследования на моделях КР. ZLDI-8 подавляет ЭМП, повышая чувствительность опухолевых клеток к иринотекану и 5-FU [20]. После прохождения ЭМП клетки КР секретируют экзосомы, которые индуцируют разрушение связей между эндотелиальными клетками. Адербасиб блокирует этот эффект, восстанавливая целостность эндотелиального барьера и затрудняя проникновение метастатических клеток через него [215]. В мышиных моделях ZLDI-8 подавляет рост

подкожных ксенографтов [20], а адербасиб – метастазирование в легкие и печень [215]. В ходе II фазы клинических испытаний адербасиб вызывал тромбоз глубоких вен у некоторых пациентов с метастатическим РМЖ, что указывает на проблемы с безопасностью и токсичностью [214]. IMR-1 и CB-103 (ингибиторы комплекса NICD) снижают инвазивный потенциал опухолевых клеток [118,216]. В частности, сигнальный путь RHBDL2/NOTCH1 стимулирует экспрессию ТФ ЭМП SNAIL1, TWIST1 и ZEB1 в клетках РПЖ, но этот эффект блокируется IMR-1 [118]. В условиях *in vivo* IMR-1 и CB-103 замедляют рост подкожных ксенографтов аденокарциномы пищевода и РМЖ в монотерапии [217,218], а CB-301 также демонстрирует высокую эффективность в комбинациях с фульвестрантом и паклитакселом [217]. В испытаниях I фазы CB-103 показал приемлемый профиль безопасности, но ограниченную противоопухолевую активность у пациентов с солидными и гематологическими злокачественными новообразованиями [214].

Таким образом, стратегия селективного ингибирования ключевых сигнальных путей ЭМП обладает значительным терапевтическим потенциалом в доклинических исследованиях. Однако при переходе к клиническим испытаниям большинство подобных соединений не демонстрируют ожидаемой эффективности. Это может быть связано с тем, что ингибиторы ЭМП воздействуют не на пролиферацию или выживаемость опухолевых клеток, а на их метастатический потенциал и лекарственную устойчивость. Следовательно, изменения в росте первичной опухоли, используемые для оценки действия терапии в большинстве клинических испытаний, могут не отражать истинную эффективность ингибиторов ЭМП. Более информативными показателями могли бы стать анализ микрометастазов и выживаемости без рецидивирования [8]. Важно отметить, что эффекты модуляции ЭМП могут отличаться в зависимости от стадии заболевания. В определенных ситуациях терапия может привести к нежелательному результату: например, спровоцировать МЭП в уже диссеминированных клетках, что, напротив, будет способствовать их колонизации и росту метастазов [8]. Будущие трансляционные исследования должны не только оптимизировать критерии эффективности анти-ЭМП терапии, но и включить оценку статуса ЭМП в опухолевой ткани в алгоритм отбора пациентов для данного типа лечения.

1.2.1.2. Протеазы MMP2/9 как перспективные мишени анти-ЭМП терапии

ВКМ обеспечивает структурную поддержку тканей и служит источником динамических сигналов, регулирующих поведение клеток. Внеклеточные протеазы расщепляют компоненты ВКМ, приводя к его размягчению. Кроме того, они высвобождают связанные с матриксом ростовые факторы, позволяя им выполнять свои сигнальные функции. Нарушение регуляции этой сложной протеолитической сети способствует развитию многих заболеваний, в том числе

онкологических [219]. Понимание механизмов работы внеклеточных протеаз необходимо для терапевтического воздействия на патологические процессы, которые они контролируют.

Показано, что матриксные металлопротеазы MMP2 и MMP9 играют важную роль в метастазировании опухолей различного гистогенеза. В частности, экспрессия генов *MMP2/9* усиливается в опухолевых клетках при их ЭМП. Секретированные MMP2/9 расщепляют коллагены, ламинин, фибронектин и другие белки ВКМ, значительно облегчая инвазию опухолевых клеток в окружающие ткани. Однако этим роль MMP2/9 не ограничивается: они также освобождают TGF-β1 из связанной с ВКМ формы, расщепляя LAP (Рис. 3). Активированный TGF-β1 запускает ЭМП опухолевых клеток через путь SMAD2/3 (включая синтез MMP2/9), замыкая петлю положительной обратной связи (см. п. 1.1.1).

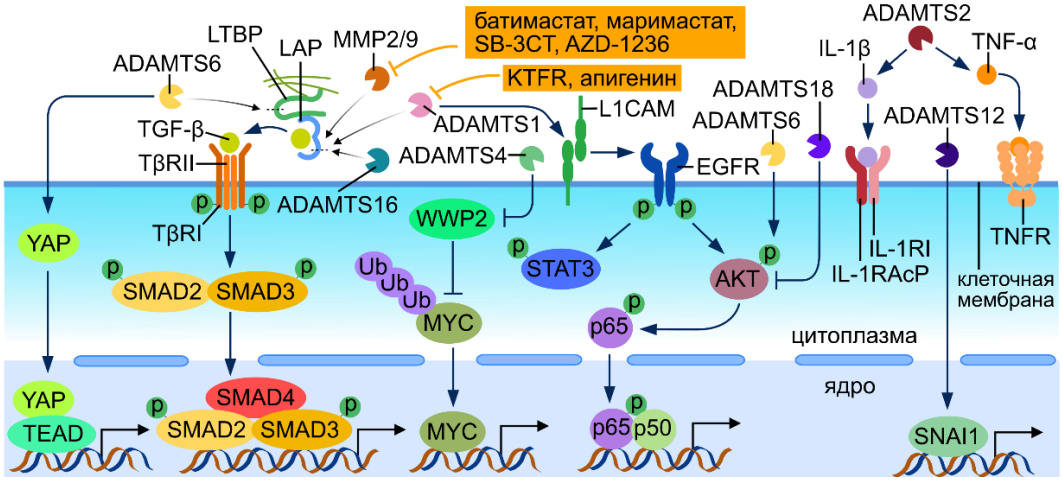

Рисунок 3. Регуляция ЭМП внеклеточными протеазами. Схематически показано, как протеазы MMP и ADAMTS влияют на активность сигнальных путей, индуцирующих ЭМП, а также ингибирование этих протеаз низкомолекулярными соединениями (выделены оранжевыми прямоугольниками).

Разработка ингибиторов семейства MMP началась в 1990-х годах. Ингибиторы первого поколения отличались низкой специфичностью: они блокировали множество MMP за счет хелатирования общего каталитического иона цинка [220]. В частности, батимастат (ингибитор MMP1/2/7/9) и маримастат (ингибитор MMP1/2/3/7/9/12/13), содержащие цинк-связывающую гидроксиматную группу, подавляют ЭМП *in vitro* и метастазирование *in vivo*. Батимастат стимулирует переход клеток ПРП в более эпителиальное состояние и блокирует переход клеток РМЖ в мезенхимальное состояние под влиянием TGF-β1, подавляя миграционный потенциал клеток и экспрессию мезенхимальных генов на уровне белка [221–223]. Кроме того, батимастат подавляет стимулирующее влияние TGF-β1 на рост подкожных ксенографтов и их метастатазирование в легкие в мышиной модели РМЖ [222]. Маримастат ингибирует ЭМП

клеток КР, индуцированный липополисахаридом клеточной стенки бактерий (LPS), *in vitro* [224], а также подавляет рост ксенографтов РМЖ и их метастазирование в легкие *in vivo* [225]. Из-за низкой пероральной биодоступности батимастат не получил клинического применения. Маримастат, напротив, прошел III фазу клинических испытаний в качестве препарата для лечения РМЖ, но не показал терапевтического эффекта из-за возникновения у пациентов побочных эффектов, включая скелетно-мышечную токсичность [220]. Ребимастат, ингибитор ММР широкого спектра действия второго поколения, продемонстрировал аналогичную системную токсичность в испытаниях II фазы при РМЖ [220]. Таким образом, подавление ММР с помощью низкоселективных ингибиторов, содержащих хелатирующие цинк группы, является малоэффективной стратегией лечения онкологических заболеваний. Следовательно, дальнейшие усилия должны быть направлены на создание селективных ингибиторов протеаз, вовлеченных в регуляцию ЭМП. Исследования в этой области можно разделить на два направления: (1) разработка селективных ингибиторов ММР2/9, поскольку роль этих протеаз в ЭМП и метастатическом каскаде хорошо изучена; (2) установление роли других протеаз в ЭМП для их последующего использования как мишеней таргетной терапии.

Селективные ингибиторы ММР2/9, в отличие от неселективных, демонстрируют сопоставимый ингибирующий эффект в отношении ЭМП, но имеют лучший профиль безопасности благодаря снижению неспецифической токсичности. В частности, SB-3CT селективно подавляет ММР2/9 за счет образования ковалентной связи с консервативным остатком Glu202. На клеточный моделях показано, что экстракт сигаретного дыма усиливает синтез ММР2/9 в клетках НМРЛ, что запускает ЭМП через активацию сигнальной оси EGFR/AKT/GSK3β/β-катенин. SB-3CT блокирует эти сигнальные события и останавливает ЭМП, что подтверждается снижением миграционной и инвазивной активности клеток, уменьшением уровней белков CDH2 и VIM и повышением CDH1 [226]. Способность SB-3CT подавлять ЭМП подтверждена на мышиных моделях: соединение замедляет рост опухолей карциномы легких Льюис (LLC) и меланомы B16, снижая в них экспрессию мезенхимальных генов, и улучшает выживаемость мышей-опухоленосителей. Кроме того, SB-3CT подавляет метастазирование внутривенно введенных клеток B16 в легкие мышей [227]. Селективные ингибиторы ММР2/9 характеризуются приемлемым профилем безопасности. В частности, введение SB-3CT не вызывает значительного изменения массы тела экспериментальных животных [227]. AZD-1236 (пероральный ингибитор ММР9 и ММР12) был протестирован в клинических испытаниях II фазы для лечения хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), где для него не было показано значительных побочных эффектов [220]. Эти данные указывают на перспективность

дальнейшей разработки ингибиторов MMP2/9 в качестве анти-ЭМП препаратов и их тестирования в клинических условиях для лечения опухолевых заболеваний.

1.2.1.3. Протеазы семейства ADAMTS как перспективные мишени анти-ЭМП терапии

Наряду с разработкой стратегий подавления MMP2/9, активно исследуются другие протеазы, способные модулировать ЭМП и обладающие опухолевой специфичностью. В этом контексте особый интерес представляет семейство ADAMTS. Оно включает 19 белков, играющих важную роль в эмбриональном развитии, а также в патогенезе остеоартроза – заболевания, характеризующегося разрушением хрящевой ткани в суставах [228]. В отличие от MMP, ADAMTS значительно меньше изучены в контексте опухолевых заболеваний. Многие члены этого семейства демонстрируют дифференциальные изменения экспрессии в опухолях по сравнению с нормальными тканями. Более того, различные представители ADAMTS могут стимулировать или подавлять опухолевую прогрессию за счет ремоделирования ВКМ и регуляции сигнальных путей [228]. К настоящему времени накоплены данные, подтверждающие способность подгруппы ADAMTS регулировать ЭМП опухолевых клеток.

Экспрессия гена *ADAMTS1* повышена в НМРЛ и плоскоклеточном раке головы и шеи (включая его подтип – ПРПР) по сравнению с соответствующими неопухолевыми тканями [25,229]. В исследовании Ху и соавторов было показано, что ADAMTS1 стимулирует миграционный и инвазивный потенциал клеток АЛ, повышая мезенхимальные маркеры CDH2 и VIM и снижая эпителиальный маркер CDH1 на белковом уровне. Гиперэкспрессия гена *ADAMTS1* усиливает метастазирование подкожных ксенографтов АЛ в легкие мышей-опухоленосителей, а повышение представленности CDH2 и VIM и снижение CDH1 в легочной ткани подтверждает прохождение метастатическими клетками ЭМП [25]. Однако существуют и противоречивые данные: Ли и коллеги сообщили, что ADAMTS1, наоборот, подавляет ЭМП клеток АЛ и их метастатический потенциал [230]. Однако, независимое исследование Цзянь и соавторов подтвердило способность ADAMTS1 индуцировать ЭМП на моделях ПРПР. В частности, ADAMTS1 повышает инвазивный потенциал опухолевых клеток, модулирует уровни белков-маркеров ЭМП, а также усиливает рост ортотопических ксенографтов ПРПР и их метастазирование в лимфатические узлы [229], что согласуется с данными Ху и др. [25]. Установлено два молекулярных механизма индукции ЭМП ADAMTS1. Во-первых, эта протеаза индуцирует диссоциацию TGF-β1 из латентного комплекса, что приводит к активации классического пути SMAD2/3 (Рис. 3). Нокдаун гена *TGFB1* полностью блокирует ЭМП, индуцированный гиперэкспрессией *ADAMTS1*, в клетках АЛ [25]. Во-вторых, ADAMTS1 повышает уровень молекулы клеточной адгезии L1CAM, что усиливает активацию пути EGFR и его нижележащих мишеней STAT3 и AKT (Рис. 3). Нокдаун генов *L1CAM* и *EGFR* подавляет

ЭМП клеток ПРПР, гиперэкспрессирующих *ADAMTS1*, *in vitro*, а также их рост и метастазирование *in vivo* [229].

Представленность белка ADAMTS2 выше в опухолевых, чем в неопухолевых тканях яичников. Клетки рака яичников (РЯ) с гиперэкспрессией *ADAMTS2* демонстрируют более активную миграцию и инвазию, повышенные уровни мезенхимальных маркеров CDH2, SNAI2 и TWIST1 и пониженный уровень эпителиального маркера CDH1 по сравнению с контрольными клетками. Предполагается, что механизм индукции ЭМП под влиянием ADAMTS2 связан с усилением продукции провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-1β [231], которые могут осуществлять аутокринную регуляцию данного процесса [125] (Рис. 3).

Уровень белка ADAMTS4 выше в тканях рака легкого, чем в прилегающих нормальных тканях, причем его содержание более выражено в метастазирующих опухолях и коррелирует с плохим прогнозом выживаемости пациентов. В экспериментах на клеточной модели АЛ было показано, что ADAMTS4 индуцирует ЭМП путем подавления убиквитинирования MYC E3-лигазой WWP2 (Рис. 3). В свою очередь, MYC регулирует усиление миграции и инвазии клеток. Гиперэкспрессия *ADAMTS4* стимулирует рост подкожных ксенографтов АЛ, однако этот эффект отменяет нокдаун *MYC* [26].

При КР уровень мРНК *ADAMTS6* выше по сравнению с нормальной тканью толстой кишки, причем этот показатель демонстрирует отрицательную корреляцию с выживаемостью пациентов с данным диагнозом. Гиперэкспрессия гена *ADAMTS6* в клетках КР индуцирует фенотипические изменения, ассоциированные с ЭМП: усиление миграции и инвазии, а также повышение CDH2, VIM и SNAI1 и подавление CDH1 на уровне белка. ADAMTS6 активирует сигнальный путь AKT/NF-κB [232] (Рис. 3). Процесс ЭМП клеток АЛ, индуцируемый TNF-α и TGF-β, включает эпигенетические изменения, контролируемые метилтрансферазой EZH2 и деметилазой KDM6B. В частности, KDM6B связывается с геном *ADAMTS6* и снижает уровень репрессивной метки H3K27me3 в его промоторе, что приводит к усилению транскрипции. Положительная корреляция между уровнями белков VIM и ADAMTS6 была продемонстрирована в опухолях пациентов с НМРЛ [28]. Хотя ген *ADAMTS6* является маркером, ассоциированным с транскрипционным ответом клеток АЛ на индукцию ЭМП, доказательства его прямого участия в приобретении клетками мезенхимального фенотипа в настоящее время отсутствуют. В хондроцитах ADAMTS6 индуцирует активацию SMAD2/3 только в присутствии TGF-β1. Было установлено, что ADAMTS6 связывается с большим латентным комплексом TGF-β и расщепляет входящий в его состав белок LTBP3, что приводит к активации TGF-β1. Кроме того, ADAMTS6 усиливает ядерную транслокацию и транскрипционную активность YAP [233] (Рис. 3). Хотя ADAMTS6

активирует ключевые сигнальные пути ЭМП, TGF-β и Hippo/YAP, значение этого эффекта для опухолевой прогрессии остается неизученным.

Уровень мРНК *ADAMTS12* в опухолях поджелудочной железы выше по сравнению с прилегающими тканями, а соответствующий белок служит маркером неблагоприятного прогноза при РПЖ. Подавление гена *ADAMTS12* препятствует миграции клеток за счет сдвига их фенотипа в сторону эпителиального: повышается экспрессия *CDH1* и снижается экспрессия мезенхимальных генов *CDH2* и *VIM*. В мышиных моделях клетки РПЖ с нокдауном *ADAMTS12* демонстрируют сниженный метастатический потенциал по сравнению с контролем. Эти данные указывают на то, что ADAMTS12 является положительным регулятором ЭМП. Возможно, эта регуляция осуществляется через усиление экспрессии гена ТФ *SNAI1*, положительная корреляция которого с экспрессией *ADAMTS12* показана как в опухолях пациентов, так и в клеточных экспериментах [234] (Рис. 3).

Белок ADAMTS16 более представлен в НМРЛ, чем нормальной ткани легкого; повышение его уровня в крови пациентов коррелирует с переходом заболевания в метастатическую стадию. Подобно ADAMTS1, ADAMTS16 высвобождает TGF-β1 из латентного комплекса. Нокдаун *ADAMTS16* полностью блокирует ЭМП, индуцированный TGF-β1, что приводит к снижению метастатической активности клеток АЛ в моделях *in vitro* и *in vivo* (Рис. 3). Ось TGF-β1/SMAD2/3 повышает уровень ТФ SOX4, который усиливает транскрипцию гена *ADAMTS16*, создавая контур положительной обратной связи [27].

В нормальной ткани молочной железы ген *ADAMTS18* находится в активном состоянии, однако при РМЖ его экспрессия эпигенетически подавлена за счет метилирования CpG-островков в промоторной области. В отличие от большинства других представителей семейства ADAMTS, ADAMTS18 ингибирует ЭМП клеток РМЖ через подавление сигнальной оси AKT/NF-κB (Рис. 3). В экспериментах с гиперэкспрессией *ADAMTS18* клетки приобретают более округлую форму, демонстрируют замедление миграции и инвазии, а также характеризуются изменениями на белковом уровне: подавлением мезенхимальных маркеров VIM и SNAI1 и повышением эпителиальных маркеров CDH1 и OCLN. Гиперэкспрессия *ADAMTS18* подавляет метастазирование клеток РМЖ, введенных в хвостовую вену, в легкие мышей [235].

Протеазы ADAMTS представляют собой высокоперспективные терапевтические мишени для разработки средств, подавляющих ЭМП опухолевых клеток. В частности, ингибиторы ADAMTS1 продемонстрировали значительный антиметастатический потенциал в доклинических исследованиях (Рис. 3). Пептид KTFR (мотив ADAMTS1, взаимодействующий с латентным комплексом TGF-β1) ингибирует активацию TGF-β1 и, как следствие, блокирует ЭМП, индуцированный ADAMTS1. KTFR снижает миграцию и инвазию клеток АЛ *in vitro* [25].

Растительный флавоноид апигенин ингибирует сигнальную ось ADAMTS1/L1CAM/EGFR. Подавляющее действие соединения на инвазию опухолевых клеток, а также рост и метастазирование ксенографтных опухолей сопоставимо с эффектом нокдауна *ADAMTS1*. Кроме того, апигенин блокирует прогрессирование ПРПР, вызванное гиперэкспрессией *ADAMTS1,* что приводит к значительному увеличению выживаемости мышей-опухоленосителей [229]. Ингибитор ADAMTS4/5 полисульфат пентозана демонстрирует благоприятный профиль безопасности в клинических испытаниях II фазы в неопухолевом контексте (пациенты с остеоартрозом коленного сустава) [236]. Эти данные указывают на перспективность дальнейшей разработки ингибиторов ADAMTS в качестве потенциальных противометастатических препаратов.

Таким образом, среди исследованных представителей ADAMTS большинство (ADAMTS1, ADAMTS2, ADAMTS4, ADAMTS6, ADAMTS12 и ADAMTS16) действуют как индукторы ЭМП, тогда как ADAMTS18 – единственный выявленный ингибитор этого процесса. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этих эффектов, остаются недостаточно изученными. В будущих исследованиях необходимо идентифицировать молекулярные мишени, опосредующие действие протеаз. Например, для ADAMTS1, ADAMTS16 и, предположительно, ADAMTS6 такой мишенью служит латентный комплекс TGF-β [25,27,233]. Кроме того, необходимо определить спектр опухолевых заболеваний, в патогенезе которых ADAMTS играют существенную роль. Уже установлена ассоциация ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS6 и ADAMTS16 с прогрессией НМРЛ (включая его подтип – АЛ) [25–28], что позволяет предположить, что терапия, направленная на ингибирование ADAMTS, может быть перспективной при данном типе рака. Учитывая, что НМРЛ занимает первое место по распространенности среди злокачественных опухолей [1], а метастазирование остается ведущей причиной смертности от рака [237], разработка ингибиторов ADAMTS представляет собой крайне актуальную задачу. Ее успешное решение будет зависеть как от углубления фундаментальных знаний о биологии протеаз ADAMTS, так и от создания селективных низкомолекулярных ингибиторов.

1.2.1.4. Лептин как перспективная мишень анти-ЭМП терапии

Жировая ткань является центральным органом регуляции энергетического гомеостаза организма. В основном ее представляет белая жировая ткань (БЖТ), располагающаяся под кожей, вокруг внутренних органов и внутри мышечных волокон. БЖТ, кроме адипоцитов, содержит стволовые клетки жировой ткани (СКЖТ), эндотелиоциты, фибробласты и иммунные клетки. Рост БЖТ происходит за счет увеличения количества адипоцитов вследствие дифференциации преадипоцитов, а также их гипертрофии. Ожирение, чрезмерное накопление жира в организме,

приводит к нарушению функционирования БЖТ: рост ткани становится избыточным, в результате чего в ней развиваются гипоксия, фиброз и хроническое воспаление [238]. Эпидемиологические данные свидетельствуют о связи избыточного веса и ожирения (индекс массы тела (ИМТ) > 25) с повышенным риском развития 13 типов рака, включая рак молочной железы, пищевода, прямой кишки и печени [239]. Учитывая, что распространенность ожирения растет во всем мире [240], актуальной задачей является поиск терапевтических решений, направленных на снижение его влияния на онкотрансформацию.

Существует два типа воздействия БЖТ на опухолевую прогрессию. Жировая ткань может действовать локально, когда она находится в непосредственном контакте с опухолью, как при раке молочной и предстательной желез, раке почек и меланоме. В других случаях она может осуществлять эндокринную регуляцию через кровоток, действуя на удаленные от жировых депо опухоли, например, рак эндометрия, печени и поджелудочной железы [238]. Дисфункция БЖТ при ожирении ассоциирована с тремя эффектами, способствующими развитию опухолей. Во-первых, адипоциты высвобождают свободные жирные кислоты, которые могут поглощаться опухолевыми клетками и использоваться как источник энергии [241]. Во-вторых, гипертрофия адипоцитов приводит к их гибели с высвобождением содержимого цитоплазмы, что активирует иммунные клетки и вызывает секрецию воспалительных медиаторов, воздействующих на опухолевые клетки и усиливающих их метастатическую активность [238,241]. В-третьих, меняется эндокринная активность жировой ткани: уменьшается секреция противоопухолевого цитокина адипонектина, тогда как выработка лептина, стероидных гормонов, инсулина и инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), в основном выполняющих проопухолевые функции, увеличивается [238]. Таким образом, БЖТ оказывает комплексное влияние на патогенез рака. Особенно интересным аспектом этого взаимодействия является связь ожирения с ЭМП опухолевых клеток.

Клетки жировой ткани оказывают регуляторное влияние на ЭМП через секрецию адипокинов, специфических цитокинов жировой ткани. Некоторые адипокины, такие как лептин, резистин и висфатин, стимулируют ЭМП, в то время как другие, включая адипонектин и хемерин, подавляют этот процесс. Молекулярные механизмы ЭМП, индуцированного адипокинами, подробно рассмотрены в недавнем обзоре Акрида и Пападаки [21].

Лептин продуцируется в СКЖТ, адипоцитах и некоторых типах опухолевых клеток. Нокдаун гена лептина (*LEP*) блокирует способность СКЖТ, выделенных от пациентов с ожирением (ИМТ ≥ 30), индуцировать ЭМП клеток РМЖ. СКЖТ, при введении вместе с клетками РМЖ в молочную железу мышей, стимулируют рост ксенографтов и их метастазирование в легкие и печень, а нокдаун *LEP* значительно снижает эти эффекты [242,243]. Ко-инкубация адипоцитов с

клетками рака эндометрия (РЭ) повышает секрецию лептина. В свою очередь, гиперэкспрессия *LEP* усиливает, а нокдаун ослабляет способность адипоцитов к индукции ЭМП клеток РЭ [244]. В клетках рака носоглотки наблюдается эндогенная экспрессия гена *LEP*, при этом эктопическое повышение ее уровня приводит к приобретению клетками более мезенхимального фенотипа. Клетки с нокдауном *LEP* обладают эпителиальным фенотипом и образуют опухоли меньшего размера при подкожном введении мышам [245].

Лептин индуцирует характерные для ЭМП изменения в фенотипе опухолевых клеток: удлинение формы, реорганизацию актинового цитоскелета, усиление миграции и инвазии, ядерную транслокацию SNAI1/2, а также повышение уровней мезенхимальных маркеров FN1, VIM и CDH2 при одновременном снижении уровней эпителиальных маркеров CDH1, TJP1 и OCLN [244–251]. Кроме того, отмечается повышение стволовых характеристик, которые также ассоциированы с ЭМП (см. п. 1.1.7): образования сфероидов, доли РСК в популяции, активности ALDH, уровней стволовых маркеров OCT4 и CD44 и химиорезистентности клеток [246,248,249,251]. Предынкубация клеток РЭ с лептином перед их подкожным введением мышам усиливает рост образующихся ксенографтов [244]. Внутриопухолевое введение лептина повышает рост ортотопических ксенографтов РМЖ, а также их метастазирование в легкие и печень, оказывая негативное влияние на выживаемость мышей-опухоленосителей [247]. Суммируя, лептин оказывает пара- и аутокринное стимулирующее действие на ЭМП опухолевых клеток и, как следствие, усиливает опухолевую прогрессию.

Молекулярные механизмы эффекта лептина на ЭМП опухолевых клеток были подробно изучены (Рис. 4). Связывание лептина с рецептором LEPR активирует сигнальные пути PI3K/AKT и JAK2/STAT3 [247]. Лептин-индуцированный AKT положительно регулирует белки IL-8 (CXCL8) и пируваткиназу M2 (PKM2), опосредующие приобретение клетками мезенхимального фенотипа [247,250]. Нокдаун *AKT*, анти-CXCL8 антитело и нокдаун *PKM2* блокируют ЭМП клеток РМЖ, индуцированный лептином [247]. В ортотопической мышиной модели РМЖ введение лептина приводит к повышению уровня белка CXCL8 в опухолевых тканях [247]. В то же время подавление экспрессии *PKM2* в опухоли снижает ее рост и метастазирование, в результате чего повышается выживаемость экспериментальных животных [250]. Активация пути JAK2/STAT3 также является ключевым событием для ЭМП, вызванного лептином, поскольку фармакологическое ингибирование JAK2 или нокдаун *STAT3* полностью блокируют этот процесс в клетках РМЖ, РЭ и РЯ [244,249,251]. STAT3, действуя ниже по ходу сигнального каскада лептина, транскрипционно активирует *JARID2* и подавляет *MIR200C* [249,252]. Up-регулированный белок JARID2 опосредует физическое взаимодействие двух эпигенетических репрессивных комплексов, PRC2 и NuRD, и их кооперацию в подавлении

активности генов-супрессоров опухолей *BRCA2*, *RB1* и *INPP4B*. Показано, что JARID2 и его белок-партнер MTA1 (относится к NuRD) синергически усиливают инвазивный потенциал и стволовые свойства (уровни KLF4, OCT4, SOX2 и др.) опухолевых клеток. Потеря *JARID2* ослабляет опухолеобразующий потенциал клеток РМЖ *in vivo*: снижается как частота приживления опухолей у мышей, так и скорость роста сформировавшихся ксенографтов [252]. Активированный лептином STAT3 привлекает в промотор гена *MIR200C* метилтрансферазу EHMT2, которая присоединяет к нему репрессивную метку H3K9me2. Это усиливает прохождение сигнала по каскаду лептина, поскольку miR-200c напрямую подавляет мРНК *LEPR*. Гиперэкспрессия *MIR200C* блокирует лептин-индуцированный ЭМП и связанное с ним усиление стволовых свойств клеток РМЖ. Ингибирование STAT3 с помощью S3I-201 снижает число опухолей молочной железы, образующихся у крыс с ожирением при введении им химического канцерогена N-метилнитрозомочевины. Кроме того, S3I-201 эффективно подавляет рост уже сформировавшихся опухолей [249].

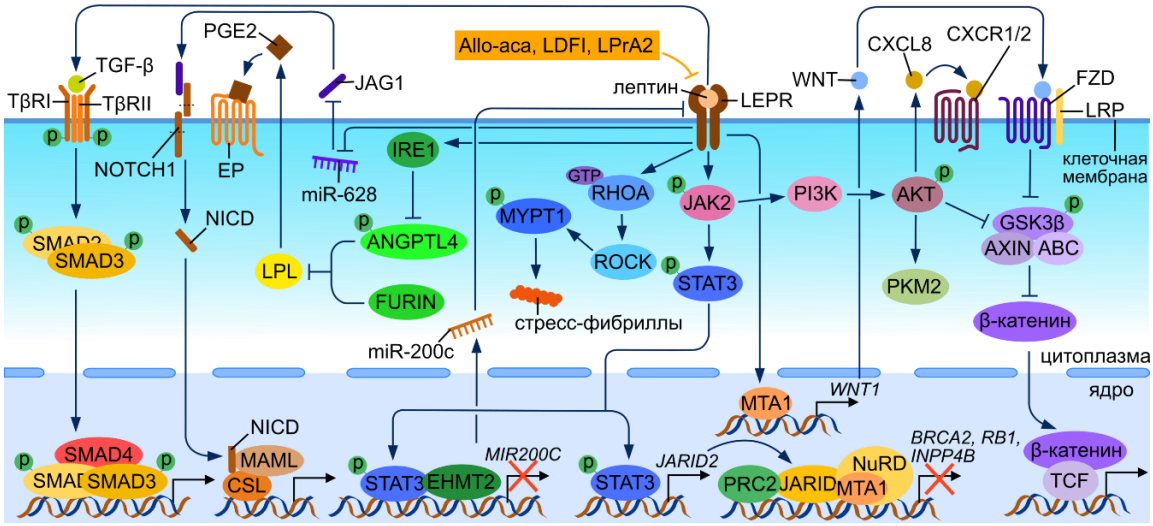

Рисунок 4. Стимулирующее действие лептина на ЭМП опухолевых клеток. На схеме показаны ключевые сигнальные пути, запускающие ЭМП под действием лептина, и пептидные ингибиторы LEPR (выделены оранжевыми прямоугольниками).

Лептин усиливает подвижность опухолевых клеток через активацию пути RHOA/ROCK/MYPT1, модулирующего образование стресс-фибрилл и ламеллоподий и сборку фокальных контактов (Рис. 4). Ингибировании ROCK гидрохлоридом фасудила полностью блокирует лептин-индуцированные миграцию и инвазию клеток РЯ [251].

Осуществляемая лептином регуляция метаболизма липидов также вносит вклад в его прометастатический эффект. Лептин стимулирует киназу IRE1 к фосфорилированию ангиопоэтин-подобного белка 4 (ANGPTL4), что подавляет осуществляемую им индукцию конформационных изменений липопротеинлипазы (LPL), необходимых для ее расщепления

протеазой FURIN. В результате LPL стабилизируется и запускает поглощение клеткой экзогенных липидов, что приводит к усилению синтеза простагландина E2 (PGE2) из арахидоновой кислоты (Рис. 4). Гиперэкспрессия *LPL*, как и добавление PGE2, увеличивают CDH2 и снижают CDH1 на уровне белка в клетках РЖ. Кроме того, клетки, гиперэкспрессирующие *LPL,* при введении в подушечки лап мышей активнее метастазируют в лимфатические узлы [253].

Сигнальный путь лептина образует синергические взаимодействия с классическими сигнальными путями ЭМП, включая TGF-β, WNT/β-катениновый и NOTCH каскады (Рис. 4). Лептин увеличивает продукцию TGF-β1, который индуцирует ЭМП аутокринным способом в клетках РМЖ. Анти-TGF-β1 антитело значительно снижает влияние лептина на экспрессию *CDH1*, активность ALDH и клеточную подвижность [248]. В случае WNT/β-катениновой оси, нокдаун гена *CTNNB1*, кодирующего β-катенин, полностью подавляет лептин-индуцированный ЭМП в клетках РМЖ. Лептин стимулирует фосфорилирование GSK-3β по двум независимым механизмам: (а) через активацию AKT и (б) через ассоциированный с метастазами белок 1 (MTA1), повышающий уровень белка WNT1. Фосфорилированный GSK-3β диссоциирует из комплекса APC/AXIN, а его мишень, β-катенин, стабилизуется и транслоцируется в ядро [246]. Осуществляемая лептином регуляция пути NOTCH влияет на метастатическую активность и лекарственную устойчивость опухолевых клеток. Лептин снижает уровень miR-628, подавляющей мРНК *JAG1*, в клетках РПрЖ. Эктопическая экспрессия этой микроРНК снижает уровни белков JAG1, NOTCH1–3 и N1ICD и переводит клетки в более эпителиальный фенотип, характеризующийся низкой миграционной и инвазивной активностью, сниженными уровнями CDH2, VIM, ZEB1 и SNAI1/2 и повышенным CDH1. Клетки РПрЖ, гиперэкспрессирующие *MIR168*, демонстрируют более высокую чувствительность к цитотоксическому действию энзалутамида и доцетаксела [254].

Несмотря на доказанную функцию лептина как индуктора ЭМП при карциномах, его роль в ЭМП-подобных процессах в опухолях нейроэктодермального происхождения остается почти не исследованной. Интересно, что высокий ИМТ коррелирует одновременно с повышенным риском развития ГБ и с лучшей выживаемостью пациентов с данным диагнозом [255]. Уровни лептина и его рецептора LEPR повышаются в опухолях головного мозга по сравнению с нормальной нервной тканью, при этом в ГБ уровни обоих белков выше, чем в менее злокачественных астроцитомах и олигодендроглиомах [256]. Кроме того, уровень LEPR положительно коррелирует с представленностью TWIST и SNAI1/2 в опухолевых тканях ГБ и отрицательно – с выживаемостью пациентов [257]. *In vitro* лептин увеличивает пролиферацию и миграцию в клетках астроцитомы и ГБ [256,258,259], а также стволовые характеристики

(сфероидообразование, самообновление, долю ГСК в популяции и экспресию генов-маркеров плюрипотентности *SOX2, NES* и *PROM1*) в клетках ГБ [260]. При этом в клетках астроцитомы активируются пути ERK1/2 и PI3K/AKT/mTOR [258], а в клетках ГБ – JAK2/STAT3, AKT и NOTCH1 [256,259–261]. Клетки ГБ способны секретировать лептин, что предполагает аутокринный и паракринный характер его действия [262]. В клеточных моделях лептин усиливает неоангиогенез, стимулируя формирования сосудов как эндотелиальными клетками [262], так и клетками ГБ в ходе васкулогенной мимикрии [257]. В опухолях пациентов с ГБ уровни белков лептина и LEPR положительно коррелируют с выраженностью васкулогенной мимикрии, оцениваемой по числу сосудов, отрицательных по эндотелиальному маркеру CD31. В свою очередь, васкулогенная мимикрия положительно коррелирует с уровнями TWIST и SNAI1/2, что свидетельствует о вовлечении ПМП в этот процесс [257]. В мышиных моделях ГБ введение лептина усиливает рост подкожных ксенографтов, в то время как нокдаун *STAT3* подавляет этот эффект [261,263].

Нейробластома (НБ) – это опухоль симпатической нервной системы, медианный возраст постановки диагноза которой составляет 17 – 18 месяцев. На её долю приходится 6 – 10% случаев и 9 – 15% смертности от опухолевых заболеваний у детей [264]. Клетки НБ могут претерпевать НМП, специфический для данного гистогенеза подтип ЭМП, в результате чего увеличивается их метастатический потенциал и лекарственная устойчивость [10,194]. Химиотерапия против НБ оказывает стимулирующие влияние на чрезмерный рост висцеральной и подкожной жировой ткани [265]. Кроме того, при прогрессировании происходит снижение катаболизма длинноцепочечных жирных кислот (LCFA) в тканях НБ, что приводит к увеличению содержания длинноцепочечного ацилкарнитина (LCAC) на поздних стадиях (3 и 4). Важную роль в регуляции этого процесса играет лептин, повышение уровня которого в тканях НБ также отмечено на поздних стадиях. Лептин переключает метаболизм клеток НБ с окислительного фосфорилирования на гликолиз, увеличивая синтез молочной кислоты (МК). В условиях ко-культивирования клетки НБ через МК стимулируют дифференциацию $CD4^+$ Т-клеток в регуляторные Т-клетки (Treg), проявляющие проопухолевый эффект, включая усиление пролиферации, миграции и устойчивости клеток НБ к цисплатину. С точки зрения молекулярного механизма лептин (а) индуцирует ацетилирование карнитинпальмитоилтрансферазы (CPT2), приводя к подавлению катализируемого ей расщепления LCAC до карнитина и LCFA-CoA, и (б) усиливает экспрессию генов пируваткиназы M1/2 (*PKM1/2*) и лактатдегидрогеназы A (*LDHA*), ключевых участников синтеза МК [24]. Кроме того, лептин усиливает пролиферацию и подавляет апоптоз в клетках НБ за счет активации сигнальных путей STAT3, ERK1/2 и PI3K/AKT/mTOR [266–268]. В соответствии с этими

данными, Ли с соавторами подтвердили, что гиперэкспрессия *LEP* повышает рост ортотопических ксенографтов у иммунодефицитных мышей при введении клеток НБ в надпочечники [24]. Несмотря на выявленную связь лептина с прогрессией НБ, его НМП-модулирующие свойства остаются неисследованными.

Лептин представляет собой перспективную мишень для разработки ЭМП-направленной терапии. Ряд пептидных ингибиторов LEPR, включая Allo-aca, LDFI и LPrA2, разработанных на основе природных последовательностей лептина (Рис. 4), показали высокий противоопухолевый потенциал в доклинических исследованиях. В частности, Allo-aca ингибирует лептин-индуцированный ЭМП клеток РМЖ собаки: подавляет инвазию, снижает уровни белков VIM и MMP9 и повышает CDH1 [23]. В мышиной ортотопической модели РМЖ введение Allo-aca увеличивает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей [269]. В экспериментальных моделях РПрЖ Allo-aca ингибирует стимулированную лептином подвижность клеток и активацию ERK1/2 *in vitro*, а также рост и васкуляризацию подкожных ксенографтов *in vivo*, оказывая положительное влияние на выживаемость мышей с опухолями [22]. LDFI блокирует вызванную лептином активацию сигнальных путей JAK2/STAT3, AKT и ERK1/2 в клетках РМЖ, что приводит к уменьшению их пролиферативной и миграционной активности. ПЭГилированный LDFI (PEG-LDPI) эффективно ингибирует рост ортотопических ксенографтов РМЖ [270]. Аналогичный эффект оказывает ПЭГилированная форма LPrA2 (PEG-LPrA2). В опухолях животных, получаших PEG-LPrA2, отмечено снижение уровней лептина, LEPR и ангиогенных маркеров VEGF и VEGFR2 [271]. Наночастицы оксида железа, декорированные LPrA2 (IONP-LPrA2), подавляют активацию путей STAT3 и NOTCH1–3 лептином, снижая его стимулирующее действие на стволовые свойства (сфероидообразование, химиорезистентность, обогащение популяции РСК и активность ALDH), в клетках РМЖ и РПЖ [272,273]. IONP-LPrA2 замедляют рост подкожных ксенографтов РПЖ у мышей, снижая в них продукцию лептина, LEPR, NOTCH1/3 и OCT4 [273]. Важно отметить, что пептиды PEG-LDPI, PEG-LPrA2 и Allo-aca не влияют на физиологические параметры экспериментальных животных, что указывает на потенциальную безопасность ингибирования LEPR в терапевтических целях [22,269–271].

Эксперименты на клеточных моделях ГБ показывают, что LDFI и Aca1 имеют большой потенциал в качестве терапевтических агентов, подавляющих ПМП. В частности, LDFI ингибирует активацию лептином пути NOTCH1 и тем самым блокирует усиление миграции и стволовых характеристик (сфероидообразования, самообновления и экспрессии генов *PROM1*, *NES* и *SOX2*) в клетках ГБ [260]. Под влиянием лептина, секретируемого клетками ГБ, эндотелиоциты усиливают свою ангиогенную активность, в то время как Aca1 подавляет лептин-индуцируемую активацию STAT3 и за счет этого полностью блокирует образование

сосудоподобных структур *in vitro* [262]. Стоит отметить, что пептидные антагонисты LEPR ранее не изучались на ортотопических животных моделях ГБ. Между тем, инъекции Aca1 эффективно подавляют анорексигенный эффект лептина в центральной нервной системе мышей, а его производное Allo-aca эффективно накапливается в мозге мышей при внутрибрюшинном введении [274]. Способность Aca1 и Allo-aca проникать сквозь ГЭБ в сочетании с их активностью *in vitro* позволяет предполагать их эффективность в отношении опухолей головного мозга *in vivo*.

Таким образом, адипокин лептин играет значительную роль в прогрессировании онкологических заболеваний под влиянием ожирения, поскольку он модулирует метастатический потенциал и лекарственную устойчивость опухолевых клеток через индукцию ЭМП. Показано, что лептин-индуцированный ЭМП играет важную роль в патогенезе нескольких типов эпителиальных опухолей, включая рак молочной железы, эндометрия, яичников, предстательной железы, носоглотки и желудка [244,245,247,251,253,254]. Однако слабо изученным остается значение лептина для регуляции подтипов ЭМП, специфических для опухолей нейроэктодермального происхождения. Лептин эндогенно продуцируется клетками ГБ и НБ, оказывая проопухолевое действие посредством аутокринного механизма [24,262]. В случае ГБ показано, что лептин стимулирует ключевые фенотипические проявления, ассоциированные с ПМП: клеточную подвижность, стволовые характеристики и васкулогенную мимикрию [257,259,263]. Также отмечается, что лептин активирует ключевой сигнальный путь ПМП, NOTCH1 [260], а также ТФ STAT3, входящий в регуляторное ядро ПМП [263]. Однако влияние лептина на уровни молекулярных маркеров пронейронального и мезенхимального фенотипов не изучено, что делает описание его воздействия на ПМП неполным. В случае НБ показано, что лептин запускает изменения в метаболизме опухолевых клеток, способствующие их уходу от иммунного надзора [24]. Однако влияние лептина на процессы, связанные с НМП, ранее не изучалось. Предполагается, что специфические подтипы ЭМП, ПМП и НМП играют важную роль в прогрессии опухолей нейроэктодермального происхождения [9,10,194]. Исследования функции лептина может открыть новые пути терапевтического воздействия на данные процессы.

1.2.2. Разработка анти-ЭМП препаратов с использованием фенотип-ориентированного подхода

Фенотип-ориентированный подход основан на анализе способности соединений подавлять фенотипические проявления ЭМП в опухолевых клетках. Стандартная схема исследования включает скрининг библиотеки соединений с помощью клеточных моделей, в ходе которого оценивается их влияние на одно из проявлений ЭМП (например, изменение морфологии клеток). Затем анти-ЭМП активность лидерных соединений проходит верификацию путем анализа их действия на другие сопряженные показатели (например, усиление миграции, инвазии и уровней

мезенхимальных маркеров). Исследование выявленных таким образом ингибиторов ЭМП может быть продолжено на животных моделях.

Сюй и коллеги использовали скрининговую систему, основанную на анализе морфологии клеток. ЭМП индуцировали в клетках АЛ с помощью TGF-β1, после чего проводили окрашивание F-актина TRITC-фаллоидином с последующим количественным морфологическим анализом. В качестве положительного контроля использовали SB431542 (ингибитор TβRI); он подавлял вызванные TGF-β1 увеличение площади и длины клеток и уменьшение их округлости. Данную систему использовали для скрининга 306 соединений традиционной китайской медицины, в результате чего были идентифицированы 5 соединений-лидеров с активностью, сопоставимой с SB431542: камптотецин, диметилкуркумин, артесунат, синапин и берберин. Их способность ингибировать ЭМП была верифицирована с помощью функциональных экспериментов: было показано, что выбранные соединения увеличивают адгезию клеток к фибронектину, подавляют миграцию, снижают уровень белка VIM и увеличивают CDH1 в TGF-β1-индуцированных клетках АЛ [12].

Система скрининга, предложенная Чжао и соавторами, также основана на морфологическом анализе, но использует трехмерные клеточные культуры вместо адгезивных. Клетки, выделенные из мезенхимальных опухолей молочной железы мышей, при имплантации в матригель образуют органоиды с отростками, проникающими в окружающий матрикс. Эктопическая экспрессия *Mir200c* стимулирует переход клеток к эпителиальному фенотипу (увеличение уровня белков CDH1 и KRT18 и снижение ZEB1), что подавляет образование отростков. С помощью этой системы был выполнен скрининг 65 низкомолекулярных соединений, нацеленных на эпигенетические регуляторы, и были идентифицированы 10 соединений-лидеров, вызывающих морфологические изменения органоидов, аналогичные эффекту miR-200c. Среди них, для моцетиностата и фимепиностата (ингибиторов гистоновых деацетилаз (HDAC)) были выполнены функциональные исследования для подтверждения ЭМП-ингибирующей активности. Оба соединения снижают уровни мРНК и белков ZEB1 и SNAI2 и повышают CDH1 *in vitro*. Кроме того, моцетиностат при совместном введении с ингибитором ДНК-метилтрансфераз азацитидином (не влияющим на ЭМП *in vitro*) увеличивает выживаемость мышей с ортотопическими опухолями РМЖ, а также повышает эффективность терапии карбоплатином. Комбинация моцетиностат/азацитидин повышает уровни белков CDH1 и KRT8 и подавляет ZEB1 и SNAI2 в опухолевой ткани, что подтверждает ингибирование ЭМП *in vivo* [11].

Эскер и коллеги использовали для скрининга анализ экспрессии генов-маркеров ЭМП. Для этого в клетки РМЖ, АЛ и КР вводили лентивирусную плазмиду, содержащую гены флуоресцентных белков *GFP* и *RFP* под контролем промоторов *VIM* и *CDH1* соответственно.

Данная конструкция позволяет выявлять клетки эпителиального (RFP^+), мезенхимального (GFP^+) и гибридного (RFP^+GFP^+) фенотипов. Действие примерно 23000 низкомолекулярных соединений оценивали на сфероидах, сформированных такими репортерными клетками, в результате чего было отобрано 36 соединений-лидеров, снижающих флуоресценцию GFP и повышающих RFP. Для 5 соединений, включая RO-31-8220 и RO-32-0432 (ингибиторы PKC), SNS-314 (ингибитор киназ AURORA A/B/C), CX-6258 (ингибитор киназы PIM1), рювидин (ингибитор гистоновой метилтрансферазы KMT5A), ML324 (ингибитор гистоновой деметилазы JMJD2), а также CSB (ингибитор везикулярных транспортеров глутамата VGLUT), способность подавлять ЭМП была верифицирована на клетках КР: были показаны дозозависимые эффекты соединений на флуоресценцию GFP и RFP, стволовые свойства (образование колоний) и инвазию [275].

Таким образом, фенотип-ориентированный подход представляет собой эффективную стратегию поиска ингибиторов ЭМП. Он основан на анализе фенотипических изменений, происходящих в клетках при ЭМП, и позволяет выявлять активные соединения с еще неустановленным механизмом действия. Этот подход актуален по двум причинам. Во-первых, наше понимание биологии ЭМП остается неполным, поэтому ориентация только на известные молекулярные механизмы данного процесса может привести к пропуску высокоактивных молекул, действующих на неизвестные или малоизученные пути. Во-вторых, даже хорошо изученные сигнальные пути ЭМП обладают выраженной избыточностью и способны взаимодействовать друг с другом, поэтому блокада одного из них нередко компенсируется активностью других [8]. Следовательно, фенотипический скрининг является наиболее эффективным способом нахождения ингибиторов ЭМП опухолевых клеток. Для дальнейшего развития этого направления особое значение имеет повышение производительности скрининговых систем. Для тестирования большого числа соединений удобно использовать форматы 96- и 384-луночный планшетов [11,12]. Генно-инженерные конструкции, позволяющие оценивать состояние ЭМП по флуоресцентному сигналу клеток, представляют собой удобный инструмент, который сокращает время и трудозатраты на фенотипирование [275]. Кроме того, применение методов машинного обучения облегчает анализ сложных многофакторных данных, включая результаты морфологических исследований [11]. После завершения скрининга, ориентированного на одно фенотипическое проявление ЭМП, критически важно изучить действие соединений-лидеров и на другие аспекты этого процесса. Согласно современным протоколам исследования ЭМП, его полная характеристика требует оценки как функциональных характеристик клеток, так и набора молекулярных маркеров [31].

1.2.2.1. Амиды солоксолона как потенциальные ингибиторы ПМП клеток глиобластомы

Большой интерес представляет применение фенотип-ориентированного подхода к поиску ингибиторов специфического для ГБ подтипа ЭМП, ПМП. В частности, данная стратегия может быть применена к библиотеке амидов солоксолона, производных 18βH-глицирретовой кислоты, структурная оптимизация которых была направлена на улучшение проникновения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [17]. В этом разделе рассматриваются предпосылки создания этих соединений, их структурные аналоги, биологическая активность и перспективы дальнейшего изучения.

Растения, грибы и морские организмы остаются ценными источниками лекарственных агентов, поскольку их биосинтетические пути производят структурно сложные молекулы, трудно получаемые методами химического синтеза. В частности, способность к ингибированию ЭМП опухолевых клеток была показана для многих природных молекул из классов сесквитерпеновых и стероидных лактонов, полифенолов, хинонов, флавоноидов и тритерпеноидов [276].

Пентациклические тритерпеноиды – это соединения, основная структура которых состоит из 30-углеродного скелета, структурированного в пять 5- или 6-углеродных колец (кольца A – E). Многие природные представители этого класса, выделяемые преимущественно из растений, обладают выраженной способностью ингибировать ЭМП опухолевых клеток [125] (Рис. 5A). В частности, олеаноловая кислота (ОК), получаемая из растений семейства Gentianaceae, подавляет миграцию, инвазию и уровни белков MMP2, CDH2 и SNAI2 и стимулирует уровень CDH1 в клетках КР, что указывает на ее анти-ЭМП эффект. Эта активность связана с индуцируемым ОК привлечением рецептора, активируемого пролифератором пероксисом гамма (PPARγ), к ядерному рецептору NR4A1, приводящему к убиквитин-зависимой деградации последнего. В мышиных моделях ОК подавляет рост подкожных и ортотопических опухолей КР, не оказывая явных побочных эффектов [277]. Урсоловая кислота, встречающаяся во многих лекарственных растениях, включая *Rosemarinus officinalis, Eribotrya japonica* и *Calluna vulgaris,* ингибирует TGF-β1-индуцированный ПМП клеток ГБ, снижая их инвазивную и миграционную активность, а также уровни VIM и SNAI1. Соединение подавляет рост подкожных ксенографтов ГБ у мышей [278]. Бетулиновая и 18βH-глицирретовая кислоты (18βH-ГК), выделенные из *Betula platyphylla* и *Glycyrrhiza glabra* соответственно, сдвигают фенотип клеток РЖ в эпителиальную сторону: подавляют миграцию и инвазию, снижают и повышают белковые уровни CDH2 и CDH1 соответственно. Эксперименты на мышиных ксенографтных моделях подтверждают выраженный терапевтический эффект этих соединений в отношении роста и метастатического потенциала опухолевых клеток [279,280]. Предполагается, что анти-ЭМП активность 18βH-ГК

связана с подавлением уровня трансляционно-контролируемого опухолевого белка (TPT1), приводящим к снижению активации AKT и повышению уровня P53 [280].

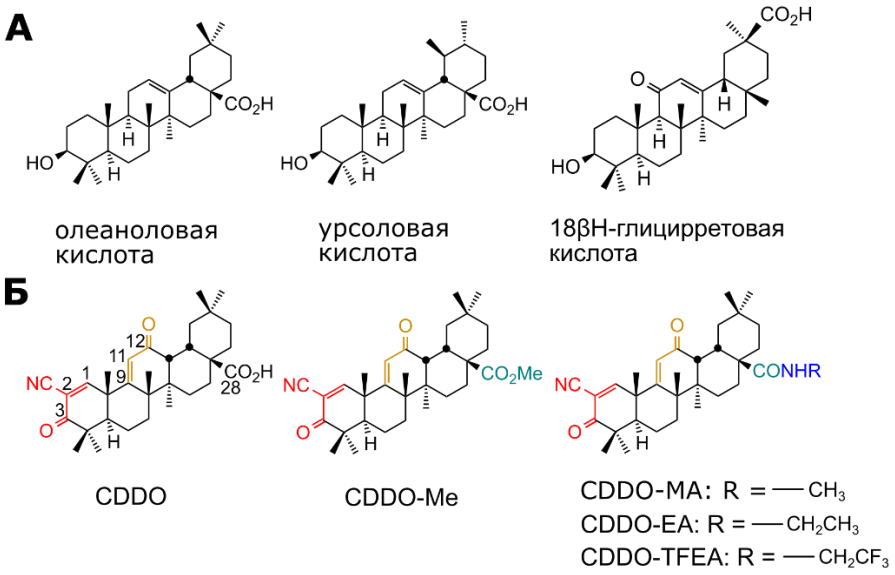

Рисунок 5. Ингибиторы ЭМП на основе пентациклических тритерпеноидов. (**А**) Природные пентациклические тритерпеноиды, для которых была показана способность ингибировать ЭМП опухолевых клеток. (**Б**) Структура цианоенон-содержащих производных ОК: CDDO, CDDO-Me и амидов CDDO. Красным, оранжевым, синим и бирюзовым цветом показаны соответственно цианоеноновая группа, еноновая группа, амидная группа и метиловый эфир, введенные в структуру ОК.

Спорн и коллеги разработали серию цианоенон-несущих производных ОК изначально с целью улучшения их противовоспалительной активности (Рис. 5Б). Соединение-лидер CDDO подавляло продукцию оксида азота интерферон гамма (IFNγ)-стимулированными макрофагами на уровне, сопоставимом с референсным препаратом дексаметазоном [281]. Дальнейшие исследования продемонстрировали значительное цитотоксическое действие CDDO в отношении опухолевых клеток различного гистогенеза [282–285]. Для повышения противоопухолевой активности была проведена дальнейшая структурная оптимизация, в результате которой было создано производное CDDO-Me, в котором карбоксильная группа в положении C-28 была заменена на метиловый эфир. В частности, концентрации CDDO-Me, необходимые для 50%-снижения жизнеспособности (IC_{50}) клеток РМЖ и РПЖ, оказались в 8 – 14 раз ниже соответствующих значений CDDO [283,284]. Механизм CDDO-Me-индуцированной клеточной гибели включает повышение притока Ca^{2+} в клетку, стресс ЭПР и усиление продукции АФК (в основном H_2O_2) – эти процессы взаимно усиливают друг друга, формируя положительные регуляторные связи. В результате активируется каскад каспаз 8/9/3, запускающий апоптоз [283].

В мышиных моделях CDDO-Me подавляет инициацию опухолей легких под действием винил карбамата [282] и замедляет рост ортотопических ксенографтов РПЖ [284]. CDDO-Me был протестирован в клинических испытаниях I фазы на небольшой группе из 47 пациентов с запущенными, устойчивыми к лечению опухолями, где продемонстрировал ингибирующее действие на рост опухоли у одного пациента с мантийноклеточной лимфомой и одного пациента с анапластической карциномой щитовидной железы [286]. Для подтверждения клинической эффективности CDDO-Me требуются дальнейшие исследования с участием большего числа пациентов.

Высокая биологическая активность CDDO и CDDO-Me по сравнению с их природным предшественником ОК связана с введением в структуру колец A и C двух электрофильных акцепторных сайтов Михаэля (цианоеноновой и еноновой группы соответственно), позволяющих образовывать связи с нуклеофильными тиольными (SH)-группами цистеинов в обратимой реакции присоединения Михаэля [287] (Рис. 5Б). В частности, большую роль для цитотоксического эффекта CDDO-Me играет его взаимодействия с киназами IKKβ и JAK1, ТФ STAT3, E3 убиквитинлигазой KEAP1, а также деубиквитиназой USP7 [288]. При этом связывание с цистеинами зависит от нуклеофильности SH-группы, на которую влияют соседние аминокислоты, а также от уникальной стереохимии олеананового каркаса, что предотвращает случайное алкилирование белков CDDO-Me [287,289].

В ряде исследований акцент был смещен с изучения цитотоксического действия CDDO-Me на оценку его влияния на процесс метастазирования. В частности, CDDO-Me снижает миграционную активность клеток РШМ [290]. Он также подавляет инвазию, повышает белковые уровни эпителиальных маркеров CDH1, TJP1 и CLDN1, но снижает уровни мезенхимальных маркеров CDH2 и VIM в клетках ПРП. Кроме того, CDDO-Me ингибирует стволовые характеристики, снижая уровни белков OCT4, NANOG и SOX2 [14]. Тритерпеноид подавляет миграционную и инвазивную активность клеток КР, снижая и повышая в них экспрессию генов *CDH2* и *CDH1* соответственно [291]. В мышиной ортотопической модели CDDO-Me блокирует метастазирование РМЖ в легкие [292]. Эти результаты свидетельствуют о том, что CDDO-Me снижает метастатический потенциал опухолевых клеток за счет подавления их ЭМП.

Молекулярный механизм анти-ЭМП активности CDDO-Me включает: (а) подавление β-катенинового пути и уровней ТФ ЭМП, SNAI1/2 и ZEB1 [14], (б) снижение продукции клетками простагландина PGE2, индуктора ЭМП, за счет увеличения экспрессии гена *HPGD*, кодирующего простагландиндегидрогеназу [291] и (в) прямое связывание CDDO-Me с транспортером цинка SLC30A1 [290].

Недавно Ванг и коллеги показали, что CDDO-Me подавляет инвазивный потенциал клеток ГБ. Вызываемое соединением снижение белковых уровней CDH2, VIM, SNAI1 и β-катенина и повышение CDH1 свидетельствует о его способности ингибировать ПМП [13]. К сожалению, CDDO-Me плохо проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что ограничивает его использование в качестве лекарственного средства против ГБ [293]. Йе и коллеги разработали самособирающиеся наночастицы CDDO-Me и лексискана, декорированные пептидом p28, которые продемонстрировали селективное накопление тритерпеноида в мозге мышей при внутривенном введении. В отличие от чистого CDDO-Me, наночастицы эффективно подавляют рост интракраниальных ксенографтов ГБ у мышей, увеличивая их выживаемость. Опухоли мышей, получавших наночастицы, демонстрируют снижение уровней CDH2, SNAI1 и VIM и повышение уровня CDH1, что подтверждает ингибирование ПМП *in vivo*. Стоит отметить, что как CDDO-Me, так и его наночастицы не влияют на вес экспериментальных животных, что указывает на отсутствие системной токсичности [13]. Спорн и коллеги оптимизировали структуру CDDO-Me, показав, что замена метилового эфира на амидные группы в положении C-28 значительно повышает накопление соединения в мозге [294] (Рис. 5Б). Полученные таким образом производные CDDO-MA, CDDO-EA и CDDO-TFEA улучшают течение нейроденеративных заболеваний в мышиных моделях *in vivo* [293,294], однако их эффект на инвазивный потенциал и ПМП клеток ГБ до сих пор не изучен, что делает данное направление перспективным для будущих исследований.

Логашенко и коллеги выполнили химическую модификацию 18βH-ГК, получив библиотеку из 5 цианоенон-содержащих производных, для которых провели скрининг цитотоскического действия на клетках РШМ. Интересно, что наибольшую активность показал солоксолон метил (СМ), который является структурным изомером CDDO-Me, отличающимся от него положением метилового эфира (C-30 вместо C-28) (Рис. 6А). При этом IC_{50} СМ оказался в 2 – 8 меньше по сравнению с IC_{50} CDDO-Me в клетках РШМ, РМЖ и НБ [16]. Цитотоксическое действие СМ связано с двумя процессами: (1) активацией каспаза 3/7-зависимого внутреннего пути апоптоза, включающего снижение мембранного потенциала митохондрий и усиление продукции АФК [16,295], и (2) индукцией стресса ЭПР под контролем ТФ AP-1 [296]. Это совпадает с механизмом цитотоксичности, описанным для CDDO-Me [283]. *In vivo* СМ замедляет рост асцитной карциномы Krebs-2 в брюшной полости мышей [15].

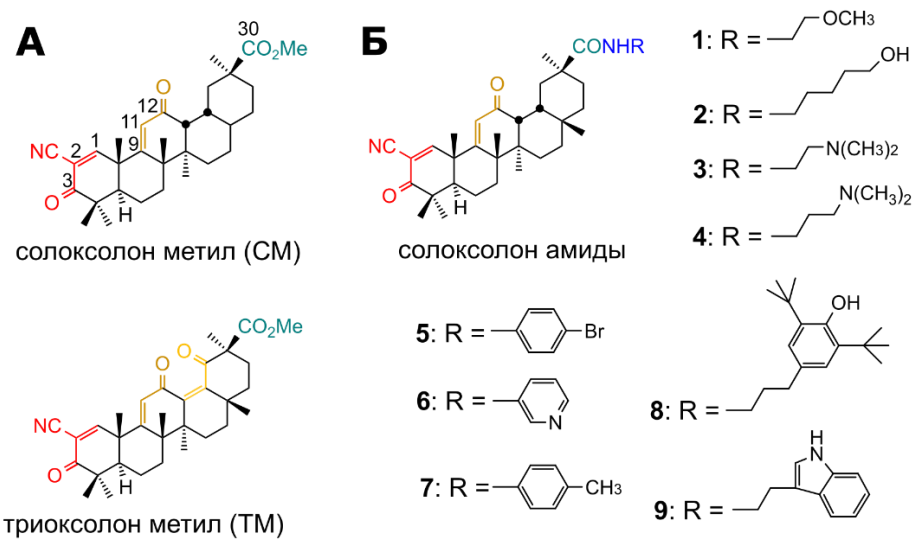

Рисунок 6. Разработка ингибиторов ПМП на основе 18βH-ГК. (**А**) Структура цианоенон-содержащих производных 18βH-ГК: СМ и триоксолон метила. (**Б**) Структура амидов солоксолона **1** – **9**. Красным, оранжевым, синим и бирюзовым цветом показаны соответственно цианоеноновая группа, еноновая группа, амидная группа и метиловый эфир, желтым – дополнительная еноновая группа, внесенная в ТМ.

Для нацеливания на ГБ была проведена структурная оптимизация СМ с заменой метилового эфира в положении С-30 на амидные группы различной структуры (Рис. 6Б). Получившиеся в результате 12 амидов солоксолона демонстрировали сопоставимый с СМ уровень цитотоксичности в отношении опухолевых клеток [17]. Хемоинформатический анализ показал, что СМ имеет низкую вероятность прохождения через ГЭБ [17], как и его структурный аналог CDDO-Me [293]. Напротив, для 9 амидов солоксолона была предсказана высокая оценка проникновения через ГЭБ, сопоставимая с таковой для одобренного анти-ГБ препарата TMZ или превышающая ее. Амиды солоксолона, как и СМ, обладают выраженной цитотоксичностью в отношении клеток ГБ (IC_{50} = 1,5 – 7,0 мкМ). Соединения-лидер **9** (солоксолон триптамид (СТА)) при семикратном внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг накапливается в мозге мышей до концентрации 490 нг/г. *In vitro* СТА индуцирует митохондриальный путь апоптоза, как и исходное соединение СМ. Аналогично, АФК играют ключевую роль в клеточной гибели, поскольку ингибитор АФК N-ацетил-L-цистеин (NAC) полностью блокирует цитотоксическое действие СТА в отношении клеток ГБ. *In vivo* СТА замедляет рост подкожных ксенографтов ГБ у мышей. Соединение хорошо переносится животными и не оказывает токсического воздействия на основные органы (печень, почки, легкие и др.). Хотя было показано, что СТА снижает миграционную активность и васкулогенную мимикрию (две ключевые характеристики, связанные с мезенхимальным фенотипом клеток ГБ), его влияние на ПМП не изучалось [17].

При планировании дальнейших исследований по расшифровке эффектов амидов солоксолона на фенотипическую пластичность клеток ГБ стоит учитывать ограничения предыдущих работ. Во-первых, способность CDDO-Me подавлять мезенхимальный фенотип клеток ГБ была показана лишь при стандартных условиях культивирования в отсутствие индукторов ПМП (базальный ПМП статус). Тем не менее известно, что процесс ПМП значительно усиливается факторами микроокружения, включая ростовые факторы, гипокию, воспаление и изменения механических свойств ВКМ (см. п. 1.1.8.1), что определяет необходимость исследования анти-ПМП активности молекул на фоне действия таких факторов [278]. Во-вторых, анти-ПМП потенциал CDDO-Me рассматривался лишь как способ снижения инвазивности клеток ГБ. Следует, однако, помнить, что ПМП также вовлечен в развитие устойчивости клеток ГБ к TMZ через усиление стволовых свойств (см. п. 1.1.8.1), что необходимо учитывать при исследовании анти-ПМП активности амидов солоксолона. В-третьих, исследование CDDO-Me ограничивалось анализом его влияния на фенотипические проявления ЭМП и ПМП без оценки активности сигнальных компонентов этих процессов. Анализ активности сигнальных путей ПМП на фоне действия амидов солоксолона позволит значительно продвинуться в понимании молекулярного механизма противоопухолевого действия цианоенон-несущих тритерпеноидов.

1.2.3. Перепрофилирование лекарственных агентов для ингибирования ЭМП и пронейрально-мезенхимального перехода (ПМП) опухолевых клеток

ЭМП-ориентированное перепрофилирование молекул основывается на скрининге ингибирующей активности библиотек одобренных и экспериментальных лекарственных средств в отношении ЭМП опухолевых клеток. Подобный метод широко применяется в современной фармацевтике, поскольку позволяет экономить время и ресурсы, необходимые для разработки лекарственных препаратов *de novo* [297].

1.2.3.1. Перепрофилирование лекарственных агентов на основе молекулярного моделирования

В исследованиях по перепрофилированию широко применяется молекулярный докинг для моделирования взаимодействия лекарственных агентов с белками-регуляторами ЭМП. Например, Рен и коллеги оценили взаимодействия SNAI1 примерно с 200 лекарственными препаратами, одобренными Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA), выбрав 10 лидерных соединений, способных связываться с консервативным остатком Arg174, и валидировали активность одного из них, антибиотика триметоприма, в условиях *in vitro* и *in vivo*. По данным биослойной интерферометрии,

триметоприм образует прочное взаимодействие с SNAI1 через Arg174. Он подавляет ацетилирование SNAI1, осуществляемое CBP/p300, и тем самым направляет его на убиквитин-зависимую деградацию, что приводит к ингибированию ЭМП клеток КР и РМЖ: подавлению миграции, повышению уровня CDH1 и снижению уровней CDH2, VIM и FN1 на уровне белка. В мышиной модели триметоприм подавляет рост подкожных ксенографтов КР и РМЖ и их метастазирование в печень и легкие соответственно, снижая представленность SNAI1 в опухолевой ткани [298].

Аналогичный подход был использован Нанди и коллегами, выполнившими молекулярный докинг шаперона HSP27, участвующего в активации MMP2/9, с 7008 лекарственными препаратами, одобренными FDA, в результате чего были установлены 5 лидерных соединений с наименьшими энергиями связывания. Среди них пароксетин (антидепрессант) образовывал наиболее стабильный комплекс с HSP27 при исследовании методом молекулярной динамики. Пароксетин ингибирует взаимодействие HSP27 и MMP2/9 в клетках ГБ, подавляя в них характеристики, связанные с ПМП: миграцию и уровни белков VIM, SNAI1 и MMP2/9. Кроме того, соединение замедляет рост подкожных ксенографтов ГБ у крыс, снижая уровень белков HSP27 и MMP2/9 в опухолевой ткани [299].

1.2.3.2. Перепрофилирование лекарственных препаратов с использованием репортерных клеток

Генно-инженерные системы также применяются для скрининга анти-ЭМП активности лекарственных препаратов. Например, Йонкхере и коллеги разработали синтетическую генную конструкцию, включающую индуктор и сенсор ЭМП. Индуктором ЭМП является вектор, экспрессирующий ген *ZEB1* при добавлении к клеткам DOX. Сенсор ЭМП содержит промоторы генов *CDH1* и *VIM*, с которых экспрессируются гены, кодирующие химерные белки люцифераза *Renilla*–GFP и люцифераза сверчка–tdTomato соответственно. Добавление к клеткам DOX индуцирует в них ЭМП через ZEB1, в результате чего снижается экспрессия *CDH1* и повышается *VIM*, что можно детектировать по изменению флуоресценции и люминесценции. С помощью этой системы оценили способность 2745 одобренных и экспериментальных лекарственных препаратов ингибировать ЭМП в созданных репортерных клетках, в результате чего был выявлен новый ингибитор ЭМП RepSox (ингибитор TβRI). Показано, что RepSox ингибирует экспрессию *VIM* и *FN1* и стимулирует экспрессию *CDH1* и *OCLN* в опухолевых клетках, снижая их миграцинную и инвазивную активности. На модели опухолей кишечника ApcRas у *Drosophila melanogaster* показано, что терапия RepSox снижает количество циркулирующих опухолевых клеток в гемолимфе, что указывает на его антиметастатический эффект [300].

1.2.3.3. Перепрофилирование лекарственных препаратов с использованием транскриптомных данных

Помимо молекулярного моделирования и генно-инженерного подхода, перепрофилирование лекарственных препаратов может быть выполнено на основе транскриптомного анализа. В частности, анализ ЭМП-ассоциированных наборов генов (генных сигнатур) с помощью метода connectivity map может быть использован для выявления новых ингибиторов ЭМП (Рис. 7). Такой анализ включает два этапа, на первом из которых выявляют генные сигнатуры, дифференциально экспрессированные при индукции ЭМП. На втором этапе выявленные генные сигнатуры сравнивают с транскриптомами опухолевых клеток, стимулированных различными лекарственными препаратами, после чего определяют соединения, смещающие экспрессию генных сигнатур в противоположную сторону (т.е. подавляют up- и активируют down-регулированные гены).

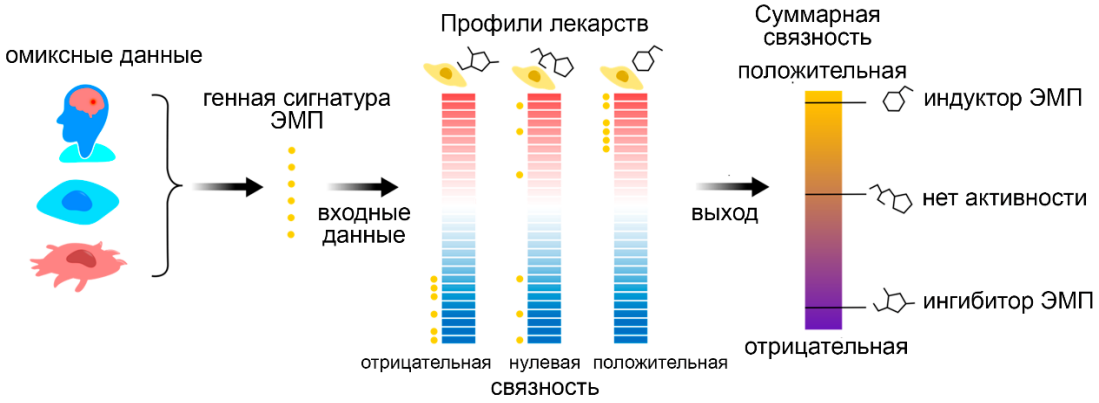

Рисунок 7. Схематическое представление перепрофилирования лекарств для нахождения ингибитором ЭМП с помощью метода connectivity map.

Субраманианом и коллегами были получены транскриптомные профили опухолевых клеток, обработанных свыше 19000 низкомолекулярных соединений, и загружены в базу данных CMap. Основываясь на этой базе данных, веб-плафторма CLUE позволяет сравнивать генные сигнатуры, связанные с биологическими процессами (например, ЭМП), с транскриптомными профилями соединений из CMap (connectivity map анализ). В результате для каждого соединения рассчитывается стандартизованный показатель связности тау (τ), который указывает, является ли оно индуктором ($\tau > 90$) или ингибитором анализируемого процесса ($\tau < -90$) [301]. Иллюстрацией успешного применения connectivity map анализа в поиске новых ингибиторов ЭМП является работа Река и коллег [30]. В ней исследователи определили гены, изменяющие экспрессию в клетках АЛ A549 при их индукции TGF-β в течение 0,5 – 2 ч, и сравнили их с профилями 164 соединений из CMap, в результате чего был выявлен 21 потенциальный ингибитор ЭМП. Для рапамицина (ингибитора mTOR), 17-AAG (ингибитора HSP90) и LY294002

(ингибитора PI3K) были проведены верификационные испытания *in vitro*, показавшие их способность ингибировать индуцируемые TGF-β морфологические изменения, образование стресс-фибрилл, миграцию, инвазию и продукцию белков CDH2, VIM и CDH1 в клетках АЛ. Интересно, что хотя все три соединения снижают транскрипционную активность комплекса SMAD, только рапамицин и 17-AAG блокируют фосфорилирование SMAD2/3 в ответ на действие TGF-β, что указывает на вовлечение альтернативного сигналинга в анти-ЭМП эффект LY294002 [30]. Ян и коллеги установили, что аденилат киназа 4 (AK4) опосредует ЭМП клеток НМРЛ в условиях гипоксии через подавление гидроксилирования и повышение стабильности HIF-1α. Гены, дифференциально изменяющие экспрессию при эктопической экспрессии *AK4* в клетках АЛ, были использованы для connectivity map анализа, в результате чего были выявлены 6 лидерных соединений. Среди них витаферин-А (противовоспалительный стероидный лактон, выделенный из *Withania somnifera*), ланатозид-С и дигоксин (сердечные гликозиды из *Digitalis lanata*) показали антиинвазивную активность *in vitro*, а витаферин-А – ингибирующий эффект на рост и метастазирование в печень ортотопических ксенографтов АЛ *in vivo* [29].

В работах Бхатия и коллег [302] и Ян и коллег [303] метод *in silico* перепрофилирования был использован не для прямой идентификации новых анти-ЭМП агентов, а для поиска лекарственных препаратов, позволяющих преодолеть ЭМП-ассоциированную химиорезистентность опухолевых клеток.

Бхатия и коллеги собрали генную сигнатуру ЭМП-индуцированной химиорезистентности. Для этого клетки заражали лентивирусными короткими шпилечными РНК (кшРНК), направленными на 1677 ген, ассоциированный с ЭМП, после чего стимулировали DOX, проводили секвенирование и определяли резистентность-ассоциированные гены по истощению их целевых кшРНК (из-за гибели клеток). Идентифицированные гены сравнили с профилями в CMap, в результате чего было установлено 48 соединений с отрицательной связностью. Среди них SB525334 (ингибитор TGFBR) и RITA (ингибитор MDM) повышают цитотоксический эффект DOX в отношении клеток РМЖ *in vitro* [302].

Ян и коллеги провели высокоразмерный анализ взвешенной сети корреляции генов (high-dimensional weighted gene correlation network analysis, hdWGCNA) на основе данных scRNA-seq образцов опухолей пациентов с ГБ, выявив кластер генов «модуль 1», специфично экспрессирующийся в клетках с мезенхимальным фенотипом. Дальнейшее перепрофилирование было выполнено с использованием базы данных GDSC2, содержащей информацию о жизнеспособности клеток и изменениях экспрессии их генов в ответ на обработку 198 препаратами. Клетки из набора данных scRNA-seq разделили на группы с высоким и низким обогащением «модуля 1» и рассчитали усредненные профили экспрессии для каждой группы с

помощью метода pseudobulk. Затем с помощью гребневой регрессии (ridge regression) и обучающей выборки на основе данных GDSC2 было выявлено 13 соединений, к которым были чувствительны клетки с высоким, но не низким, уровнем обогащения «модуля 1». Дальнейшая приоритизация с применением алгоритма Beyondcell, который идентифицирует чувствительные к лекарствам клетки в данных scRNA-seq, выявила два лидерных соединения – дазатиниб и траметиниб, используемые для лечения лейкемии и меланомы соответственно. Их высокое цитотоксическое действие на мезенхимальные клетки ГБ было продемонстрировано *in vitro* [303], но необходимы дальнейшие исследования для подтверждения их влияния на инвазивные и стволовые характеристики опухолевых клеток.

1.2.3.4. Перепрофилирование лекарственных препаратов на основе данных о молекулярном патогенезе ГБ

В доклинических исследованиях ГБ были предприняты попытки перепрофилирования лекарственных препаратов, основанные на ключевых молекулярных особенностях данной опухоли. В качестве успешных мишеней для перепрофилирования, подтвердивших свою эффективность в отношении ГБ, можно привести следующие примеры.

- В 78% случаев ГБ наблюдаются нарушения в сигнальном пути CDK4/6/циклин D/RB, включая делеции *CDKN2A, CDKN2B* и *RB1* или амплификации *CDK4/6*, поэтому Лиангом с коллегами для перепрофилирования был выбран ингибитор CDK4/6 абемациклиб, ранее применявшийся для лечения РМЖ [304]. Установлено, что данное соединение ингибирует стимуляцию экспрессии мезенхимальных генов *FN1, CD44* и *TGFB1* в клетках ГБ под действием TGF-β1. Оно также снижает стволовые характеристики клеток ГБ, включая сфероидообразование, самообновление и экспрессию *CD133, NES* и *S100A4*, за счет подавления сигнального пути GSK3β/CREB. Выраженный анти-ГБ эффект абемациклиба был подтвержден на модели ксенографтов ГБ в мозге мышей, где соединение подавляло рост опухоли, уменьшая в них представленность CD44-положительных клеток и уровень фосфорилованной формы GSK3β [304].
- Опухоли ГБ могут переключать метаболизм между гликолизом и окислительным фосфорилированием, поэтому актуальным является блокирование гликолиза с помощью 2-дезоксиглюкозы и ее комбинация с мультитаргетным препаратом метформином, подавляющим независимые от гликолиза пути выживания клеток [305]. Установлено, что метформин ингибирует ПМП и усиление стволовых свойств клеток ГБ, стимулированных TGF-β1, через подавление AKT/mTOR сигнальной оси [306]. Комбинация метформина с 2-дезоксиглюкозой подавляет мезенхимальный и

стволовой фенотип в сфероидных культурах ГБ, а в ортотопической модели ГБ достоверно увеличивает выживаемость животных-опухоленосителей [305].

- Глобальные перестройки хроматина играют важную роль в опухолевой прогрессии, и предполагается, что на этот процесс можно повлиять посредством ингибирования HDAC вальпроевой кислотой, которая используется для терапии эпилепсии, биполярного расстройства и мигрени [307,308]. Показано, что вальпроевая кислота эффективно подавляет миграцию, инвазию, сфероидный рост и экспрессию генов-маркеров мезенхимального и стволового фенотипа в ГСК [307,308].
- Сигнальный путь NF-κB регулирует приобретение клетками ГБ устойчивости к TMZ, но он может быть подавлен β-лапахоном, находящимся на II фазе клинических испытаний как терапия РПЖ [309]. Установлено, что β-лапахон подавляет мезенхимальный фенотип клеток ГБ: снижает миграцию, инвазию и уровни VIM, ZEB1 и SNAI1, повышает уровни CDH1 и TJP1 и улучшает чувствительность клеток ГБ к TMZ. В ортотопической мышиной модели ГБ комбинация β-лапахона с TMZ уменьшает опухолевый рост и улучшает выживаемость [309].

Некоторые соединения были перепрофилированы на ГБ благодаря ранее продемонстрированной биологической активности, зачастую не связанной напрямую с патогенезом ГБ. В частности, для пенфлуридола, применяемого в терапии шизофрении, и ресвератрола, перспективного противовоспалительного агента, была показана способность проникать через ГЭБ [310,311]. В работе Ким с коллегами установлено, что пенфлуридол замедляет рост ортотопических ксенографтов ГБ, улучшая выживаемость мышей-опухоленосителей, как отдельно, так и в комбинации с TMZ [311]. Ресвератрол ингибирует TGF-β1-индуцированный ПМП клеток ГБ за счет снижения активации SMAD2/3 [312], а также подавляет WNT/β-катениновый путь в ГСК, приводя к ослаблению мезенхимального фенотипа ГСК, включая их миграцию, инвазию и уровни TWIST1 и SNAI1 [310].

Противопаразитарные препараты пиронаридин и никлозамид оказались эффективны в подавлении инвазивной активности и экспрессии мезенхимальных генов в клетках ГБ при использовании в монорежиме и в комбинации с TMZ [313,314]. Комбинация никлозамида и TMZ снижала скорость роста опухолей и увеличивала выживаемость животных в ортотопической модели ГБ [314].

Таким образом, перепрофилирование является мощной альтернативой разработке ингибиторов ЭМП и ПМП *de novo*. Современные исследования в этой области включают скрининг библиотек из сотен и тысяч лекарственных препаратов. Генно-инженерные клеточные системы, упрощающие определение ЭМП-фенотипа клеток, доказали свою эффективность в

решении этой задачи [300]. Вычислительные методы используются для фильтрации молекул, наиболее вероятно являющихся ингибиторами ЭМП, перед тестированием их активности *in vitro*. Белки-регуляторы ЭМП, для которых получены кристаллические структуры, используют для моделирования их взаимодействия с кандидатами для перепрофилирования с помощью молекулярного докинга и молекулярной динамики [298,299]. Помимо этого, поиск отрицательных ассоциаций между транскриптомом клеток, подвергающихся ЭМП, и экспрессионным профилем клеток, стимулированных лекарственными препаратами, также позволяет выявлять новые блокаторы фенотипической пластичности опухолевых клеток [29,30,302]. Хотя все эти методы широко используются и демонстрируют высокую эффективность в поиске ингибиторов ЭМП клеток карцином, они практически не применялись для поиска ингибиторов ПМП клеток ГБ [299,303], что делает адаптацию этих подходов к ПМП актуальной задачей. В основном способность ингибировать отдельные параметры ПМП была показана для препаратов, перепрофилированных для лечения ГБ на основе их благоприятных фармакологических свойств [304–314]. Применение системного *in silico* подхода к поиску препаратов с анти-ПМП активностью может стать следующим шагом в развитии данной области исследований. Накопленные данные о молекулярных механизмах регуляции ПМП и транскрипционных изменениях, происходящих в ходе этого процесса (см. п. 1.1.8.1), создают информационную основу для перепрофилирования лекарственных препаратов с помощью методов компьютерной биологии и хемоинформатики.

Заключение

Опухолевое микроокружение, включая ростовые факторы, гипоксию, повышение жесткости ВКМ и воспаление, индуцирует ЭМП эпителиальных опухолевых клеток. В неэпителиальных опухолях аналогичные условиях стимулируют специфические разновидности этого процесса – в частности, НМП и ПМП клеток НБ и ГБ соответственно. Приобретение опухолевыми клетками мезенхимального фенотипа связано с повышением их миграционных, инвазивных и стволовых характеристик, что вносит значительный вклад в ключевые этапы опухолевой прогрессии: инициацию опухоли, метастазирование, приобретение лекарственной устойчивости и рецидивирование. Следовательно, ингибирование ЭМП и подобных ему процессов (НМП и ПМП) является перспективной стратегией терапевтического воздействия на опухоли различного гистогенеза.

Ингибиторы сигнальных путей ЭМП эффективно подавляют опухолевую прогрессию в доклинических исследованиях, однако в клинических испытаниях их эффективность оказалась весьма ограниченной. Ключевой задачей будущих исследований является поиск новых белков-мишеней для селективных ингибиторов ЭМП; среди перспективных кандидатов – внеклеточные

протеазы семейства ADAMTS и гормон жировой ткани лептин. Хотя способность этих молекул стимулировать ЭМП подтверждена в ряде работ, слабо изученными остаются: (а) молекулярные механизмы их действия и регуляции; (б) тканевой контекст, в котором индуцируемый ими ЭМП вносит решающий вклад в опухолевую прогрессию. Расшифровка данных аспектов биологии ADAMTS и лептина обеспечит надежную основу для разработки ингибиторов, нацеленных на данные молекулы.

Фенотипический скрининг незаменим при поиске эффективных ингибиторов мезенхимальных переходов опухолевых клеток. При разработке ингибиторов ПМП ключевым фактором является не только биологическая активность соединений, но и их способность проникать через ГЭБ. В этом контексте интересную терапевтическую возможность предоставляют амиды солоксолона, способные эффективно накапливаться в тканях мозга экспериментальных животных. Ранее было показано, что структурно сходные представители класса пентациклических тритерпеноидов эффективно блокируют ЭМП опухолевых клеток. Поскольку молекулярные мишени амидов солоксолона, относящиеся к регулому ПМП, пока неизвестны, фенотип-ориентированный скрининг является наиболее рациональным подходом для оценки их ПМП-модулирующих свойств.

Перепрофилирование является экономически эффективной альтернативой разработке лекарств *de novo*. В настоящее время поиск ингибиторов ЭМП в библиотеках одобренных и экспериментальных препаратов опирается на генетически модифицированные клеточные системы и вычислительные модели, разработанные на основе знаний о молекулярных механизмах ЭМП. В то же время способность лекарственных агентов подавлять ПМП чаще определяется неспецифическим перепрофилированием, включающем оценку влияния соединений на жизнеспособность и инвазивную активность клеток ГБ. Актуальной задачей будущих исследований является применение данных о молекулярных механизмах ПМП для перепрофилирования. Например, молекулярный докинг может быть использован для поиска соединений, связывающихся с ключевыми белками-регуляторами ПМП, а транскриптомные данные и подходы с использованием connectivity map подхода или базы данных GDSC2 – для идентификации соединений, способных подавлять изменение экспрессионного профиля клеток при ПМП. Более систематическое, ориентированное на молекулярный механизм перепрофилирование ускорит открытие новых ингибиторов ПМП и их внедрение в клиническую практику.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

В работе были использованы: фосфатно-солевой буфер (PBS) (MP Biomedicals, США), культуральные среды IMDM и DMEM (Sigma-Aldrich, США), эмбриональная телячья сыворотка (FBS) (Биолот, Россия), TrypLE (Life Technologies, США), трипановый синий (MP Biomedicals, Франция), раствор антибиотиков-антимикотиков (Central Drug House, Индия); рекомбинантные белки: мышиный лептин и человеческий TGF-β1 (ProSpec-Tany TechnoGene, Израиль), человеческий TNF-α (Sci-Store, Россия); $CoCl_2$ (Sigma-Aldrich), N-ацетил-L-цистеин (NAC) (Zambon, Италия), TMZ (Sigma-Aldrich, США), SP600125 (Abcam, США); диметилсульфоксид (DMSO) (Лаверна, Россия), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (MTT) (Sigma-Aldrich, США); матригель (BD Biosciences, США), коллаген, выделенный из хвоста крысы (Cell Applications, США), кристаллический фиолетовый (Sigma-Aldrich, США), формальдегид (Sigma-Aldrich, США); TRIzol (Ambion, США), изопропанол, этанол, хлороформ (ЭКОС-1, Россия); набор реактивов для обратной транскрипции (ОТ) M-MuLV-RH (Биолабмикс, Россия), набор реактивов для проведения RT-qPCR Биомастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия); буфер RIPA (Servicebio, Китай), буфер Лэммли (Sigma-Aldrich, США), маркер молекулярного веса PageRuler (Thermo Scientific, США); акриламид (Диаэм, Россия); N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (TEMED), трис-(оксиметил)-аминометан (Трис), глицин (ICN, США), персульфат аммония (PSA) и додецилсульфат натрия (SDS) (ICN, США); сухое обезжиренное молоко и поливинилиденфторидная (ПВДФ)-мембрана (Sigma-Aldrich, США); хемилюминесцентный субстрат пероксидазы хрена (HRP) (Abcam, США); Triton X100 (AppliChem, Германия), 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) и Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific, США); набор для детектирования внутриклеточных белков с помощью проточной цитометрии FIX & PERM Cell Permeabilization Kit (Invitrogen, США); наборы реагентов для исследования механизмов клеточной гибели Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit и определения внутриклеточных АФК DCFDA/H_2DCFDA Cellular ROS Assay Kit (Abcam, США); набор реагентов для определения активности ALDH AldeRed ALDH Detection Assay (Sigma-Aldrich, США); набор реагентов для иммуноферментного анализа Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ (Вектор-Бест, Россия); агароза (MP Biomedicals, Франция); Твин-20/80 (neoFroxx, Германия); производные 2-циано-3,12-диоксо-18βH-олеан-9(11),1(2)-диен-30-овой кислоты (далее – солоксолон): метил солоксолон-30-оат (далее – солоксолон метил (СМ)), метил 2-циано-3,12,19-триоксо-олеан-1(2),9(11),13(18)-триен-30-оат (далее – триоксолон метил (ТМ)), N-(2′-

метоксиэтил)-солоксолон-30-амид (далее – **1**), N-(5′-гидроксипентил)-солоксолон-30-амид (далее – **2**), N-(2′-(диметиламино)этил)-солоксолон-30-амид (далее – **3**), N-(3′-(диметиламино)пропил)-солоксолон-30-амид (далее – **4**), N-(4′-бромфенил)-солоксолон-30-амид (далее – **5**), N-(пиридин-3-ил)-солоксолон-30-амид (далее – **6**), N-п-толил-солоксолон-30-амид (далее – **7**, пара-метиланилид солоксолона (пМАС)), N-(3′-(3′′,5′′-ди-трет-бутил-4′′-гидроксифенил)пропил)-солоксолон-30-амид (далее – **8**), N-(2′-(1H-индол-2-ил)-этил)-солоксолон-30-амид (далее – **9**, солоксолон триптамид (СТА)) (ЛФАВ НИОХ СО РАН); первичные антитела (IgG) кролика, направленные против белков мыши и человека, вторичные антитела козы, направленные против IgG кролика (Abcam, США; ABclonal, Китай). Список использованных антител и их концентрации приведены в таблице 1.

Таблица 1. Антитела.

Название	**Производитель (артикул)**	**Мишень**	**Метод**	**Разведение**
Коктейль антител к сигнальным путям AKT/MAPK	Abcam (ab151279)	p-AKT1 (S473), p-RPS6 (S235/236), p-ERK1/2 (Y204/187), p-RKS1 (S380), RAB11	Вестерн-блот	1:250
Первичные антитела к N-кадгерину	Abcam (ab76011)	CDH2	Вестерн-блот	1:2500
Первичные антитела к ламину A/C	ABclonal (A19524)	Ламин A/C	Вестерн-блот	1:10000
Вторичные HRP-конъюгированные антитела	Abcam (ab205718)	IgG кролика	Вестерн-блот	1:5000
Первичные антитела к ZO-1	Abcam (ab216880)	TJP1	Проточная цитометрия	1:100
Первичные антитела к виментину	Abcam (ab92547)	VIM	Проточная цитометрия	1:100
			Иммунофлуоресценция	1:250

Первичные антитела к фибронектину	Abcam (ab2413)	FN1	Проточная цитометрия	1:100
Первичные антитела к NF-kB p65	ABclonal (A2547)	RELA	Иммунофлуоресценция	1:100
Первичные антитела к SMAD2/3	Abcam (ab202445)	SMAD2/3	Иммунофлуоресценция	1:100
Вторичные AlexaFluor 488-конъюгированные антитела	Abcam (ab150077)	IgG кролика	Проточная цитометрия	1:2000
			Иммунофлуоресценция	1:500

2.1.2. Оборудование

В работе были использованы: система очистки воды Milli-Q (Millipore, США); счетчик клеток TP20 (BioRad, Сингапур); ламинар BSB-3A (Gelaire, Франция); CO_2-икубатор (Sanyo, Япония); культуральные флаконы и планшеты TPP (TPP, Щвейцария); многоканальный спектрофотометр Multiscan RC plate reader (Thermo LabSystems, Финляндия); световые микроскопы ZEISS Primo Vert (Zeiss, Германия), EVOS XL Core (Thermo Fisher Scientific, США) и Биолам П2-1 (ЛОМО, Россия); система гель-визуализации iBright 1500 (Thermo Fisher, США); CIM-планшеты и клеточный анализатор в режиме реального времени xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences, США); центрифуги Eppendorf 5810 R, 5415 R и minispin plus (Eppendorf, Германия); ПЦР-бокс для очистки ДНК/РНК с помощью УФ-излучения UVC/T-M-AR (BioSan, Латвия), спектрофотометр NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, США), амплификатор Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad, США); шейкеры MixMate (Eppendorf, Германия) и ST-3L (ELMI, Латвия); электрофорезная вертикальная камера Mini-Protean Tetra, система для электропереноса Criterion Blotter и источник питания для электрофореза PowerPac HV (Bio-Rad, США); конфокальный микроскоп LSM710 и флуоресцентный микроскоп Axiostar Plus (Zeiss, Германия); проточный цитометр NovoCyte (ACEA Biosciences, США).

2.1.3. Буферы и растворы

Для приготовления всех буферных растворов использовали ультрачистую деионизированную воду (ДИ-воду), полученную с помощью системы MilliQ. Все буферы

стерилизовали фильтрованием через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. Состав использованных буферов приведен в таблице 2.

Таблица 2. Буферы и растворы.

Название	Состав
Буфер PBS	1,5 мМ KH_2PO_4, 8,1 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl (pH 7,4)
Буфер RIPA	25 мМ Трис (pH 7,6), 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS
Буфер Лэммли	4% SDS, 20% глицерин, 10% 2-меркаптоэтанол, 0,004% бромфеноловый синий и 0,125 М Трис-HCl (pH 6,8).
Буфер TGB	25 мМ Трис (pH 8,3), 0,25 М глицин, 0,1% SDS
Буфер TS	25 мМ Трис (pH 8,3), 194 мМ глицин, 0,1% SDS, 10% этанол
Буфер WB	1,5 мМ KH_2PO_4, 8,1 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl (pH 7,4), 0,1% Твин-20
Буфер SB_{WB}	1,5 мМ KH_2PO_4, 8,1 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl (pH 7,4), 0,1% Твин-20, 2,5% сухое молоко
Буфер PB	1,5 мМ KH_2PO_4, 8,1 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl (pH 7,4), 5 мг/мл БСА, 0,1% Triton X100
Буфер SB_{IF}	1,5 мМ KH_2PO_4, 8,1 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl (pH 7,4), 5 мг/мл БСА
Буфер SB_{FC}	1,5 мМ KH_2PO_4, 8,1 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl (pH 7,4), 2% FBS
Буфер WB_{FC}	1,5 мМ KH_2PO_4, 8,1 мМ Na_2HPO_4, 2,7 мМ KCl, 137 мМ NaCl (pH 7,4), 5% FBS
ОТ-буфер-mix	50 мМ Трис (pH 8,3), 50 мМ KCl, 4 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ каждого dNTP, 10 мМ дитиотриэтола
Биомастер HS-qPCR SYBR Blue	50 мМ Трис (pH 8,5), 50 мМ KCl, 0,2 мМ каждого dNTP, 1,5 мМ $MgCl_2$, 30 ЕД/мл *Taq* ДНК-полимераза, 0,0125% Твин-20, SYBR Green I и инертный краситель

2.1.4. Праймеры для PCR

Для синтеза первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) в реакции обратной транскрипции использовали олиго$(dT)_{18}$ праймер, а для оценки уровня экспрессии генов с помощью RT-qPCR – ген-специфические праймеры, последовательности которых приведены в таблице 3. Все праймеры синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН.

Таблица 3. Последовательности праймеров для RT-qPCR.

Ген	**Прямой праймер (5'-3')**	**Обратный праймер (5'-3')**
CDH2	GCTACTTTCCTTGCTTCTG	GAGGTAACACTTGAGGG
FN1	CCACTTCCCCTTCCTATAC	TCCCACTGATCTCCAATG
SNAI2	GGAATATGTGAGCCTGG	TGACCTGTCTGCAAATG
OLIG2	AGCTCCTCAAATCGCATCC	AAAAAGGTCATCGGGCTCTG
ADAMTS6	AAACGGTATCGCTCCTGTAAC	GTTTTACCCCACCTCCAGTATAG
CDH1	CCAGAATAAAGACCAAGTGAC	CCAAGAATCCCCAGAATGGCAGGAAT
TWIST1	GTACATCGACTTCCTCTAC	CAATGACATCTAGGTCTCC
PLAUR	ACAACGACACCTTCCACTTC	GGCAGATTTTCAAGCTCCAG
IL1B	AGATGATAAGCCCACTCTACAG	ACATTCAGCACAGGACTCTC
IL6	CCACTCACCTCTTCAGAACG	CATCTTTGGAAGGTTCAGGTTG
TGFB1	GCCTTTCCTGCTTCTCATGG	TCCTTGCGGAAGTCAATGTAC
GAPDH	GTGAAGGTCGGAGTCAAC	TGGAATTTGCCATGGGTG
HPRT	TATGGCGACCCGCAGCCCT	CATCTCGAGCAAGACGTTCAG

2.1.5. Культуры клеток

Культуры клеток мыши (меланомы B16, НБ Neuro2a, ГБ EPNT-5) и человека (АЛ A549, ГБ U87 и U118) были получены из Российской коллекции клеточных культур (Санкт-Петербург, Россия). Клетки ГБ мыши GL261 и фибробласты крайней плоти человека hFF3 были любезно предоставлены к.б.н. Степаненко А. А. (Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского, Москва, Россия) и д.б.н. Коваль О. А. (ИХБФМ СО РАН) соответственно. Клетки A549, нокаутные по гену *ADAMTS6*, были получены в ЛГР ИХБФМ СО РАН м.н.с. Матвеевой А. М. под руководством к.х.н. Степанова Г. А.

2.1.6. Культивирование клеток

Клетки hFF3 культивировали в питательной среде IMDM, остальные клетки – в питательной среде DMEM; к клеткам добавляли 10% FBS и 1% раствора антибиотиков-антимикотиков (100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина B) и инкубировали

при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 (далее – стандартные условия). При культивировании каждые 3 – 4 дня клетки пересевали в кратности рассева 1:3 – 1:6 для поддержания оптимальной плотности, указанной в паспорте клеточной культуры. Для открепления клеток от подложки из культурального флакона удаляли питательную среду, клетки промывали PBS и инкубировали с 100 мкл TrypLE (рекомбинантного аналога трипсина) в течение 5 мин в стандартных условиях, после чего ресуспендировали в 1 – 2 мл питательной среды с добавлением 10% FBS. Для подсчета живых клеток отбирали 10 мкл клеточной суспензии, добавляли 0,2% трипановый синий, перемешивали и помещали в счетчик клеток TP20 в специализированном слайде.

2.1.7. Лабораторные животные

В работе использовали самок мышей C57Bl/6 в возрасте 10 – 14 недель (20 – 24 г) и самок мышей Nude в возрасте 6 – 8 недель (22 – 24 г), полученных из вивария ИХБФМ СО РАН и SPF-вивария Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия) соответственно. Мышей C57Bl/6 содержали по 10 особей в клетке, мышей Nude – по 5 – 6 особей, в условиях SPF-вивария. Животные содержались при стандартном световом режиме в условиях контролируемой температуры и имели свободный доступ к еде и воде. Протоколы экспериментов были одобрены Комитетом по этике ИЦИГ СО РАН (протокол № 56 от 10 августа 2019 г.).

2.1.8. Используемые данные

В работе использовали ранее опубликованные наборы данных кДНК-микрочипов, RNA-seq и scRNA-seq из баз данных Gene Expression Omnibus (GEO), Атласа ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и Китайского атласа генома глиомы (Chinese Glioma Genome Atlas, CGGA). Описание наборов данных приведено в таблице 4.

Таблица 4. Характеристики транскриптомных наборов данных, использованных в работе.

№	База данных	Идентификатор (ID)	Тип	Описание
1	TCGA	TCGA-LUAD	RNA-seq	Транскриптомные профили и информация о выживаемости 468 пациентов с АЛ.
2	TCGA	TCGA-GBM	RNA-seq	Транскриптомные профили и информация о выживаемости 168 пациентов с ГБ.
3	CGGA	mRNAseq_693, mRNAseq_325	RNA-seq	Транскриптомные профили и информация о выживаемости 218 пациентов с ГБ.

4	GEO	GSE16011	Микрочип	Транскриптомные профили и информация о выживаемости 155 пациентов с ГБ.
5	GEO	GSE192710	RNA-seq	Сравнение клеток G7 мезенхимального подтипа ГБ и клеток E2 пронейрального подтипа ГБ.
6	GEO	GSE79235	Микрочип	Сравнение клеток H358, индуцированных TGF-β1 (4 нг/мл) в течение 2 недель, и неиндуцированных клеток H358.
7	GEO	GSE49644	Микрочип	Сравнение клеток H358, индуцированных TGF-β1 (2 нг/мл) в течение 3 недель, и неиндуцированных клеток H358.
8	GEO	GSE114761	Микрочип	Сравнение клеток A549, индуцированных TGF-β1 (5 нг/мл) в течение 24 – 120 ч, и неиндуцированных клеток A549.
9	GEO	GSE123031	Микрочип	Сравнение клеток HCC827, индуцированных TGF-β1 (10 нг/мл) в течение 72 ч, и неиндуцированных клеток HCC827.
10	GEO	GSE277168	Микрочип	Сравнение клеток A549, индуцированных TGF-β1 (5 нг/мл) в течение 48 ч, и неиндуцированных клеток A549.
				Сравнение клеток A549 с CRISPR/Cas9-индуцированной мутацией *SMAD2*, индуцированных TGF-β1 (5 нг/мл), и контрольных клеток A549, индуцированных TGF-β1 (5 нг/мл), через 48 ч.
11	GEO	GSE197132	RNA-seq	Сравнение клеток A549, индуцированных TGF-β1 (10 нг/мл) в течение 48 ч, и неиндуцированных клеток A549.
				Сравнение клеток A549, индуцированных комбинацией TGF-β1 (10 нг/мл) и ацетата натрия (40 нМ), и клеток A549,

				индуцированных только TGF-β1 (10 нг/мл), через 48 ч.
12	GEO	GSE142620	RNA-seq	Сравнение клеток A549, индуцированных IL-1β (1 нг/мл) в течение 15 дней, и неиндуцированных клеток A549.
13	GEO	GSE32254	Микрочип	Сравнение клеток A549, индуцированных TNF-α (20 нг/мл) в течение 24 ч, и неиндуцированных клеток A549.
14	GEO	GSE79688	RNA-seq	Сравнение гефитиниб-резистентных клеток HCC4006, культивированных в среде с гефитинибом (3 мкМ), и контрольных клеток HCC4006, культивированных в DMSO.
15	GEO	GSE62359	RNA-seq	В клетках H1993 ЭМП индуцировали путем нокдауна *BRMS1* с помощью коротких шпилечных РНК (кшРНК). Сравнение *BRMS1*-дефицитных клеток H1993 и *BRMS1*-дефицитных клеток H1993 с кшРНК-индуцированным нокдауном *TWIST1*.
16	GEO	GSE131594	RNA-seq	Сравнение клеток PC9, индуцированных комбинацией осимертиниба (100 нМ) и траметиниба (30 нМ) в течение 2 недель, и контрольных клеток PC9, индуцированных DMSO.
17	GEO	GSE232714	RNA-seq	Сравнение клеток A549, в которых экспрессия *RAVER1* подавлена с помощью малой интерферирующей РНК (миРНК), с клетками A549, в которые вводили нецелевую контрольную миРНК (siC).
18	GEO	GSE147405	scRNA-seq	Клетки A549 через 0 – 7 дней индукции TGF-β1 (10 нг/мл), а также через 0 – 3 дня после удаления TGF-β1 (10 нг/мл) из среды.

2.1.9. Программное обеспечение

Для обработки полученных результатов использовали следующее специальное программное обеспечение: язык программирования R (v4.4.2) и среда разработки RStudio (v2024.12.1), ряд пакетов R для анализа и статистической обработки данных (названия пакетов и их версии указаны в тексте по мере описания соответствующих методов); программа для статистического анализа GraphPad Prism (v8.0.1); программная среда для построения генных сетей Cytoscape (v3.10.3), ее плагины STRING (v2.2.0) и cytoHubba (v0.1); программа для анализа биологических изображений ImageJ (v2.14.0); программа для анализа данных xCELLigence RTCA Software (v2.0); программа для анализа данных RT-qPCR Bio-Rad CFX Manager (v3.1); программа для анализа данных проточной цитометрии NovoExpress (v1.5.6); программы для анализа данных конфокальной микроскопии ZEN Black Edition Software (v8.1) и CellProfiler (v4.2.6); программы для подготовки белков и лигандов и проведения моделирования с помощью молекулярного докинга: Discovery Studio Visualizer (v21.1.0), AutoDock Tools (v1.5.7), MarvinSketch (v22.1), Avogadro (v1.2.0), AutoDock Vina (v1.2.5) и UCSF ChimeraX (v1.7.1); визуализация данных выполнена с помощью пакетов R: corrplot (v0.95), ggplot2 (v4.0.0), ComplexHeatmap (v2.22.0), ggvenn (v0.1.10), networkD3 (v0.4.1) и plotly (v4.11.0), а также графических редакторов Adobe Photoshop CC (v20.0.4) и Inkscape (v1.2.2).

В работе использовали данные и алгоритмы статистического анализа из интернет-ресурсов: Genomic Data Commons (GDC) (https://portal.gdc.cancer.gov), CGGA (https://www.cgga.org.cn/), GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), GEPIA2 (http://gepia2.cancer-pku.cn/), KMplotter (https://kmplot.com/analysis/), CLUE (https://clue.io/), AlzPlatform (https://www.cbligand.org/AD/), PreADMET (https://preadmet.qsarhub.com/), Vienna LiverTox Workspace (https://livertox.univie.ac.at/), SwissADME (https://www.swissadme.ch/), ADMETlab (https://admet.scbdd.com/), GenCLiP3 (http://cismu.net/genclip3/analysis.php), SynergyFinder+ (https://www.synergyfinderplus.org/), RCSB Protein Data Bank (PDB) (https://www.rcsb.org/). Даты обращения к этим ресурсам указаны в тексте по мере описания соответствующих методов.

2.2. Методы

2.2.1. Анализ жизнеспособности клеток

Клетки высевали в 96-луночные планшеты в четырех повторах в 100 мкл питательной среды с добавлением 10% FBS и культивировали 12 ч в стандартных условиях для прикрепления к субстрату, которое подтверждали микроскопически. Исследуемые соединения растворяли в DMSO (10^{-2} M) и разводили в бессывороточной питательной среде до необходимых концентраций (таблица 5). Затем питательную среду над клетками заменяли на свежую с

добавлением исследуемых соединений. Если объёмная доля DMSO превышала 1% (порог цитотоксичности, определенный в предыдущих работах [315]), использовали отдельную группу сравнения, в которую добавляли среду с соответствующим объёмом DMSO без соединения; нормализация на данную группу позволяла снизить влияние цитотоксичности DMSO на интерпретацию результатов. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые в бессывороточной среде в отсутствие соединений. После 24 – 72 часов инкубации (таблица 5) добавляли раствор МТТ до конечной концентрации 0,5 мг/мл, и клетки инкубировали еще 2 ч в стандартных условиях. Далее среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в 100 мкл DMSO, после чего измеряли оптическую плотность на длине волны 570 нм (референтная длина волны – 620 нм) с помощью многоканального спектрофотометра Multiscan RC plate reader. Жизнеспособность рассчитывали путем нормализации оптической плотности в экспериментальных лунках на оптическую плотность контрольной группы. Значения IC_{50} (концентрация, снижающая жизнеспособность клеток на 50%) определяли методом нелинейной регрессии в программе GraphPad Prism.

Таблица 5. Экспериментальные условия, при которых оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста.

Клетки	**Плотность (клеток/мл)**	**Время (ч)**	**Соединения (концентрация)**
A549	10^5	48	СМ, ТМ (0,06 – 1 мкМ)
B16	2×10^5		
Neuro2a	$1{,}1 \times 10^5$	48	СМ (0,1 – 0,4 мкМ)
U87	10^5	48	Амиды солоксолона **1** – **9** (25 – 2400 нМ)
hFF3			пМАС (50 – 400 нМ)
A549, AD6-KO	10^5	24, 48	нет
		72	DOX (0,5 – 4 мкМ)
U87, U118, GL261, EPNT-5, hFF3	10^5	48	SP600125 (2,5 – 100 мкМ)

2.2.2. Анализ фенотипических проявлений ЭМП в опухолевых клетках

Фенотип опухолевых клеток при индукции ЭМП оценивали путем анализа их морфологии, миграции, инвазии, адгезии к другим клеткам и ВКМ, уровней молекулярных маркеров (мРНК и белков) и активации сигнальных путей (таблица 6). Данные характеристики анализировали как в неиндуцированных клетках, так и в клетках, индуцированных TGF-β1, лептином и $CoCl_2$ (индуктором химической гипоксии), – факторами, для которых ранее была показана способность

запускать ЭМП [42,82,244]. При изучении влияния СМ, ТМ, амидов солоксолона **1** – **9** и SP600125 на фенотипические характеристики, связанные с ЭМП, эти соединения добавляли к клеткам в нетоксичных концентрациях (снижающих жизнеспособность менее чем на 10%; таблица 6), чтобы исключить влияние клеточной гибели на интерпретацию результатов.

Таблица 6. Экспериментальные условия, при которых оценивали фенотипические характеристики клеток, ассоциированные с ЭМП.

Клетки	**Характеристики (метод оценки)**	**Предынкубация (время)**	**Инкубация (время)**
B16, A549	Миграция (тест зарастания царапины)	нет	0,5 мкМ СМ/ТМ (24 ч)
A549	Морфология (микроскопия), миграция (тест зарстания царапины, трансвелл), инвазия (трансвелл), экспрессия *CDH1*, *VIM* и *FN1* (RT-qPCR), уровень TJP1 (цитометрия)	нет	10 – 50 нг/мл TGF-β1, 0,5 мкМ СМ (48 ч)
Neuro2a	Морфология (микроскопия), уровни TJP1, VIM и FN1 (цитометрия)	нет	400 нг/мл лептин, 0,1 мкМ СМ (48 ч)
	Миграция (тест зарастания царапины)		200 – 400 нг/мл лептин, 0,1 мкМ СМ (24 ч)
	Адгезия к пластику, матригелю и коллагену (спектрофотометрия)		400 нг/мл лептин, 0,1 мкМ СМ (24 ч)
	Активация путей PI3K/AKT и ERK1/2 (вестерн-блоттинг)	0,1 мкМ СМ (1 ч)	400 нг/мл лептин (30 мин)
U87	Морфологии (микроскопия), межклеточная адгезия (трипсиновый тест)	нет	50 нг/мл TGF-β1; соединения **1**/**3**/**4**, 300 нМ; соединения **2**/**6**/**9**, 100 нМ;

Клетки	**Характеристики (метод оценки)**	**Предынкубация (время)**	**Инкубация (время)**
			соединения **5**/**7**/**8**, 50 нМ (48 ч)
	Адгезия к матригелю (система визуализации iBright 1500), экспрессия *CDH2*, *FN1*, *SNAI2* и *OLIG2* (RT-qPCR)	нет	50 нг/мл TGF-β1, 50 нМ пМАС (48 ч)
	Миграция (трансвелл)	50 нг/мл TGF-β, 50 нМ пМАС (48 ч)	В отсутствие соединений (72 ч)
	Активация пути TGF-β1/SMAD2/3 (иммунофлуоресценция)	50 нМ пМАС (48 ч)	50 нг/мл TGF-β (1 ч)
A549, AD6-KO	Морфология (микроскопия), адгезия к пластику, коллагену и матригелю (спектрофотометрия), экспрессия *CDH1*, *CDH2*, *VIM* и *TWIST1* (RT-qPCR), активация путей TGF-β1/SMAD2/3 и NF-κB (иммунофлуоресценция)	нет	нет
	Миграция (тест зарастания царапины, трансвелл)		В отсутствие соединений (48 ч)
	Инвазия (трансвелл)		В отсутствие соединений (96 ч)
U87	Миграция (тест зарастания царапины)	нет	0,6 – 2,5 мкМ SP600125 (48 ч)

Клетки	**Характеристики (метод оценки)**	**Предынкубация (время)**	**Инкубация (время)**
		20 мкМ SP600125 (30 мин)	В отсутствие соединений (48 ч)
U87	Морфология (микроскопия), экспрессия *FN1*, *CDH2*, *SNAI2*, *PLAUR*, *IL6*, *IL1B* и *TGFB1* (RT-qPCR), уровень CDH2 (вестерн-блоттинг), уровень VIM (иммунофлуоресценция)	20 мкМ SP600125 (30 мин)	50 нг/мл TGF-β (48 ч)
	Миграция (трансвелл)	20 мкМ SP600125 (30 мин), 50 нг/мл TGF-β (48 ч)	В отсутствие соединений (24 ч)
	Морфология (микроскопия), экспрессия *FN1*, *CDH2*, *SNAI2*, *PLAUR*, *IL6*, *IL1B* и *TGFB1* (RT-qPCR), секреция IL-6 (иммуноферментный анализ)	20 мкМ SP600125 (30 мин)	400 мкМ $CoCl_2$ (48 ч)

2.2.3. Оценка морфологии клеток

В лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл клеточной суспензии (5×10^4 клеток/мл) в DMEM, содержащей 10% FBS, и инкубировали в стандартных условиях 12 ч. Затем анализировали морфологию клеток A549 и AD6-KO; в других случаях среду заменяли на бессывороточную с добавлением индукторов ЭМП и лекарственных кандидатов (таблица 6) и инкубировали последующие 48 ч в стандартных условиях, после чего проводили анализ морфологии. Морфологический анализ выполняли с помощью микроскопов ZEISS Primo Vert и EVOS XL Core со встроенными камерами. В каждой лунке анализировали не менее 5 независимых полей микроскопа, не менее 200 клеток в каждой экспериментальной группе. Количественный анализ проводили с помощью программы ImageJ. Определяли площадь клеток и отношение большой оси клеток к малой оси (aspect ratio, AR), выражающее вытянутость клеток. Кроме того, длина нейритов была оценена в клетках Neuro2a: клетки фиксировали 4% формальдегидом, окрашивали 0,1% кристаллическим фиолетовым, фотографировали с помощью

микроскопа ZEISS Primo Vert, а затем длину нейритов оценивали с помощью плагина NeuronJ в ImageJ.

2.2.4. Тест зарастания царапины

В лунки 24-луночного планшета добавляли 500 мкл суспензии клеток A549, AD6-KO, B16 ($2{,}6 \times 10^5$ клеток/мл), Neuro2a (8×10^5 клеток/мл) или U87 (5×10^5 клеток/мл) в DMEM с 10% FBS и культивировали 24 ч в стандартных условиях до образования монослоя с конфлюэнтностью 80%. С помощью наконечника пипетки объемом 10 мкл на клеточном монослое проводили царапину, удаляли питательную среду и промывали лунки PBS для удаления открепившихся клеток. Затем к клеткам добавляли бессывороточную среду, содержащую индукторы ЭМП и соединения-кандидаты (таблица 6), исходя из того, что в отсутствие сыворотки клетки слабо пролиферируют, и царапина зарастает преимущественно за счет миграции клеток из участков неповрежденного монослоя. Клетки инкубировали в стандартных условиях, а зону царапины фотографировали через 0, 24 и 48 ч с помощью микроскопов ZEISS Primo Vert и EVOS XL Core. Миграцию клеток оценивали путем анализа площади царапины в ImageJ и расчета скорости закрытия царапины по формуле:

$$\text{Зарастание царапины (\%)} = \frac{S_0 - S_i}{S_0} \times 100\%,$$

где S_0 – площадь царапины в точке 0 ч, S_i – площадь царапины в точке i (24, 48 ч).

2.2.5. Миграция и инвазия трансвелл

Для оценки миграции и инвазии клеток методом трансвелл использовали систему xCELLigence, состоящую из CIM-планшета и прибора-анализатора RTCA DP. В верхнюю камеру CIM-планшета добавляли 150 мкл суспензии клеток A549, AD6-KO ($1{,}3 \times 10^5$ клеток/мл) и U87 ($1{,}7 – 3{,}3 \times 10^5$ клеток/мл) в DMEM. К клеткам A549 в среду добавляли TGF-β и CM; клетки U87 предынкубировали с TGF-β и пMAC/SP600125, после чего вносили в CIM-планшеты, где инкубировали в отсутствие TGF-β и соединений (подробнее см. таблицу 6). В нижнюю камеру CIM-планшета вносили 160 мкл среды DMEM с 10% FBS в качестве хемоаттрактанта. CIM-планшет оставляли на 30 мин при комнатной температуре, чтобы клетки осели на мембрану верхних камер, после чего помещали в RTCA DP и начинали измерения. Клетки проходили через поры мембраны в нижнюю камеру и прикреплялись к нижней стороне мембраны, где расположены детектирующие электроды. По изменению импеданса электродов RTCA DP рассчитывал клеточный индекс (относительные единицы), пропорциональный количеству мигрировавших клеток. При анализе инвазивной активности клеток дно верхней камеры CIM-планшета предварительно покрывали матригелем, разбавленным в среде DMEM в соотношении 1:5, и оставляли полимеризоваться на 30 мин в стандартных условиях.

2.2.6. Оценка адгезионной способности клеток

Для оценки межклеточной адгезии клеток ГБ использовали трипсиновый тест. В лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл суспензии клеток U87 (1×10^5 клеток/мл) в DMEM с 10% FBS и инкубировали 12 ч в стандартных условиях. Затем среду заменяли на DMEM без FBS, содержащую TGF-β1 (50 нг/мл) и амиды солоксолона **1** – **9** (таблица 6), и культивировали клетки в течение последующих 48 ч. Далее клетки обрабатывали 50 мкл TrypLE, разведенного в PBS в соотношении 1:20, в течение 3 мин при 37 ºC, после чего открепившиеся клетки удаляли трехкратным промыванием PBS. Оставшиеся адгезированные клетки фиксировали 4% формальдегидом и окрашивали 0,1% кристаллическим фиолетовым. Изображения лунок планшета получали с помощью системы гель-визуализации iBright 1500, а площадь, занятую клетками, рассчитывали в программе ImageJ.

Адгезию клеток к ВКМ анализировали путем оценки эффективности их прикрепления к субстрату. Клетки предынкубировали с индукторами ЭМП и исследуемыми соединениями, как описано в таблице 6, после чего открепляли их от дна лунок с помощью TrypLE, как описано в п. 2.1.6. Затем 200 мкл суспензии клеток A549/AD6-KO ($2{,}5 \times 10^5$ клеток/мл), Neuro2a (5×10^5 клеток/мл) и U87 ($1{,}5 \times 10^5$ клеток/мл) добавляли в лунки стандартных 96-луночных планшетов либо планшетов, дно которых покрыто матригелем или коллагеном, и инкубировали 1 ч в стандартных условиях. Неприкрепившиеся клетки удаляли трехкратным промыванием PBS и добавляли свежую среду DMEM. Количество адгезированных клеток U87 оценивали окраской 0,1% кристаллическим фиолетовым. Клетки A549/AD6-KO и Neuro2a окрашивали MTT, как описано в п. 2.2.1, исходя из предположения, что метаболическая активность адгезированных клеток пропорциональна их количеству.

2.2.7. RT-qPCR

После инкубации клеток в соответствующих экспериментальных условиях (таблица 6) к ним добавляли TRIzol из расчета 1 мл реагента на $1{\times}10^6$ клеток, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и переносили в пробирки объемом 1,5 мл. Далее добавляли хлороформ (1/5 объема TRIzol), перемешивали, инкубировали при комнатной температуре 3 мин и центрифугировали (12000 g, 4 °C, 15 мин). Водную фазу переносили в новые пробирки объемом 1,5 мл, добавляли к ней изопропанол (1/2 объема TRIzol), перемешивали, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и центрифугировали (12000 g, 4 °C, 10 мин). Удаляли супернатант, добавляли к осадку РНК 75% этанол, центрифулировали (16100 g, 4 °C, 5 мин), удаляли основную часть спирта, осадок высушивали. Суммарную РНК растворяли в ДИ-воде и оценивали ее концентрацию и чистоту посредством измерения оптической плотности на длинах

волн 230, 260 и 280 нм на спектрофотометре NanoDrop OneC и хранили при −20 °C до использования.

Суммарную РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора реактивов ОТ M-MuLV–RH: реакционную смесь объемом 80 мкл, содержащую 4 мкг РНК, 0.1 мкМ олиго$(dT)_{18}$, 5000 ЕД/мл M-MuLV-RH ревертазы и 16 мкл ОТ-буфер-mix (5×), инкубировали в течение 60 минут при 42 °C, после чего реакцию останавливали нагреванием до 70 °C в течение 10 мин, а полученные кДНК-продукты разбавляли в 4 раза ДИ-водой. RT-qPCR проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 5 мкл кДНК, 500 нМ ген-специфических праймеров (таблица 3) и 12,5 мкл раствора Биомастер HS-qPCR SYBR Blue (2×), на амплификаторе Real-time CFX96 Touch. Первоначальную денатурация кДНК выполнили путем нагрева до 95 °C в течение 5 мин. Затем проводили 40 циклов реакции, включающих денатурацию кДНК (95 °C, 30 с), отжиг праймеров (60 °C, 10 с) и их удлинение ревертазой (72 °C, 20 с). Специфичность полученного продукта определяли по кривым плавления ампликонов. Экспрессию исследуемых генов нормализовали относительно экспрессии генов домашнего хозяйства гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазы (*HPRT*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) (таблица 3) с помощью метода ΔΔCt [316].

2.2.8 Вестерн-блот

В 24-луночные планшеты добавляли 500 мкл суспензии клеток Neuro2a или U87 (2×10^5 клеток/мл) в среде DMEM с 10% FBS и инкубировали 12 ч в стандартных условиях. Далее клетки Neuro2a предынкубировали с СМ (0,1 мкМ) в течение 1 ч, после чего стимулировали лептином (400 нг) в течение 30 мин. Клетки U87 предынкубировали с SP600125 (20 мкМ) в течение 30 мин, после чего инкубировали с TGF-β1 (50 нг/мл) в течение 48 ч. После инкубации клетки лизировали: помещали культуральный планшет на лед, дважды промывали клетки PBS, добавляли 40 мкл буфера RIPA, клетки открепляли с помощью клеточного скребка, переносили в пробирку объемом 0,5 мл, осторожно перемешивали на шейкере MixMate (500 об/мин, 4 °C, 30 мин), центрифугировали (13000 g, 4 °C, 20 мин) и супернатант переносили в новые пробирки объемом 0,5 мл. Клеточные лизаты хранили при −20 °C до использования.

К 5 мкл клеточного лизата добавляли равный объем буфера Лэммли (2×), нагревали при 95 °C в течение 15 мин, а затем наносили на дорожки полиакриламидного геля (ПААГ). В качестве маркера молекулярного веса в отдельные дорожки наносили 7 мкл смеси из 10 окрашенных белков (10 – 180 кДа) PageRuler. Белковый форез проводили в 10% ПААГ, содержащем SDS, в буфере TGB (10 В/см, комнатная температура, 1,5 ч). Затем белки переносили на ПВДФ-мембрану в буфере TS с помощью электропереноса в системе Criterion Blotter (450 мА, 4 °C, 45 мин). Для блокировки неспецифического связывания антител мембраны инкубировали в буфере

SB_{WB}, содержащем 2,5% сухого обезжиренного молока, в условиях аккуратного перемешивания на шейкере ELMI ST-3L (250 об/мин, комнатная температура, 1 ч). Далее мембраны трижды промывали буфером WB и один раз 96% этанолом. Антитела растворяли в буфере SB_{WB} в указанных разведениях (таблица 1). Мембраны инкубировали с первичными антителами (250 об/мин, 4 °C, 12 ч) и вторичными антителами, конъюгированными с HRP (250 об/мин, комнатная температура, 1 ч). После каждого этапа мембраны трижды промывали буфером WB (250 об/мин, комнатная температура, 5 мин). Наконец, мембраны инкубировали с хемилюминесцентным субстратом HRP в течение 3 минут и визуализировали с помощью системы гель-визуализации iBright 1500. Интенсивность белковых полос количественно определяли с помощью программы ImageJ.

2.2.9. Иммунофлуоресцентное окрашивание

На покровные стекла, помещенные на дно 24-луночных планшетов, наносили по 500 мкл суспензии клеток A549 (4×10^5 клеток/мл) и U87 (3×10^5 клеток/мл) в DMEM с 10% FBS и оставляли на 12 ч в стандартных условиях для прикрепления клеток, которое подтверждали микроскопически. Затем среду заменяли на свежую DMEM с добавлением TGF-β1 и исследуемых соединений и инкубировали, как указано в таблице 6. По окончании инкубации питательную среду удаляли, клетки промывали PBS, фиксировали путем инкубации с 500 мкл 4% формальдегида (37 °C, 20 мин) и дважды промывали PBS. Для пермеабилизации клеточной мембраны добавляли 60 мкл буфера PB, содержащего 0,1% Triton X100, на 15 мин при 37 °C, после чего клетки дважды промывали PBS. Первичные и вторичные антитела разводили в буфере SB_{IF}, содержащем 5 мг/мл БСА, до указанных в таблице 1 разведений. Клетки последовательно инкубировали с 60 мкл раствора первичных антител (1 ч, 37 °C) и 60 мкл раствора вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488 (1 ч, 37 °C, в темноте), во влажной атмосфере, чтобы предотвратить высыхание растворов. После каждого этапа мембраны трижды промывали буфером SB_{IF}. Для окраски ядер клетки инкубировали с 60 мкл DAPI (1 мкг/мл) в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре, после чего трижды промывали PBS. Наконец, покровные стекла помещали на предметное стекло в 10 мкл Fluoromount-G, инкубировали в горизонтальном положении 12 ч, а затем хранили при 4 °C до анализа. Изображения клеток получали с помощью конфокального микроскопа LSM710 при увеличении ×200 и ×650 и анализировали в программах CellProfiler и ImageJ. Ядерную транслокацию NF-κB p65 и SMAD2/3 оценивали путем расчета отношения интенсивности ядерного окрашивания к интенсивности цитоплазматического окрашивания.

2.2.10. Проточная цитометрия

Проточную цитометрию использовали для оценки уровня белков в клетках (флуоресцентно-меченые антитела), апоптоза (Annexin V-FITC/йодистый пропидий), уровня активных форм кислорода (DCFDA) и активности ALDH (AldeRed) (подробное описание данных методов см. ниже). Клетки, несущие соответсвующие флуоресцентные метки, анализировали на проточном цитометре NovoCyte с помощью программы NovoExpress. В каждом эксперименте использовали неокрашенный контроль, проходивший все этапы пробоподготовки, но без добавления соответствующих флуоресцентных красителей. С его помощью проводили гейтирование: диаграмму прямого и бокового рассеяния (FSC против SSC) использовали для отсеивания дебриса и выделения клеток интереса, а диаграмму высоты и площади прямого рассеяния (FSC-H против FSC-A) – для отсеивания дублетов и выделения одиночных событий. Для каждого образца анализировали 10000 одиночных событий.

2.2.10.1. Оценка уровней белков-маркеров ЭМП

В 6-луночные планшеты добавляли 2 мл суспензии клеток Neuro2a и A549 ($2{,}5\times10^5$ клеток/мл) в DMEM с 10% FBS и культивировали 12 ч в стандартных условиях. Затем среду заменяли на свежую DMEM с добавлением TGF-β1/лептина и СМ и инкубировали, как описано в таблице 6. Иммуноокрашивание проводили с помощью набора реактивов FIX and PERM Cell Permeabilization Kit. Клетки открепляли от культуральных планшетов с помощью TrypLE (5 мин, 37 °C), ресуспендировали в 1,5 мл DMEM, содержавшей 10% FBS, переносили в пробирки объемом 1,5 мл, центрифугировали (400 g, 5 мин) и удаляли супернатант. Клетки фиксировали путем инкубации в 100 мкл Реагента A (15 мин, комнатная температура), после чего промывали 500 мкл буфера WB_{FC}, содержащего 5% FBS. Первичные антитела разводили в пермеабилизирующем Реагенте B, вторичные антитела – в буфере SB_{FC}, содержащем 2% FBS, до разведений, указанных в таблице 1. Клетки последовательно инкубировали с 100 мкл раствора первичных антител (1 ч, комнатная температура) и со 100 мкл растора вторичных антител (30 мин, комнатная температура, в темноте). После каждого этапа клетки дважды промывали WB_{FC}. Наконец, к клеткам добавляли 300 мкл SB_{FC} и анализировали с помощью проточной цитометрии.

2.2.10.2. Исследование механизма клеточной гибели

Для оценки влияния пМАС на TMZ-индуцированную клеточную гибель в лунки 24-луночных планшетов помещали по 500 мкл суспензии клеток U87 ($5{,}6\times10^5$ клеток/мл) в DMEM с 10% FBS и инкубировали клетки 12 ч в стандартных условиях. Далее среду в лунках заменяли на бессывороточную DMEM, содержащую следующие соединения: (1) без добавок (контроль), (2) TMZ (500 мкМ), (3) TMZ + пМАС (600 нМ), (4) TMZ + пМАС + NAC (2 мМ). Антиоксидант NAC был добавлен для оценки вклада АФК в гибель клеток. Флуоресцентное окрашивание

клеток для определения механизма их гибели проводили с использованием набора реагентов Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit в соответствии с протоколом производителя: реакционная смесь включала 200 мкл буфера для связывания (binding buffer), 5 мкл Annexin V–FITC и 10 мкл йодистого пропидия. После 72 ч инкубации с исследуемыми препаратами часть клеток открeплялась, а часть оставалась прикрепленной к планшету. Открепившиеся клетки переносили вместе со средой в пробирки объемом 1,5 мл, центрифугировали (800 g, 5 мин), удаляли супернатант и суспендировали клетки в 200 мкл реакционной смеси. Прикрепленные клетки обрабатывали TrypLE (5 мин, 37 °C), суспендировали в 500 мкл среды DMEM, содержавшей 10% FBS, переносили вместе со средой в пробирки объемом 1,5 мл, центрифугировали (400 g, 5 мин), удаляли супернатант, добавляли к ним суспензию открепившихся клеток и аккуратно перемешивали пипетированием. Пробирки помещали на лед и инкубировали 10 мин в темном месте, после чего проводили анализ с помощью проточной цитометрии.

2.2.10.3. Анализ внутриклеточных активных форм кислорода

Анализ внутриклеточных АФК проводили с помощью набора реагентов DCFDA/H_2DCFDA Cellular ROS Assay Kit. Суспензию клеток U87 центрифугировали (400 g, 5 мин), удаляли супернатант, добавляли 20 мкМ DCFDA, растворенный в DMEM, из расчета 1 мл раствора реагента на 1 × 10^6 клеток. Клетки инкубировали 30 мин в стандартных условиях, после чего ресуспендировали в DMEM. Клеточную суспензию (4×10^5 клеток/мл) помещали в лунки 24-луночного планшета в 500 мкл бессывороточной DMEM, содержащей следующие соединения: (1) без добавок (контроль), (2) TMZ (125 мкМ), (3) TMZ + пМАС (100 нМ), (4) TMZ + пМАС + NAC (2 мМ). После 72 ч инкубации в стандартных условиях клетки собирали, как описано в п. 2.2.10.2, ресуспендировали в 200 мкл DMEM и анализировали с помощью проточной цитометрии.

2.2.10.4. Анализ активности ALDH

Активность ALDH в сфероидах, образованных клетками U87, оценивали с помощью набора AldeRed ALDH Detection Assay. Метод основан на способности AldeRed 588-A проникать в клетки и под действием ALDH превращаться в флуоресцентный продукт, который удерживается внутри клеток [143]. Для создания низкоадгезионной поверхности стерильную 1% агарозу плавили на водяной бане при 95 °C, после чего вносили по 2 мл в лунки 6-луночного планшета и оставляли для полимеризации на 2 ч при комнатной температуре. Затем в лунки добавляли 2 мл суспензии клеток U87 ($1,5\times10^5$ клеток/мл) в DMEM в присутствии пМАС (50 – 100 нМ) или в его отсутствие (контроль). Через 4 дня образовавшиеся сфероиды переносили пипеткой в пробирки

объемом 2 мл и промывали PBS. Для получения отдельных клеток сфероиды обрабатывали 100 мкл TrypLE в течение 15 мин при 37 °C, после чего добавляли 1 мл AldeRed Assay Buffer и перемешивали пипетированием. Для каждой суспензии клеток, контрольной или пМАС-индуцированной, готовили две пробирки: в пробирку №1 вносили 5 мкл AldeRed 588-A, в пробирку №2 – 5 мкл DEAB (селективного ингибитора ALDH). Сначала суспензию клеток (1 мл) переносили в пробирку №1 и перемешивали, после чего половину суспензии (0,5 мл) переносили в пробирку №2 и также перемешивали. Пробирки №1 и №2 инкубировали 45 мин при 37 °C, после чего центрифугировали (400 g, 5 мин), удаляли супернатант, добавляли 200 мкл AldeRed Assay Buffer, помещали на лед и анализировали методом проточной цитометрии. Фоновую флуоресценцию оценивали на клетках, обработанных DEAB (пробирка №2), после чего на основе этого значения выставляли гейт для идентификации ALDH-положительных ($ALDH^+$) клеток (пробирка №1).

2.2.11. Анализ синергического действия пара-метиланилида солоксолона (пМАС) и темозоломида (TMZ)

Клетки U87 высевали в 96-луночные планшеты, как описано в п. 2.2.1. Затем клетки обрабатывали комбинацией пМАС (0 – 400 нМ) и TMZ (0 – 500 мкМ) в течение 72 ч, после чего их жизнеспособность оценивали с помощью МТТ-теста (см. п. 2.2.1). На основе полученных данных была построена и проанализирована матрица зависимости доза–эффект для выявления синергических взаимодействий между пМАС и TMZ с использованием платформы SynergyFinder+ (дата обращения: 23.06.2023). Индекс синергии (δ) вычислен по модели HSA (Highest Single Agent), которая определяет превышение эффекта комбинации соединений над наивысшим ответом на отдельный препарат, согласно формуле:

$$\delta_{HSA} = y_c - \max(y_1(x_1), y_2(x_2)),$$

где y_c – эффект комбинации соединения 1 (концентрация x_1) и соединения 2 (концентрация x_2), а $y_1(x_1)$ и $y_2(x_2)$ – эффекты отдельных соединений в тех же концентрациях [317]. Согласно принятым порогам, $\delta > 10$ соответствует синергии, $-10 \leq \delta \leq 10$ – аддитивности, $\delta < -10$ – антагонизму.

2.2.12. Иммуноферментный анализ

В лунки 96-луночного планшета вносили 100 мкл суспензии клеток U87 (1×10^5 клеток/мл) в DMEM с 10% FBS и инкубировали 12 ч в стандартных условиях. Среду заменяли на DMEM без FBS, после чего клетки последовательно обрабатывали SP600125 (20 мкМ, 30 мин) и $CoCl_2$ (400 мкМ, 48 ч). Затем среду отбирали в пробирки объемом 0,5 мл и разводили вдвое средой DMEM.

Концентрацию IL-6 определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора Интерлейкин-6-ИФА-БЕСТ. В лунки стрипов вносили по 100 мкл раствора для разведения образцов (РРО) и 100 мкл надклеточной (кондиционированной) среды и инкубировали при перемешивании на шейкере ELMI ST-3L (500 об/мин, 37 °C) в течение 2 ч. Затем образцы последовательно инкубировали 60 мин с 100 мкл конъюгата №1 (биотинилированные поликлональные антитела к IL-6) и 30 мин с 100 мкл конъюгата №2 (стрептавидин-HRP) в тех же условиях. После каждого этапа лунки промывали пять раз 300 мкл фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т). Далее в лунки добавляли 100 мкл раствора тетраметилбензидина (ТБМ плюс) и инкубировали 25 мин при комнатной температуре в темноте, после чего реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента и измеряли оптическую плотность раствора при 450 и 620 нм. В качестве стандартов использовали образцы с известной концентрацией IL-6 (0 – 300 пг/мл), которые обрабатывали также, как экспериментальные образцы. На основе полученных значений строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности от концентрации IL-6, которую использовали для расчета концентрации IL-6 в экспериментальных образцах.

2.2.13. Анализ клоногенной способности

Для анализа влияния нокдауна *ADAMTS6* и действия пМАС на клоногенную способность опухолевых клеток последние высевали в количестве, достаточном для формирования колоний в течение 10 дней. Клетки A549 и AD6-KO высевали в 6-луночные планшеты по 2 мл суспензии (150 клеток/мл), клетки U87 – в 96-луночные планшеты по 100 мкл (2000 клеток/мл). Все клеточные линии культивировали в среде с 10% FBS, необходимым для выживания клеток при низкой плотности посева; к клеткам U87 дополнительно вносили пМАС (0 – 1000 нМ) для оценки его влияния на клоногенность. На 5-й день среду заменяли на свежую DMEM с 10% FBS (и соответствующей концентрацией пМАС для клеток U87). На 10-й день клетки фиксировали 4% формальдегидом (15 мин, комнатная температура) и окрашивали 0,1% кристаллическим фиолетовым (30 с). Избыток красителя смывали ДИ-водой, планшеты высушивали и фотографировали с помощью системы гель-визуализации iBright 1500. Общую площадь колоний диаметром ≥ 100 мкм оценивали в программе ImageJ и нормализовали относительно значения в контрольной группе.

2.2.14. Анализ роста опухолевых сфероидов

Дла анализа роста первичных сфероидов лунки 96-луночного планшета покрывали 50 мкл 1% агарозы для создания низкоадгезионной поверхности, как описано в п. 2.2.10.4. Затем в лунки вносили 200 мкл суспензии клеток U87 ($2{,}5\times10^4$ клеток/мл) в DMEM без FBS и инкубировали в

стандартных условиях. На следующий день к сформировавшимся сфероидам добавляли пМАС (50 – 1000 нМ). Каждые два дня в течение 10 дней половину среды заменяли свежей DMEM с пМАС и фотографировали сфероиды с помощью микроскопа ZEISS Primo Vert.

Для анализа вторичных сфероидов в лунки 6-луночного планшета вносили 2 мл суспензии клеток U87 ($1{,}5 \times 10^5$ клеток/мл) и инкубировали 72 ч для образования первичных сфероидов. Затем к сфероидам добавляли пМАС (50 – 1000 нМ) и через 4 дня сфероиды разрушали до отдельных клеток, как описано в п. 2.2.10.4. Полученные клетки высевали в 96-луночные планшеты, покрытые агарозой, аналогично процедуре для первичных сфероидов. Через 72 ч образовавшиеся вторичные сфероиды фотографировали с помощью микроскопа ZEISS Primo Vert. Площадь сфероидов оценивали в программе ImageJ.

2.2.15. Молекулярный докинг

Трехмерные кристаллические структуры белков получали из базы данных RCSB PDB (даты обращения: 29.11.2022 – для JAK2, SHP2, SOS, HRAS, c-RAF, MEK1 и ERK2; 25.08.2023 – для TβRI/II). Из кристаллических структур удаляли молекулы воды и сокристаллизованные лиганды с помощью Discovery Studio Visualizer, после чего добавляли полярные водороды и заряды Гастайгера с помощью AutoDock Tools. Трехмерные структуры исследуемых соединений (СМ и пМАС) строили в MarvinSketch и оптимизировали с использованием силового поля MMFF94 в Avogadro; свободное вращение связей задавали с помощью AutoDockTools. Молекулярный докинг исследуемых соединений с вышеуказанными белками проводили с помощью AutoDock Vina, позиционируя лиганды в сайтах связывания известных ингибиторов соответствующих белков. Пороговым значением для сильного взаимодействия принимали энергию связывания (ΔG) $\leq -7{,}0$ ккал/моль; все модели с ΔG ниже этого порога визуализировали в 2D- и 3D-форматах с помощью Discovery Studio Visualizer и UCSF ChimeraX. Среди докинг-моделей выбирали лидерную модель, обладающую наибольшим количеством стабилизирующих водородных связей. В качестве контрольных соединений использовали известные ингибиторы соответствующих белков, которые подвергали тем же этапам анализа. Докинг-модели ингибиторов сопоставляли с их экспериментально установленными кристаллическими структурами комплексов для подтверждения надежности моделирования. Кроме того, проводили сопоставление энергий связывания исследуемых соединений и известных ингибиторов. В таблице 7 описаны использованные идентификаторы кристаллических структур, референсные ингибиторы и параметры моделирования.

Таблица 7. Параметры молекулярного докинга.

Белок	PDB ID	Ингибитор*	Область докинга					
			Координаты			Размеры, Å		
			x	y	z	x	y	z
JAK2	6VGL	Руксолитиниб	24.400	13.420	53.879	14	18	16
SHP2	7JVM	Батопротафиб	20.068	−23.098	27.019	16	10	16
SOS	4NYI	73167574	37.466	30.416	22.908	16	14	12
HRAS	6ZJO	138756244	−21.211	40.151	23.363	14	14	14
c-RAF	3OMV	11653652	6.360	16.358	33.441	14	18	14
MEK1	7JUR	Траметиниб	−55.347	76.653	12.309	16	22	16
ERK2	1TVO	53338808	6.416	−4.156	16.954	14	16	14
TβRI	5QIM	121411739	4.272	9.573	5.503	22	16	16
TβRII	5E91	118988613	13.675	−0.527	3.375	18	16	20

* – приведено международное непатентованное наименование препаратов при его наличии, а при его отсутствии – идентификатор в базе данных PubChem.

2.2.16. Исследование эффекта соединений с помощью мышиных моделей *in vivo*

Все этапы исследования эффекта соединений в условиях *in vivo* были выполнены в ЛБНК ИХБФМ СО РАН под руководством к.м.н. Сеньковой А. В.

2.2.16.1. Оценка влияния СМ на метастазирование меланомы B16

Мышам C57Bl/6 в хвостовую вену вводили 200 мкл суспензии клеток B16 (1×10^6 клеток/мл) в физиологическом растворе. На 4-й день после введения опухолевых клеток мышей разделили на три группы (n = 10 в группе): (1) мыши без лечения (контроль); (2) мыши, получавшие внутрибрюшинные (в/б) инъекции 10% раствора Твин-80 (носитель); (3) мыши, получавшие в/б инъекции СМ (25 мг/кг) в 10% Твин-80. Лечение проводили два раза в неделю (всего шесть инъекций). На 21-й день после введения опухолевых клеток мышей выводили из эксперимента; легкие забирали для последующего гистологического анализа.

2.2.16.2. Оценка влияния пМАС и TMZ на рост подкожных опухолей глиобластомы U87

Мышам Nude подкожно в левый бок вводили 100 мкл суспензии клеток U87 (2×10^7 клеток/мл) в физиологическом растворе. На 4-й день после введения опухолевых клеток мышей разделили на четыре группы: (1) мыши, получавшие в/б инъекции 10% Твин-80 (носитель; n = 6); (2) мыши, получавшие в/б инъекции пМАС (20 мг/кг) в 10% Твин-80 (пМАС; n = 5); (3) мыши, получавшие в/б инъекции TMZ (10 мг/кг) в физиологическом растворе (TMZ; n = 5); (4) мыши, получавшие одновременно пМАС и TMZ в тех же дозах и тем же способом, что и при монотерапии (пМАС + TMZ; n = 6). Мыши получали пМАС три раза в неделю (всего 7 инъекций) и TMZ ежедневно, кроме выходных (всего 11 инъекций). В ходе эксперимента объемы опухолей измеряли три раза в неделю штангенциркулем и рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{D \times d^2}{2},$$

где D – наибольший диаметр опухолевого узла, d – наименьший диаметр опухолевого узла, перпендикулярный D.

На 19-й день после трансплантации опухолевых клеток мышей выводили из эксперимента; опухолевые узлы, печень и почки забирали для последующего анализа.

2.2.16.3. Гистологический анализ

Количество поверхностных метастазов меланомы в легких мышей (см. п. 2.2.16.1) подсчитывали под бинокулярным микроскопом. Для гистологического исследования образцы легких подвергали стандартной гистологической проводке: фиксировали в 10% формалине, дегидратировали в растворах этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин; срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Изображения срезов получали с помощью микроскопа Axiostar Plus при увеличении ×100. Площадь внутренних метастазов рассчитывали в процентах от общей площади срезов легких в программе Adobe Photoshop. В образце от одной мыши анализировали не менее 10 независимых полей зрения, в каждой экспериментальной группе – не менее 100 полей.

3.2.16.4. Иммуногистохимия

Уровни маркеров ЭМП в метастазах меланомы в легких (см. п. 2.2.16.1) и в подкожных ксенотрансплантатах ГБ (см. п. 2.2.16.2) оценивали методом иммуногистохимии. Срезы тканей депарафинизировали и регидратировали по стандартному протоколу. Для демаскировки антигенов срезы обрабатывали в микроволновой печи (700 Вт, 20 мин). Затем срезы инкубировали с первичными антителами против CDH1 (E-кадгерин; ab76055), MMP9 (ab38898) и CDH2 (N-кадгерин; ab76011) согласно рекомендациям производителя (Abcam, Кембридж, Массачусетс, США). Для флуоресцентной визуализации использовали вторичные антитела,

конъюгированные с Alexa Fluor 488 (ab150077). В качестве альтернативы применяли набор с биотинилированными вторичными антителами, стрептавидином-HRP и субстратом 3,3'-диаминобензидином (DAB) (ab64261) согласно протоколу производителя (Abcam). Изображения срезов получали с помощью микроскопа Axiostar Plus при увеличении ×400. Интенсивность флуоресценции CDH1 и MMP9 оценивали в программе ImageJ и рассчитывали как среднюю интенсивность на единицу площади метастатических очагов.

2.2.17. Реанализ транскриптомных данных

2.2.17.1. Сбор и подготовка данных РНК-микрочипов и RNA-seq

Наборы данных TCGA-LUAD и TCGA-GBM были получены из портала GDC (даты обращения: 23.08.2025 и 26.12.2023 соответственно), «mRNAseq_693» и «mRNAseq_325» – из CGGA (дата обращения: 10.09.2024), наборы GEO Series (GSE) – из базы данных GEO (даты обращения (в соответствии с номерами (№) из таблицы 4): №4 – 10.09.2024, №5 – 11.01.2024, №6 – 9 – 22.09.2022 и №10–17 – 4.10.2025, №18 – 24.02.2025). Наборы данных из CGGA объединили и провели коррецию батч-эффекта с помощью функции «Combat_seq» из пакета sva (v3.54.0). Клинические наборы данных (TCGA, CGGA и GSE16011) были отфильтрованы таким образом, чтобы сохранить только образцы, имеющие информацию о выживаемости пациента. Данные RNA-Seq нормализовали методом VST (преобразование, стабилизирующее дисперсию) в пакете DESeq2 (v1.46.0), а данные кДНК-микрочипов – логарифмической нормализацией в пакете limma (v3.62.2).

2.2.17.2. Анализ дифференциальной экспрессии

Анализ дифференциальной экспрессии был выполнен с помощью эмпирического байесовского модерированного t-теста (пакет limma) для данных кДНК-микрочипов и критерия Вальда (пакет DESeq2) для данных RNA-seq, с поправкой на множественные сравнения по методу Бенджамини-Хохберга. В зависимости от задачи последующего анализа списки дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) фильтровали по скорректированному p-значению (p_{adj}) и кратности изменения экспрессии (fold change (FC)): (1) для анализа обогащения наборов генов (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) использовали полный список ДЭГ без фильтрации; (2) для построения генных сетей ЭМП – ДЭГ из наборов данных №6 – 9 (Таблица 4) с $p_{adj} < 0,05$ и $|\log_2 FC| \geq 1,5$; (3) для верификации изменения экспрессии *ADAMTS6* – ДЭГ из наборов данных №10 – 17 с $p_{adj} < 0,05$ и $|\log_2 FC| \geq 1$; (4) при сравнении мезенхимальных и пронейральных клеток ГБ в наборе данных №5 – ДЭГ с $p_{adj} < 0,05$ и $\log_2 FC \geq 1$.

2.2.17.3. Анализ обогащения наборов генов

Наборы генов были получены из базы данных MSigDB. Обогащение пронейральных и мезенхимальных генов (MSigDB ID: M2122 и M2115 соответственно) в опухолях ГБ из набора TCGA-GBM оценивали методом анализа вариаций наборов генов (Gene Set Variation Analysis, GSVA) с помощью пакета GSVA (v2.0.7). PMTscore рассчитывали как разность GSVA-оценок мезенхимальных и пронейральных генов, как описано ранее [318]. Обогащение генных сигнатур ЭМП (M5930), гипоксии (M5891), сигнального пути TGF-β (M5896) и воспаления (M5932) в TGF-β1-индуцированных клетках АЛ оценивали методом GSEA с помощью пакета clusterProfiler (v4.14.6) со следующими параметрами: размер набора генов 25 – 500, коррекция на множественное сравнение методом Бенджамини-Хохберга и $p_{adj} < 0,05$.

2.2.17.4. Анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов (WGCNA)

Для нахождения кластеров генов, коэкспрессирующихся в опухолях пациентов из когорты TCGA-GBM, был проведен анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов (WGCNA) с помощью пакета WGCNA (v1.73). Гены-аутсайдеры (outliers) были отфильтрованы с помощью функции «goodSamplesGenes». Мягкая-пороговая степень $\beta = 12$ была выбрана функцией «pickSoftThreshold» для достижения scale-free топологии. Сеть коэкспрессии генов была создана с помощью функции «blockwiseModules», после чего похожие модули были объединены путем отсечения дендрограммы на высоте 0.25. Наконец, взаимосвязь модулей и признаков была установлена через корреляционный анализ Пирсона между показателями eigengene (взвешенная средняя экспрессия каждого модуля) и PMTscore, а также GSVA-оценками пронейральных и мезенхимальных генов (см. п. 2.2.17.3).

2.2.17.5. Анализ генных сетей

Генные сети реконструировали, используя данные о белок-белковых взаимодействиях из базы STRING, в программе Cytoscape со следующими настройками: показатель достоверности (confidence score) > 0,7 и использование только входного списка генов без прогнозирования дополнительных взаимодействий. Четыре генные сети ЭМП клеток АЛ строили на основе ДЭГ из наборов данных №6 – 9 (см. п. 2.2.17.2). Генную сеть ПМП клеток ГБ строили на основе генов, одновременно входящих в список ДЭГ набора №5 (см. п. 2.2.17.2) и в модуль WGCNA, положительно коррелирующий с PMTscore (см. п. 2.2.17.4). Топологический анализ сетей выполнили с помощью плагина CytoHubba, определяющего 12 метрик центральности: Degree, Betweenness, Stress, Radiality, EPC, Closeness, BottleNeck, MCC, MNC, DMNC, EcCentricity и ClusteringCoefficient [319]. Хаб-гены идентифицировали двумя способами: (1) отбирали гены, которые входили в топ 15% хотя бы по одной метрике CytoHubba не менее чем в 3 из 4 генных

сетей ЭМП; (2) в сети ПМП отбирали 31 ген с наибольшими показателем центральности, определенном как средний ранг по метрикам Degree, MCC, MNC, EPC, Closeness и Radiality.

Связь хаб-генов из сети ПМП и лекарственных препаратов устанавливали посредством реконструкции генной ассоциативной сети. Сеть взаимодействий лекарств с белками-мишенями построили с помощью базы данных STITCH (v5.0), используя следующие настройки: confidence score > 0,7; источники информация о взаимодействии (interaction source): текст-майнинг, эксперименты и базы данных. Генную сеть, включающую белки-мишени и хаб-гены, построили с помощью базы данных STRING со следующими настройками: confidence score > 0,7, без прогнозирования дополнительных взаимодействий. Затем сети «лекарства – мишени» и «мишени – хаб-гены» интегрировали в генную ассоциативную сеть с помощью функции «Merge Networks» в программе Cytoscape. Топологический анализ данной сети выполняли с помощью CytoHubba и определяли лидерное соединение, обладающее наибольшей центральностью (средним рангом по метрикам Degree, MCC, MNC, EPC, Closeness и Radiality).

2.2.17.6. Текст-майнинг

Для оценки литературных связей между идентифицированными хаб-генами и контекстом онкологических заболеваний использовали анализ совместной встречаемости на уровне предложений в базе данных PubMed с помощью текст-майнинга (интеллектуального анализа текста) на плафторме GenCLiP3 (дата обращения: 6.03.2025). Для хаб-генов из сети TGF-β-индуцированного ЭМП (см. п. 2.2.17.5) оценивали совместное упоминание с терминами “lung adenocarcinoma OR LUAD” (аденокарцинома легкого ИЛИ АЛ), “epithelial-mesenchymal transition OR EMT” (эпителиально-мезенхимальный переход ИЛИ ЭМП), “lung cancer” (рак легкого) и “metastasis” (метастазирование). Хаб-гены считали связанными с термином, если они упоминались совместно более чем в 5 статьях.

2.2.17.7. Анализ выживаемости

Прогностическую значимость экспрессии *ADAMTS6* при АЛ оценивали с помощью веб-платформ GEPIA2 и KMplotter (дата обращения: 25.06.2025), которые используют данные RNA-Seq (TCGA-LUAD) и кДНК-микрочипов (17 наборов данных из TCGA и GEO). Пациентов разделили на группы по медианному уровню экспрессии *ADAMTS6* и проанализировали общую выживаемость (OS), а также выживаемость без прогрессирования (PFS) и без рецидивов (DFS) методом Каплана–Мейера.

Прогностическую значимость экспрессии хаб-генов из сети ПМП (см п. 2.2.17.5) при ГБ анализировали с помощью пакетов survival (v3.8.3) и survminer (v0.5.1). С помощью одномерного регрессионного анализа Кокса определили хаб-гены, высокая экспрессия которых ассоциирована

с худшим прогнозом выживаемости пациентов ($p < 0,05$ и отношение рисков (hazard ratio (HR)) > 1) в трех независимых наборах клинических данных (№2 – 4 в таблице 4). Для верификации хаб-генов в качестве прогностических маркеров пациенты из когорты TCGA-GBM были разделены на группы по медианному уровню экспрессии соответствующих генов; затем оценивали общую выживаемость методом Каплана–Мейера, а статистическую значимость различий между группами определяли с помощью лог-рангового теста.

2.2.17.8. Реанализ данных scRNA-seq

Анализ набора данных scRNA-seq GSE147405 проводили в пакете Seurat (v5.3.0). Клетки высокого качества отбирали на основе следующих критериев: более 200, но менее 5000 обнаруженных генов, количество уникальных молекул РНК (UMI) более 1000 и доля митохондриальных генов менее 5%. Данные логарифмически нормализовали и масштабировали экспрессию всех генов (scaling). Снижение размерности выполнили методом анализа главных компонент (PCA) по 2000 наиболее вариабельным генам. Кластеризацию клеток выполнили с помощью функций «FindNeighbors» и «FindClusters» с настройками, включающими 50 главных компонент (PC) и уровень разрешения (resolution) 1.

Обогащение ранее опубликованных наборов эпителиальных и мезенхимальных генов [320], а также генной сигнатуры ЭМП из базы данных MSigDB (M5930) оценивали в клеточных кластерах с помощью пакета irGSEA (v3.3.2). На основании полученных результатов клеточные кластеры были отнесены к эпителиальной или мезенхимальной группе. В пределах каждого образца профили экспрессии отдельных клеток агрегировали отдельно для каждой группы (метод pseudobulk). Экспрессию генов между мезенхимальной и эпителиальной группами сравнивали с помощью анализа дифференциальной экспрессии в пакете DElegate (v1.2.1) с использованием алгоритма edgeR и порогов значимости $|\log_2 FC| \geq 0,5$ и $p_{adj} < 0,05$.

2.2.18. *In silico* перепрофилирование лекарственных препаратов

2.2.18.1. Анализ connectivity map

Перепрофилирование лекарственных препаратов для ингибирования ПМП клеток ГБ осуществили с помощью метода connectivity map в веб-платформе CLUE (дата обращения: 11.01.2024). Генную сигнатуру ПМП из 31 хаб-гена (см. п. 2.2.17.5) сопоставили с изменениями транскрипционного профиля, вызванными 2513 препаратами в 9 типах клеток (8 клеточных линий рака предстательной железы, молочной железы, легких, толстой кишки, кожи и печени и 1 линия неопухолевых клеток почек). Соединения с оценкой связности (connectivity score) ≤ -90 были отобраны в качестве потенциальных ингибиторов ПМП, как было показано ранее [301]. Кроме того, определяли связность генной сигнатуры ПМП с профилями экспресии генов клеток,

в которых с помощью кшРНК был выполнен нокдаун генов, кодирующих белковые мишени SP600125.

2.2.18.2. Предсказание способности соединений проникать через гематоэнцефалический барьер

Способность потенциальных ингибиторов ПМП проникать через ГЭБ предсказывали *in silico* с помощью веб-платформ AlzPlatform и PreADMET (дата обращения: 15.01.2024). Согласно литературным данным, DOX и TMZ обладают низкой и высокой способностью проникать через ГЭБ соответственно [321], поэтому их использовали в качестве отрицательного и положительного контролей соответственно. Соединения с наилучшими оценками прохождения через ГЭБ по данных обеих платформ проверяли на субстратную специфичность к Р-гликопротеину (Р-ГП), основному эффлюксному транспортеру ГЭБ [158], с помощью веб-платформ Vienna LiverTox Workspace, SwissADME и ADMETlab (дата обращения: 15.01.2024). Соединения, не являвшие субстратами Р-ГП по данным всех трех плафторм, отбирали как лидерные и в дальнейшем исследовали с помощью анализа генных ассоциативных сетей (см. п. 2.2.17.5).

2.2.19. Статистический анализ

Во всех экспериментах использовали не менее трех повторностей на экспериментальную группу. Статистический анализ проводили с использованием пакета stats (v4.4.2) в R и программы GraphPad Prism (v8.0.1). Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные экспериментов с нормальным распределением анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным сравнением Тьюки для множественных сравнений и t-критерия Стьюдента для попарных сравнений. Данные некоторых экспериментов с распределением, отличающимся от нормального, включая анализ морфологии клеток, трансвелл-миграцию и ИФ, анализировали с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с последующим апостериорным сравнением Данна. Корреляционный анализ Спирмена выполнен с помощью пакета Hmisc (v5.2.3) в R. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

3. Результаты и обсуждение

Введение

За последние десять лет накоплен значительный объем данных, свидетельствующих о важной роли ЭМП в прогрессировании онкологических заболеваний (см. п. 1.1.4 – 1.1.7). В доклинических исследованиях низкомолекулярные ингибиторы сигнальных путей ЭМП снижали метастатический потенциал опухолевых клеток и повышали их чувствительность к цитотоксическим агентам. Однако в клинических испытаниях эти соединения до настоящего времени не продемонстрировали значимого терапевтического эффекта (см. п. 1.2.1.1). В связи с этим исследования последних лет сосредоточены на поиске более эффективных стратегий воздействия на ЭМП с использованием анализа больших данных, компьютерного моделирования и рационального дизайна лекарств. Все больше данных свидетельствует о том, что клеточная пластичность, в том числе ЭМП, определяется факторами опухолевого микроокружения. Поэтому значительные усилия направлены на разработку терапевтических решений, способных нарушить взаимоподдерживающую связь между опухолевыми клетками и их микроокружением (см. п. 1.2.1.2 – 1.2.1.4) [125]. Опираясь на ранее опубликованные данные, настоящая диссертационная работа предлагает новые подходы к таргетированию ЭМП. Полученные результаты можно разделить на три категории, соответствующие основным стратегиям разработки ингибиторов ЭМП (см. п. 1.2): (1) фенотип-ориентированный подход, (2) мишень-ориентированный подход и (3) перепрофилирование лекарственных препаратов.

Фенотип-ориентированный подход основан на скрининге библиотек соединений на клеточных моделях с оценкой их влияния на фенотипические проявления ЭМП (см. п. 1.2.2). В ИХБФМ СО РАН совместно с НИОХ СО РАН были разработаны цианоенон-содержащие производные 18βН-ГК, среди которых соединение СМ обладало наивысшим противоопухолевым потенциалом, индуцируя гибель опухолевых клеток через механизм, включающий стресс ЭПР, повышение синтеза АФК и активацию митохондриального пути апоптоза. Дальнейшая оптимизация данной серии соединений была направлена на терапию ГБ. Для этого способность соединений проникать через ГЭБ была улучшена по сравнению с СМ за счет замены метилового эфира в положении С-30 на амидные группы (Рис. 6). Полученные амиды солоксолона оказывали цитотоксический эффект на клетки ГБ, сопоставимый с СМ, а лидерное соединение СТА эффективно накапливалось в мозге мышей и подавляло рост ксенографтов ГБ *in vivo* (см. п. 1.2.2.1).

В рамках первого направления настоящей работы фенотип-ориентированный подход был использован для валидации солоксолоновых производных в качестве универсальных модуляторов мезенхимальной пластичности опухолевых клеток. Основной фокус был сделан на

идентификации ингибиторов ПМП (специфичного для ГБ подтипа ЭМП) в библиотеке амидов солоксолона, однако спектр задач включал и смежные модели. В ходе исследования:

(а) оценена перспективность использования солоксолонового остова для подавления мезенхимальной пластичности опухолевых клеток (на модели TGF-β1-индуцированных клеток АЛ, инкубированных в присутствии СМ);

(б) впервые изучено влияние адипокина лептина на усиление метастатического потенциала клеток НБ. Поскольку связь данного процесса с НМП (специфичного для НБ подтипа ЭМП) выявлена не была, это позволило оценить действие СМ на лептин-индуцированное метастазирование, не зависящее от ЭМП;

(в) проведен скрининг ингибирующей активности амидов солоксолона в отношении фенотипических проявлений TGF-β1-индуцированного ПМП в клетках ГБ с последующим детальным исследованием механизма действия лидерного соединения на ПМП и ПМП-ассоциированные процессы *in vitro* и *in vivo*.

Мишень-ориентированный подход к разработке ингибиторов ЭМП основан на селективном подавлении белков, регулирующих данный процесс. Недавние исследования показали, что протеазы ADAMTS1/2/4/6/12/16 стимулируют ЭМП в опухолевых клетках различного гистогенеза. Низкомолекулярные ингибиторы ADAMTS1 эффективно подавляли метастазирование в доклинических испытаниях при АЛ и ПРПР, что свидетельствует о перспективности белков семейства ADAMTS как терапевтических мишеней. Однако разработка ингибиторов ADAMTS осложнена их недостаточной изученностью. В частности, хотя известно, что TNF-α/TGF-β-индуцированный ЭМП в клетках АЛ сопровождается повышением экспрессии гена *ADAMTS6*, роль кодируемой им протеазы в регуляции этого процесса оставалась не установленной (см. п. 1.2.1.3).

В рамках второго направления диссертационной работы с помощью системного биоинформатического анализа транскриптомных данных были установлены топологические характеристики *ADAMTS6* в ЭМП-ассоциированном регуломе и оценена корреляция уровня его экспрессии с клинико-патологическими характеристиками пациентов с АЛ. Проведенный верификационный этап показал, как нокаут *ADAMTS6* в клетках АЛ влияет на ряд ключевых характеристик, связанных с ЭМП, включая экспрессию генов-маркеров ЭМП, морфологию клеток, их способность к миграции и инвазии, а также лекарственную устойчивость.

Перепрофилирование лекарственных средств направлено на выявление у существующих препаратов способности ингибировать мезенхимальный переход опухолевых клеток. Проведенный анализ литературы показал, что методы системной биологии применялись для перепрофилирования лишь в контексте поиска анти-ЭМП агентов. Адаптация этих методов к

молекулярно-генетическим особенностям клеток ГБ является перспективной задачей для поиска новых анти-ПМП средств (см. п. 1.2.3).

В рамках третьего направления диссертационной работы перепрофилирование, основанное на транскриптомном анализе, было впервые применено для поиска ингибиторов ПМП. Исследование включало разработку генной сигнатуры ПМП на основе ранее опубликованных данных RNA-seq клеток ГБ и топологического анализа генных сетей. Последующий анализ генной сигнатуры ПМП с помощью connectivity map в комплексе с методами сетевой фармакологии (network pharmacology) позволили идентифицировать лидерное соединение с отрицательной связностью к данной сигнатуре, способное проникать через ГЭБ и обладающее наиболее разветвленной сетью связей с регуломом ПМП. Активность лидерного соединения была далее подтверждена на моделях ПМП, индуцированного в клетках ГБ TGF-β1 и гипоксией *in vitro*.

3.1. Исследование способности солоксолон метила (СМ) ингибировать ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека

Перед разработкой ингибиторов ПМП на основе амидов солоксолона следовало ответить на вопрос, целесообразно ли использование солоксолонового остова для подавления мезенхимальной пластичности опухолевых клеток. Для этого была изучена способность исходного соединения СМ ингибировать ЭМП. Наряду с СМ исследовали его производное триоксолон метил (ТМ), несущее в кольцах D – E еноновую группу (Рис. 6А). Мы предположили, что наличие в структуре ТМ дополонительного сайта Михаэля может расширить спектр белковых мишеней тритерпеноида и тем самым усилить его анти-ЭМП потенциал. Основанием для этого предположения послужили ранее полученные данные о более высокой противовоспалительной активности ТМ по сравнению с СМ [322].

3.1.1. Оценка влияния СМ и триоксолон метила (ТМ) на миграцию клеток аденокарциномы легкого человека

Поскольку миграция клеток является одним из ключевых процессов, регулируемых ЭМП, на первом этапе был оценен эффект СМ и ТМ на подвижность клеток меланомы мыши B16 и АЛ человека A549. С помощью МТТ-теста была оценена цитотоксичность СМ и ТМ в отношении этих клеточных линий. Несмотря на наличие дополнительного акцептора Михаэля, ТМ оказался менее токсичным по сравнению с СМ: в концентрации 1 мкМ ТМ снижал жизнеспособность клеток B16 и A549 на 48% и 12%, в то время как для СМ эти значения составляли 96,5% и 48% соответственно (Рис. 8А, Б). В более низких концентрациях (0,06 – 0,5 мкМ) СМ и ТМ не оказывали цитотоксического эффекта, а в случае клеток B16, напротив, даже несколько

повышали их жизнеспособность. Эти результаты согласуются с ранее установленным дозозависимым характером действия цианоенон-содержащих тритерпеноидов: в низких наномолярных концентрациях они оказывают цитопротекторное действие за счет активации сигнального пути NRF2, тогда как в высоких микромолярных концентрациях подавляют пролиферацию клеток и индуцируют апоптоз [323]. Последующий анализ клеточной подвижности был проведен с использованием концентрации 0,5 мкМ для СМ и ТМ, чтобы исключить влияние клеточной гибели на интерпретацию результатов.

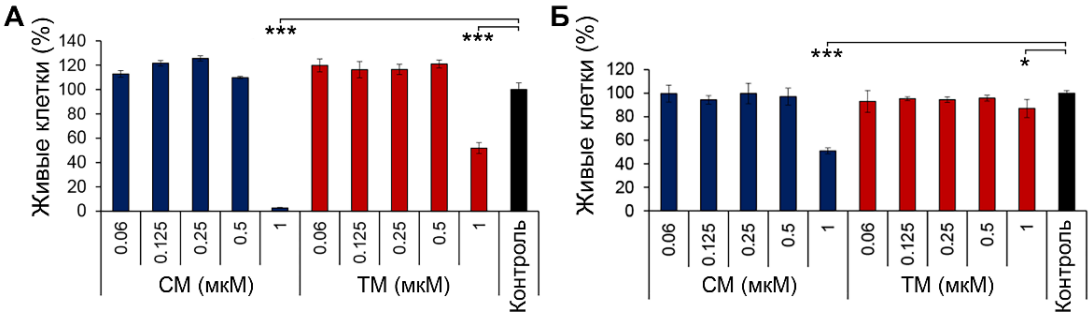

Рисунок 8. Цитотоксичность СМ и ТМ в отношении клеток B16 (**А**) и A549 (**Б**), оцененная через 48 ч инкубации с помощью МТТ-теста. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Миграцию клеток оценивали с помощью теста зарастания царапины после 24 ч инкубации с СМ и ТМ. СМ снижал подвижность клеток B16 и A549 на 8,8% и 19,1% соответственно, тогда как ТМ не оказывал значимого влияния на данный процесс (Рис. 9А, Б). Таким образом, гипотеза об усилении анти-ЭМП активности цианоенон-несущих тритерпеноидов за счет введения дополнительного акцептора Михаэля не получила подтверждения. Возможно, изменение структуры колец D – E при переходе от СМ к ТМ негативно влияет на взаимодействие тритерпеноида с белковыми мишенями, участвующими в регуляции клеточной подвижности.

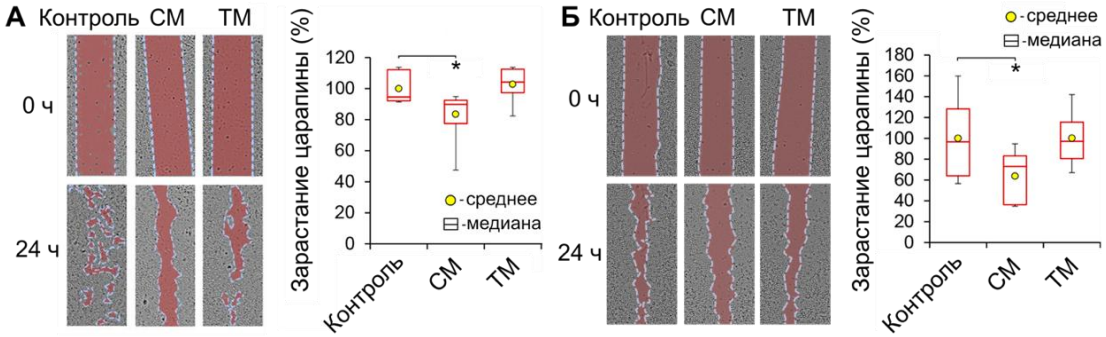

Рисунок 9. Влияние СМ и ТМ на миграцию опухолевых клеток. (**А, Б**) Тест зарастания царапины выполнен на клетках B16 (**А**) и A549 (**Б**), инкубированных в присутствии соединений в

концентарции 0,5 мкМ в течение 24 ч. Увеличение на фотографиях ×40. Данные представлены как среднее значение ± SD. * p < 0,05.

Полученные данные совместно с установленной в нашей лаборатории ранее селективностью цитотоксического действия СМ в отношении опухолевых клеток (индекс селективности = 1,5 – 3,8) [295] указывают на перспективность дальнейшего исследования СМ в контексте ЭМП.

3.1.2. Оценка влияния СМ на TGF-β1-индуцированный ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека

Ингибирующий эффект СМ в отношении клеточной подвижности (Рис. 9) указывает на его потенциальную способность модулировать ЭМП, как это было показано для ряда малых молекул [277,279]. Для верификации этой активности была использована модель ЭМП клеток A549, стимулированного TGF-β1 – одним из наиболее известных индукторов ЭМП в опухолевом микроокружении.

Для определения рабочей концентрации TGF-β1 было оценено влияние этого ростового фактора на ряд клеточных параметров, ассоциированных с ЭМП, включая изменение уровня экспрессии маркерных генов, морфологии клеток и усиление их миграции. Результаты световой микроскопии показали, что контрольные клетки A549 имели округлую форму, тогда как клетки, стимулированные TGF-β1, приобретали более вытянутую, ланцетовидную морфологию (Рис. S1A). При количественном анализе это отражалось в концентрационно-зависимом увеличении коэффициента вытянутости клеток (AR), расчитываемого как отношение длины клеток к их ширине (Рис. 10A).

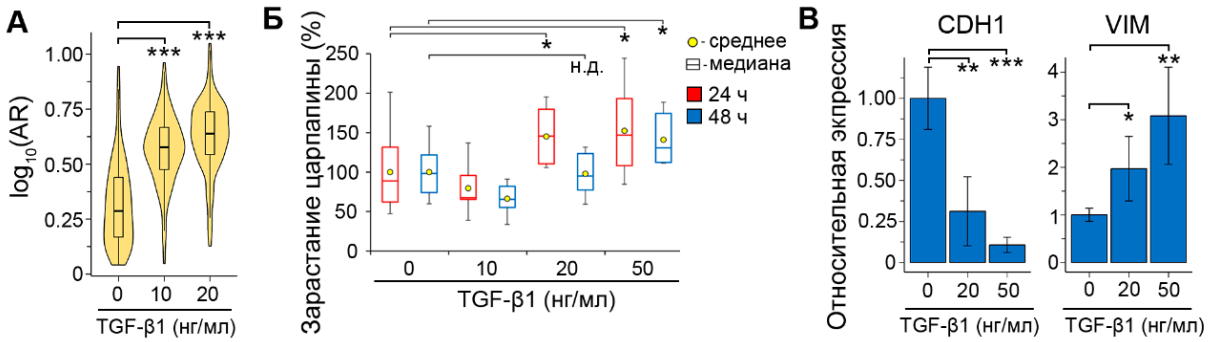

Рисунок 10. Выбор рабочей концентрации TGF-β1 для индукции ЭМП клеток A549. (**А**) Анализ морфологии клеток A549, инкубированных с TGF-β1 (0 – 20 нг/мл) в течение 48 ч, выполненный с помощью световой микроскопии. AR – коэффициент вытянутости, соотношение большой и малой осей клеток. Фотографии репрезентативных клеток показаны на Рис. S1A. (**Б**) Миграция клеток, индуцированных TGF-β1 (0 – 50 нг/мл), определенная с помощью теста зарастания царапины. Фотографии царапин показаны на Рис. S1Б. (**В**) Уровни экспрессии генов-маркеров

ЭМП *CDH1* и *VIM* в клетках A549 спустя 48 ч индукции TGF-β1 (0 – 50 нг/мл), оцененные с помощью RT-qPCR и нормализованные относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, н.д. – статистически недостоверно.

Тест зарастания царапины показал, что концентрация TGF-β1 10 нг/мл недостаточна для индукции клеточной подвижности. При концентрации 20 нг/мл усиление миграции наблюдалось только через 24 ч икубации, тогда как к 48 ч этот эффект исчезал. В то же время увеличение концентрации TGF-β1 до 50 нг/мл обеспечивало устойчивое усиление подвижности клеток на протяжении 48 ч (Рис. 10Б, S1Б).

Учитывая полученные результаты, концентрации TGF-β1 20 и 50 нг/мл были дополнительно протестированы на способность модулировать экспрессию генов-маркеров ЭМП. Анализ данных RT-qPCR показал, что TGF-β1 в обеих концентрациях эффективно подавлял экспрессию *CDH1* и стимулировал экспрессию *VIM* дозозависимым образом (Рис. 10В). Таким образом, TGF-β1 индуцировал ЭМП клеток A549, при этом наиболее выраженный эффект наблюдался при концентрации 50 нг/мл, которая и была выбрана для дальнейших экспериментов с СМ.

Далее был оценен эффект СМ на TGF-β1-индуцированный ЭМП клеток A549. Показано, что СМ частично предотвращает морфологические изменения, вызванные TGF-β1: среднее значение AR у клеток, обработанных TGF-β1 в присутствии СМ, было на 11,3% ниже, чем у клеток, обработанных только TGF-β1, однако оставалось значительно выше, чем в контрольной группе. Примечательно, что СМ в отсутствие TGF-β1 вызывал незначительное удлинение клеток A549 (Рис. 11А).

В тесте зарастания царапины СМ снизил подвижность TGF-β1-индуцированных клеток A549 в 1,4 раза через 24 ч и сохранял этот эффект через 48 ч инкубации (Рис. 11Б). Ингибирующее влияние СМ на клеточную подвижность было верифицировано с помощью трансвелл-системы xCELLigence: клетки A549 высевали в верхнюю камеру CIM-планшета в присутствии или отсутствии TGF-β1 и СМ, а в нижнюю камеру помещали 10% FBS в качестве хемоаттрактанта. Как показано на Рис. 11В, TGF-β1 увеличивал миграцию клеток A549 в 4,3 раза через 24 ч и 1,4 раза через 48 ч по сравнению с контролем, однако СМ полностью блокировал этот эффект.

Кроме этого, с использованием CIM-планшетов было установлено, что TGF-β1 усиливал инвазию клеток A549 сквозь слой матригеля через 24 и 48 ч инкубации с одинаковой эффективностью (примерно в 1,3 раза по сравнению с контролем), однако добавление СМ снижало этот показатель до уровня контрольных клеток. Кроме того, СМ подавлял инвазию клеток A549 в отсутствие TGF-β1 в 1,6 раза через 24 ч, однако этот эффект исчезал к 48 ч инкубации (Рис. 11Г). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности СМ

значительно подавлять изменения морфологии, миграции и инвазии клеток A549, индуцированных TGF-β1.

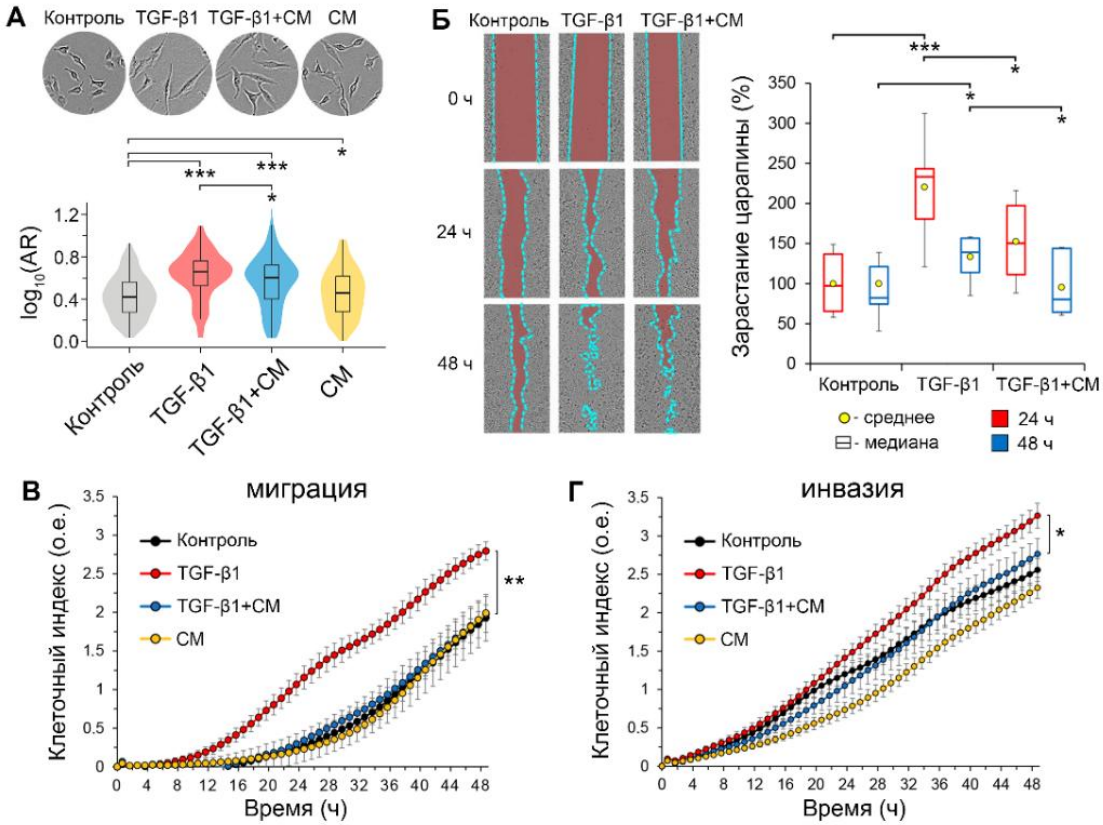

Рисунок 11. Ингибирование ЭМП под действием СМ в клетках АЛ. (**А**) Морфологический анализ клеток A549, индуцированных TGF-β1 (50 нг/мл) и СМ (0,5 мкМ) в течение 48 ч, выполненный с помощью световой микроскопии. Увеличение на фотографиях ×400. AR – оценка вытянутости, соотношение большой и малой осей клеток. (**Б**) Миграция клеток A549 через 24 и 48 ч инкубации с TGF-β1 и СМ, определенная с помощью теста зарастания царапины. Увеличение на фотографиях ×100. (**В, Г**) Миграция (**В**) и инвазия через матригель (**Г**) клеток A549, индуцированных TGF-β1 и СМ, оцененная в режиме реального времени с использованием трансвелл-системы xCELLigence. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Далее было проанализировано влияние СМ на изменение уровней эпителиальных (CDH1, TJP1) и мезенхимальных (FN1, VIM) маркеров на фоне действия TGF-β1. По данным RT-qPCR, добавление СМ к TGF-β1-индуцированным клеткам A549 приводило к 3,3-кратному повышению уровня мРНК *CDH1* и 1,9-кратному снижению уровня мРНК *FN1*. Экспрессия гена *VIM* под влиянием СМ демонстрировала тенденцию к снижению, однако этот эффект не был статистически значимым (Рис. 12А). Результаты проточной цитометрии показали, что инкубация клеток A549 с TGF-β1 снижала уровень белка TJP1 (ZO-1), тогда как добавление СМ возвращало

его к контрольному значению. Интересно, что и в отсутствие TGF-β1 СМ увеличивал уровень TJP1 в клетках A549 (Рис. 12Б). Эти данные подтверждают способность СМ ослаблять молекулярные изменения в клетках АЛ, ассоциированные с ЭМП.

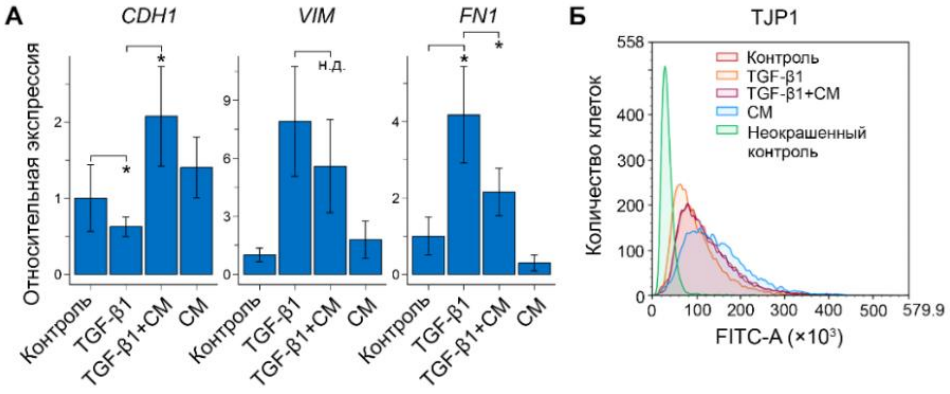

Рисунок 12. Изменение уровней молекулярных маркеров ЭМП под действием СМ в TGF-β1-индуцированных клетках A549. Клетки обрабатывали TGF-β (50 нг/мл) и/или СМ (0,5 мкМ) в течение 48 ч, после чего оценивали уровни мРНК *CDH1*, *VIM* и *FN1* с помощью RT-qPCR (**А**) и уровень белка TJP1 с помощью проточной цитометрии (**Б**). При оценке уровней мРНК проведена нормализация по уровню мРНК гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, н.д. – статистически недостоверно.

Таким образом, полученные результаты показывают, что СМ ингибирует TGF-β1-индуцированный ЭМП в клетках АЛ человека. Это подтверждает перспективность использования солоксолонового остова как платформы для создания ингибиторов мезенхимальной пластичности опухолевых клеток, в том числе для подавления ПМП в клетках ГБ.

3.2. Исследование способности СМ ингибировать лептин-индуцированное усиление метастатического потенциала клеток нейробластомы мыши

Известно, что экспрессия гена *LEP*, кодирующего лептин, повышается в опухолях пациентов с НБ по мере перехода заболевания на поздние стадии. Данный адипокин играет важную роль в прогрессировании НБ: он переключает метаболизм опухолевых клеток с окислительного фосфорилирования на гликолиз, усиливает их пролиферацию и способствует формированию проопухолевого микроокружения [24]. Хотя лептин способен индуцировать ЭМП и усиливать метастазирование в опухолях эпителиального происхождения (см. п. 1.2.1.4), его прометастатический эффект в отношении НБ ранее не исследовался. В рамках данной работы была сформулирована гипотеза, что лептин может запускать НМП клеток НБ, увеличивая тем самым их способность к метастазированию. Наряду с исследованием влияния лептина на

ключевые свойства клеток НБ, связанные с НМП, была также изучена возможность модуляции этого процесса с помощью СМ. Выбор СМ был обусловлен его анти-ЭМП активностью, показанной выше (см. п. 3.1.2), а также ранее установленным цитотоксическим действием в отношении клеток НБ ($IC_{50}^{Neuro2a}$ = 1,4 ± 0,1 мкМ) [17].

3.2.1. Исследование влияния лептина на НМП клеток нейробластомы мыши

Была оценена способность лептина индуцировать фенотипические изменения в клетках НБ, типичные для НМП. Известно, что НМП сопровождается изменением морфологии клеток НБ: они становятся более вытянутыми, и на их поверхности появляются ламеллоподии [190,192]. Однако после 48 ч инкубации с 400 нг/мл лептина не наблюдалось изменений формы или размера клеток Neuro2a (Рис. 13А, S2A). Кроме того, клетки сохранили нейриты, характерные для норадренергического фенотипа [324] (Рис. 13Б, S2Б).

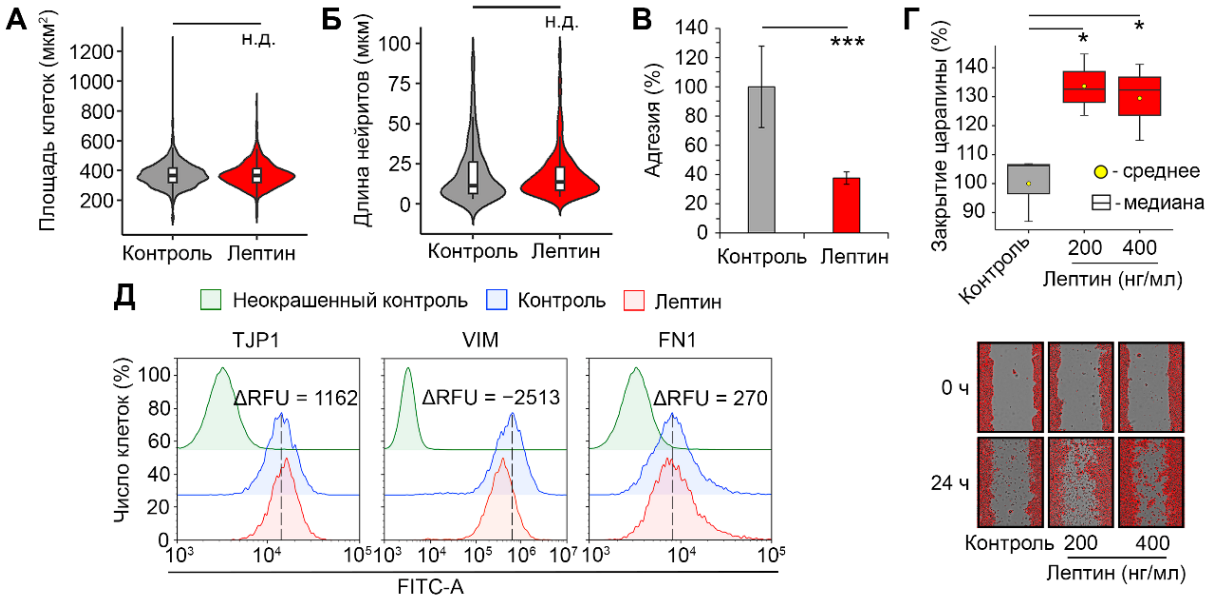

Рисунок 13. Влияние лептина на фенотип клеток НБ. (**А**, **Б**) Площадь клеток Neuro2a (**А**) и длина нейритов (**Б**), оцененные с помощью световой микроскопии через 48 ч инкубации с лептином (400 нг/мл). Фотографии репрезентативных клеток показаны на Рис. S2A, Б. (**В**) Адгезия клеток Neuro2a к матригелю после 24 ч инкубации с лептином (400 нг/мл). (**Г**) Миграция клеток Neuro2a, оцененная с помощью теста зарастания царапины после 24 ч стимуляции лептином. (**Д**) Уровни белков TJP1, VIM и FN1 в клетках Neuro2a после 48 ч инкубации с лептином (400 нг/мл), оцененные с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; н.д. – статистически недостоверно.

Мезенхимальные клетки НБ, по сравнению с норадренергическими, обладают более сильной адгезией к субстрату [190] и подвижностью [190,192,194]. Примечательно, что после 24 ч инкубации с лептином адгезия клеток Neuro2a к планшетам, покрытым матригелем, снизилась в

2,7 раза (Рис. 13В), тогда как их миграционная активность повысилась более чем на 30% по сравнению с контролем (Рис. 13Г). Эти результаты показывают, что характер фенотипических изменений, вызванных лептином, отличается от наблюдаемого при НМП, поскольку клетки НБ, несмотря на значительное усиление подвижности, сохраняют многие черты норадренергического фенотипа, включая характерную морфологию и низкую адгезивность.

С помощью проточной цитометрии было оценено влияние лептина на уровень молекулярных маркеров ЭМП. Выявлено, что 48-часовая инкубация клеток Neuro2a с лептином приводила к повышению уровня эпителиального маркера TJP1, тогда как содержание мезенхимальных маркеров VIM и FN1 снизилось и не изменилось соответственно (Рис. 13Д). Это показывает, что, в отличие от нашей гипотезы, лептин сдвигает фенотип клеток НБ от мезенхимального к эпителиальноподобному норадренергическому состоянию, что согласуется с результатами функциональных экспериментов (Рис. 13А – В). Кроме того, поскольку VIM является важным регулятором клеточной адгезии к ВКМ [67], снижение его уровня может частично объяснять уменьшение доли прикрепленных клеток НБ к матригелю, наблюдаемое под действием лептина (Рис. 13В).

Фенотипические изменения, запускаемые лептином в клетках НБ, могут отражать начальную стадию метастазирования, когда опухолевые клетки теряют адгезию к базальной мембране и мигрируют в кровеносные сосуды [325]. Во многих типах опухолей метастазирование ассоциировано с ЭМП злокачественных клеток (см. п. 1.1.5). В случае же НБ, согласно полученным данным, лептин, напротив, стимулирует переход клеток в более эпителиальноподобное состояние. Это позволяет предположить, что лептин индуцирует метастатический потенциал клеток НБ посредством механизма, независимого от НМП.

3.2.2. Оценка влияния СМ на лептин-индуцированное усиление метастатического потенциала клеток НБ

Далее было исследовано влияние СМ на изменение фенотипа клеток НБ, индуцированное лептином. Чтобы исключить неспецифические эффекты, обусловленные цитотоксичностью СМ [17], в экспериментах использовали нетоксичную концентрацию соединения. По результатам МТТ-теста в качестве рабочей была выбрана концентрация 0,1 мкМ, поскольку более высокие концентарции СМ достоверно снижали жизнеспособность клеток Neuro2a более чем на 20% (Рис. 14А). На следующем этапе было изучено действие СМ на характеристики клеток НБ, изменяемые под влиянием лептина: адгезивность, подвижность и уровни маркеров ЭМП (Рис. 13Б – Д). Было установлено, что СМ блокирует ингибирующий эффект лептина на адгезию клеток Neuro2a к культуральному пластику и подложкам, имитирующим ВКМ (покрытым коллагеном или матригелем) (Рис. 14Б), не влияя при этом на индуцированное лептином усиление клеточной

миграции (Рис. 14В). Проточная цитометрия показала, что СМ восстанавливает уровень белка VIM в клетках Neuro2a, инкубированных с лептином, практически до контрольного уровня. Напротив, тритерпеноид усиливал стимулирующий эффект лептина в отношении уровня TJP1 (Рис. 14Г). Таким образом, СМ модулировал отдельные функциональные свойства клеток НБ, регулируемые лептином. Восстановление адгезии под действием СМ может быть связано с повышением уровней белков VIM и TJP1, участвующих в адгезии клеток к ВКМ [326] и формировании межклеточных контактов соответственно [58,59]. Этот эффект может иметь терапевтическое значение, поскольку он позволяет предотвратить открепление клеток НБ от первичной опухоли во время метастазирования [325]. Вместе с тем СМ не влиял на клеточную подвижность, имеющую не менее важное значение для метастазирования.

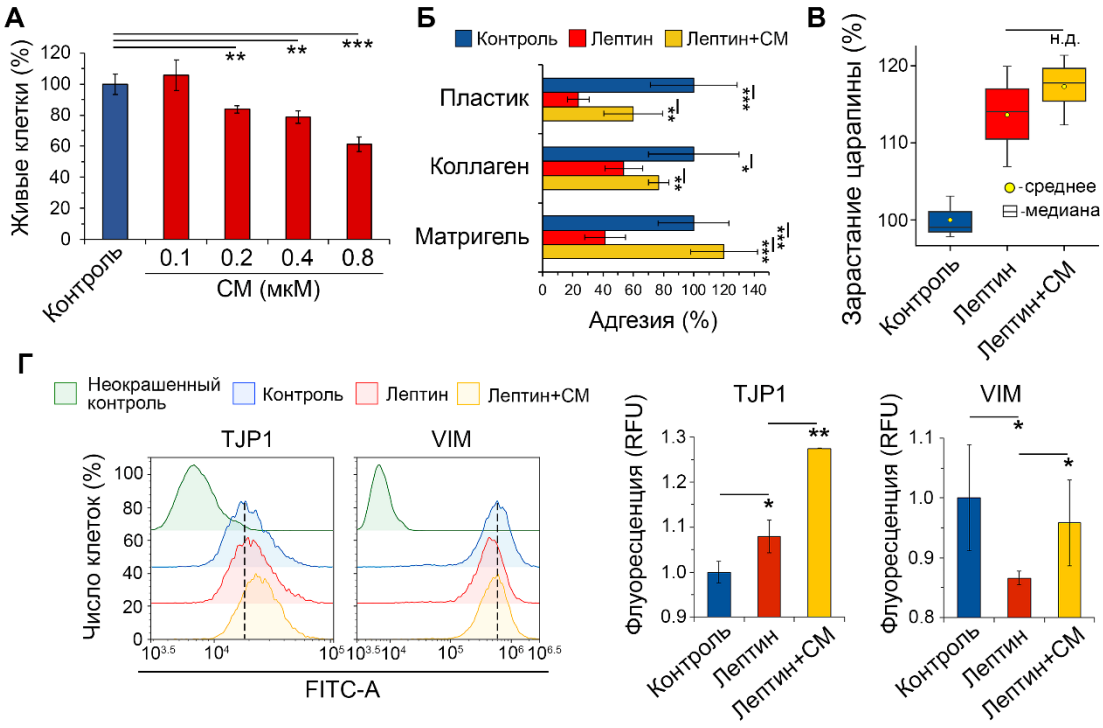

Рисунок 14. Влияние СМ на лептин-индуцированное изменение фенотипа клеток НБ. (**А**) Жизнеспособность клеток Neuro2a, оцененная после 48 ч инкубации с СМ. (**Б**) Адгезия клеток Neuro2a к матригелю, коллагену и культуральному пластику после 24 ч инкубации с лептином и СМ. (**В**) Миграция клеток Neuro2a после 48 ч инкубации с лептином и СМ, оцененная с помощью теста зарастания царапины. (**Г**) Уровни белков TJP1 и VIM в клетках Neuro2a после 48 ч индукции лептином и СМ, оцененные методом проточной цитометрии. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.3. Исследование молекулярного механизма действия лептина и СМ в клетках НБ

Для раскрытия молекулярного механизма разнонаправленного влияния лептина и СМ на метастатический потенциал клеток НБ был проведен ряд анализов. Активацию сигнальных путей

PI3K/AKT и ERK1/2, играющих ключевую роль в передаче сигналов от рецептора лептина LEPR [266–268], оценивали с помощью коммерческого коктейля антител к фосфорилированным формам компонентов сигнальных путей AKT и MAPK и нормировочному белку RAB11 (Abcam), используя Вестерн-блоттинг. Как видно из Рис. 15А, Б, лептин (400 нг/мл) увеличивал уровни фосфорилирования ERK1/2 и его эффектора рибосомальной протеинкиназы S6 альфа-1 (RSK1) в клетках Neuro2a в 1,5 раза через 30 мин. Однако предварительная инкубация клеток с CM (0,1 мкМ) в течение 1 ч перед добавлением лептина полностью отменяла лептин-индуцированную активацию ERK1/2 и RSK1. Уровни фосфорилированных форм AKT и рибосомального белка S6 (RPS6), расположенного ниже в сигнальном каскаде PI3K/AKT, не изменялись под действием лептина или CM (Рис. S3). Полученные данные показывают, что эффекты лептина и CM в клетках Neuro2a, по крайней мере частично, реализуются через сигнальную ось LEPR/ERK1/2/RSK1.

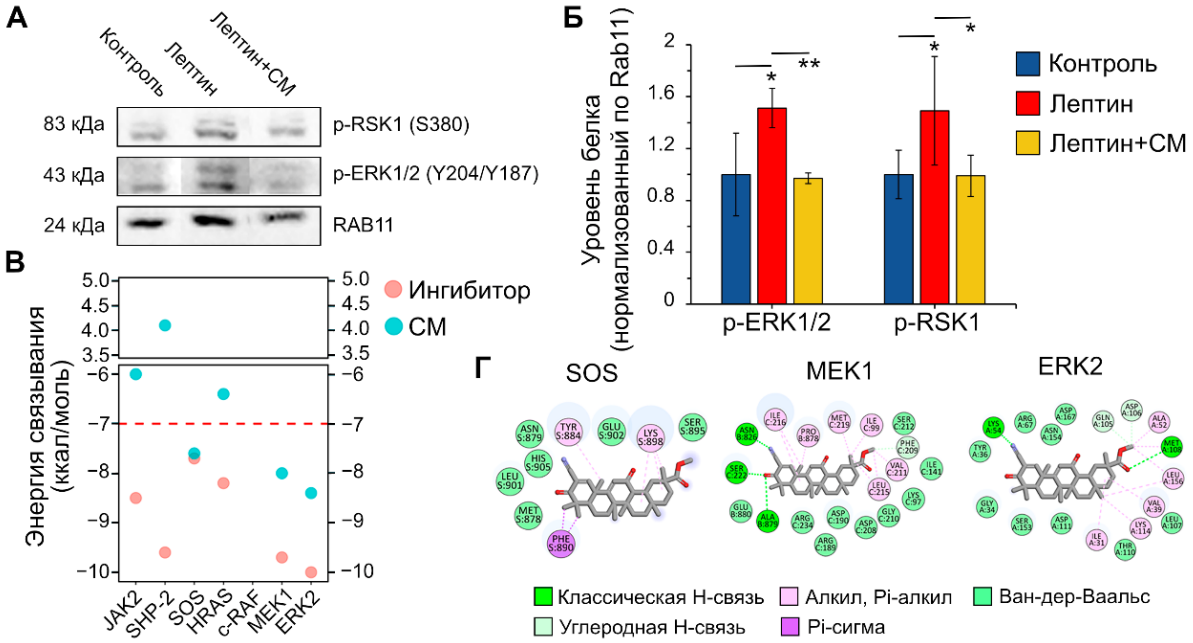

Рисунок 15. Ингибирование сигнальной оси LEPR/ERK1/2/RSK1 под действием CM. (**А**) Уровни фосфорилированных форм ERK1/2 (Tyr204/Tyr187) и RSK1 (Ser380), а также белка RAB11 в клетках Neuro2a, предобработанных CM (0,1 мкМ) в течение 1 ч, а затем индуцированных лептином (400 нг/мл) в течение 30 мин, оцененные с помощью Вестерн-блоттинга. Оригиналы блотов приведены на Рис. S3. (**Б**) Уровень p-ERK1/2 и p-RSK1 относительно контроля загрузки RAB11. (**В**) Энергия связывания CM с SOS, MEK1 и ERK2, рассчитанная с помощью AutoDock Vina. Для сравнения приведены энергии связывания известных ингибиторов (таблица 7). Красная линия указывает пороговое значение аффинности, ниже которого связывание считается сильным. (**Г**) Предполагаемые взаимодействия CM с SOS, MEK1 и ERK2, визуализированные с помощью Discovery Studio Visualizer. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Мы предположили, что ингибирующий эффект СМ на активацию ERK1/2 может быть связан с его прямым взаимодействием с данными киназами или их вышестоящими регуляторами в сигнальной оси LEPR/ERK1/2. Молекулярный докинг показал, что СМ может формировать комплексы с тремя компонентами данной оси, включая фактор обмена гуаниновых нуклеотидов SOS, киназы MEK1 и ERK2, с энергиями связывания (ΔG), сопоставимыми с таковыми известных ингибиторов этих белков (Рис. 15В). Рисунок 15Г показывает детали взаимодействия СМ и предполагаемых мишеней. Карман связывания СМ в SOS был аналогичен карману связывания известного ингибитора SOS CHEMBL4166974 и содержал Pi-алкильные и Pi-сигма взаимодействия с Tyr884, Lys898 и Phe890, которые участвуют в формировании контактной поверхности между SOS и HRAS [327]. В случае MEK1 СМ связывался в сайте его взаимодействия со скаффолд-белком KSR2, образуя водородные связи с Ser222 MEK1, играющим ключевую роль в активации MEK1 [328], и с остатками Asn826 и Ala879 в KSR2. В случае ERK2 СМ образовал водородные связи с Lys54, который входит в состав каталитического мотива K/D/D [329], и с Met108, опосредующим связывание ERK2 с рядом низкомолекулярных ингибиторов [330].

Полученные результаты указывают на то, что наблюдаемый ингибирующий эффект СМ в отношении ERK1/2 в клетках Neuro2a может быть опосредован его прямым взаимодействием с SOS, MEK1 или ERK2. Аналогичный механизм действия ранее был описан для других пентациклических тритерпеноидов. Согласно данным *in silico*, хинолиновое производное урсоловой кислоты **4d** и илексгенин А связываются с MEK1 и ERK1/2 соответственно, что коррелирует с их действием *in vitro*: **4d** ингибирует киназную активность MEK1, снижая фосфорилирование ERK1/2 и RSK1 в клетках РШМ человека, а илексгенин А подавляет LPS-индуцированную активацию ERK1/2 в макрофагах мыши [331,332]. Подавление сигнального пути LEPR/SOS/MEK1/ERK2 под действием СМ может также лежать в основе восстановления адгезивной способности лептин-индуцированных клеток Neuro2a, наблюдаемого при их инкубации с СМ (Рис. 14Б). Ранее было показано, что ингибитор MEK1 PD98059 эффективно усиливает адгезию клеток ГБ к ВКМ [333].

Полученные данные показывают, что СМ эффективно подавляет усиление подвижности опухолевых клеток, вызванное TGF-β1, но не лептином (Рис. 11Б – Г, 14В). Вероятно, это связано с различиями в механизмах действия данных факторов: TGF-β1 индуцирует ЭМП клеток АЛ, тогда как лептин регулирует фенотип клеток НБ независимо от ЭМП (Рис. 10, 13). Таким образом, СМ способен модулировать различные аспекты фенотипической пластичности опухолевых клеток, проявляя избирательность в отношении ЭМП-ассоциированных механизмов метастазирования. Это указывает на необходимость дальнейшего изучения фенотип-

модулирующих эффектов тритерпеноидов солоксолоновой группы, например, в отношении ПМП клеток ГБ.

3.3. Исследование способности амидных производных СМ ингибировать ПМП клеток глиобластомы человека

Выявленная способность СМ ингибировать ЭМП в клетках A549 (Рис. 11, 12) свидетельствует о перспективности данного тритерпеноида в качестве платформы для разработки ингибиторов ПМП клеток ГБ. Основным ограничением применения СМ в терапии ГБ является его слабое проникновения через ГЭБ [17,293]. Ранее для структурного изомера СМ, CDDO-Me, были получены производные с лучшим профилем накопления в мозге мышей за счет замены метилового эфира на амидные группы [293,294] (Рис. 5Б). Группой к.х.н. Саломатиной О. В. из НИОХ СО РАН была проведена аналогичная модификация структуры СМ в положении C-30, в результате чего была синтезирована серия амидов солоксолона. Девять молекул из этой серии обладали высоким потенциалом прохождения через ГЭБ (по данным *in silico*) и сопоставимой с СМ цитотоксичностью в отношении клеток ГБ (IC_{50} = 1,5 – 7,0 мкМ) (Рис. 6Б). Для солоксолон триптамида из этой серии (**9** на Рис. 6Б) было показано, что он накапливается в мозге мышей до концентрации 490 нг/г при семикратном внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг [17]. В рамках настоящей диссертационной работы был исследован анти-ПМП потенциал данных амидов солоксолона с помощью фенотип-ориентированного подхода (см. п. 1.2.2).

3.3.1. Скрининг ингибирующей активности амидов солоксолона в отношении ПМП клеток глиобластомы человека

Скрининг анти-ПМП потенциала амидов солоксолона проводили путем оценки их способности подавлять изменения морфологии и межклеточной адгезии клеток ГБ при ПМП. Для минимизации влияния клеточной гибели на результаты скрининга были выбраны нетоксичные рабочие концентрации соединений. На основе проведенного МТТ-анализа амиды солоксолона были классифицированы на три группы в соответствии с уровнем цитотоксичности в отношении клеток U87 после 48 ч инкубации: группа 1 (соединения **1**, **3** и **4**) показала низкую, группа 2 (**2**, **6** и **9**) – умеренную, а группа 3 (**5**, **7** и **8**) – высокую цитотоксичность (Рис. 16А). Примечательно, что наиболее активные соединения содержали бензольное кольцо с липофильными заместителями: бромом (**5**), метильной (**7**) и трет-бутильной (**8**) группами. В то же время соединения с умеренной цитотоксичностью (**2**, **6**, **9**) включали фрагменты, способные формировать водородные связи, выступая либо как доноры водорода за счет кислотности связей O-H (**2**) и N-H (**9**), либо как акцепторы водорода благодаря основности атома азота пиридинового кольца (**6**). Наименее токсичными оказались соединения **1**, **3** и **4**, имеющие заместители, которые

также способны выступать в качестве акцепторов водорода благодаря неподеленным парам электронов гетероатомов, однако их способность к образованию водородных связей выражена значительно слабее по сравнению с соединением **6** из группы 2.

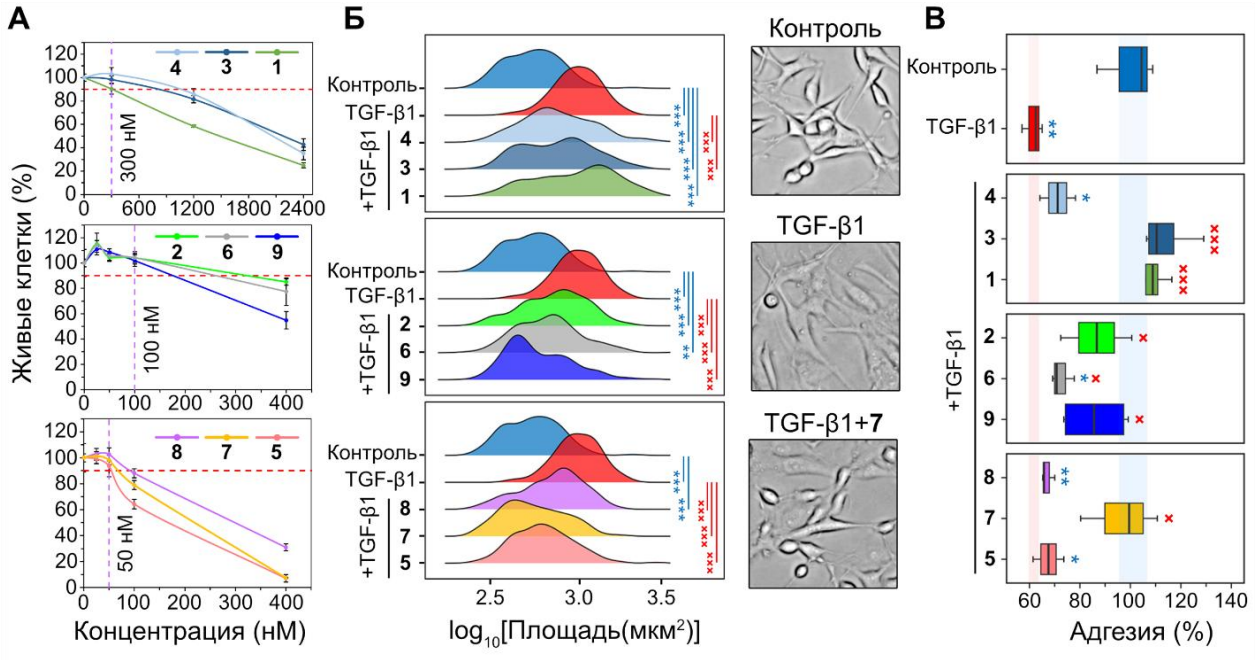

Рисунок 16. Скрининг библиотеки амидов солоксолона с целью выявления соединений, ингибирующих ПМП. (**А**) Цитотоксичность амидов солоксолона в отношении клеток U87, оцененная с помощью МТТ-теста через 48 ч. Фиолетовая пунктирная линия показывает нетоксичные концентрации, вызывающие гибель менее 10% клеток (выше красной пунктирной линии по оси OY). (**Б**) Анализ клеточной морфологии после 48 ч инкубации с TGF-β1 и нетоксичными концентрациями амидов солоксолона, выполненный с помощью световой микроскопии. Увеличение на фотографиях ×200. Количественная оценка площади клеток выполнена в ImageJ. (**В**) Анализ межклеточной адгезии (трипсиновый тест) клеток U87, индуцированных TGF-β1 (50 нг/мл) и амидами солоколона (нетоксичные концентрации) в течение 48 ч. Данные представлены как среднее значение ± SD. Статистическая значимость рассчитывалась путем сравнения с контрольной группой (отмечена синей звездочкой (*)) или TGF-β1-индуцированной группой (отмечена красным крестом (×)). */× $p < 0,05$, **/×× $p < 0,01$, ***/××× $p < 0,001$.

На основе полученных цитотоксических профилей для дальнейшего скрининга были выбраны нетоксичные концентрации соединений, подавлявшие жизнеспособность клеток U87 менее чем на 10%, а именно 300 нМ, 100 нМ и 50 нМ для соединений из групп 1, 2 и 3 соответственно (Рис. 16А).

Ранее ПМП-ингибирующее действие CDDO-Me было изучено лишь на интактных клетках ГБ [13]. Существенным недостатком такого подхода является то, что он не учитывает стимулирующее влияние факторов микроокружения на процесс ПМП [174–178]. В настоящей работе для проведения скрининга в условиях, более приближенных к *in vivo*, ПМП индуцировали в клетках U87 путем инкубации с 50 нг/мл TGF-β1, как было показано ранее [175]. Одновременно с этим добавляли нетоксичные концентрации амидов солоксолона и через 48 ч исследовали изменения морфологии и адгезии клеток. Анализ клеточной морфологии с помощью световой микроскопии показал, что под действием TGF-β1 площадь клеток U87 увеличилась на 76% (Рис. 16Б), что связано с более сильным распластыванием (спредингом) клеток на субстрате при приобретении ими мезенхимального фенотипа [168]. Инкубация TGF-β1-индуцированных клеток со всеми исследуемыми соединениями приводила к сдвигу распределения клеток по площади в сторону меньших значений. При этом соединения **5**, **7** и **9** восстанавливали данную морфологическую характеристику до уровня контрольных нестимулированных клеток (Рис. 16Б). Оценку межклеточной адгезии проводили путем инкубации монослоя клеток U87 с 5% TrypLE (рекомбинантным аналогом трипсина) с последующим удалением открепившихся клеток промывкой PBS и количественным анализом оставшихся адгезированных клеток после окрашивания кристаллическим фиолетовым. Инкубация с TGF-β1 снизила адгезию клеток на 38,5% по сравнению с контролем, что согласуется с предыдущими исследованиями [12]. Большинство амидов солоксолон, за исключением **4**, **5** и **8**, значительно повысили межклеточную адгезию TGF-β1-индуцированных клеток, при этом соединения **1**, **3** и **7** восстановили её до контрольного уровня (Рис. 16В).

По результатам двух тестов лишь соединение **7** (пара-метиланилид солоксолона (пМАС)) одновременно блокировало морфологические изменения и потерю межклеточной адгезии, вызванные TGF-β1, что указывает на его наиболее выраженный анти-ПМП потенциал среди проанализированных молекул. Данное соединение-лидер было выбрано для более детального изучения его ПМП-ингибирующей активности и лежащих в ее основе молекулярных механизмов. Дополнительным достоинством пМАС как потенциального лекарственного препарата является его низкая токсичность в отношении неопухолевых клеток, фибробластов человека hFF3, по сравнению с опухолевыми клетками ГБ U87 (IC_{50}^{hFF3} > 3,2 мкМ, IC_{50}^{U87} = 160,6 нМ) (Рис. S4).

3.3.2. Оценка влияния пара-метиланилид солоксолона (пМАС) на TGF-β1-индуцированный ПМП клеток глиобластомы человека

Далее была верифицирована способность пМАС ингибировать ПМП с использованием расширенной панели фенотипических маркеров этого процесса в клетках ГБ, включая

увеличение адгезии к ВКМ, усиление клеточной подвижности и экспрессию генов-маркеров ПМП [168–172]. Инкубация клеток U87 с TGF-β1 в течение 48 ч приводила к повышению адгезии клеток к матригелю в 2,3 раза, в то время как добавление пМАС совместно с TGF-β1 снижало этот показатель практически до контрольного уровня (Рис. 17А).

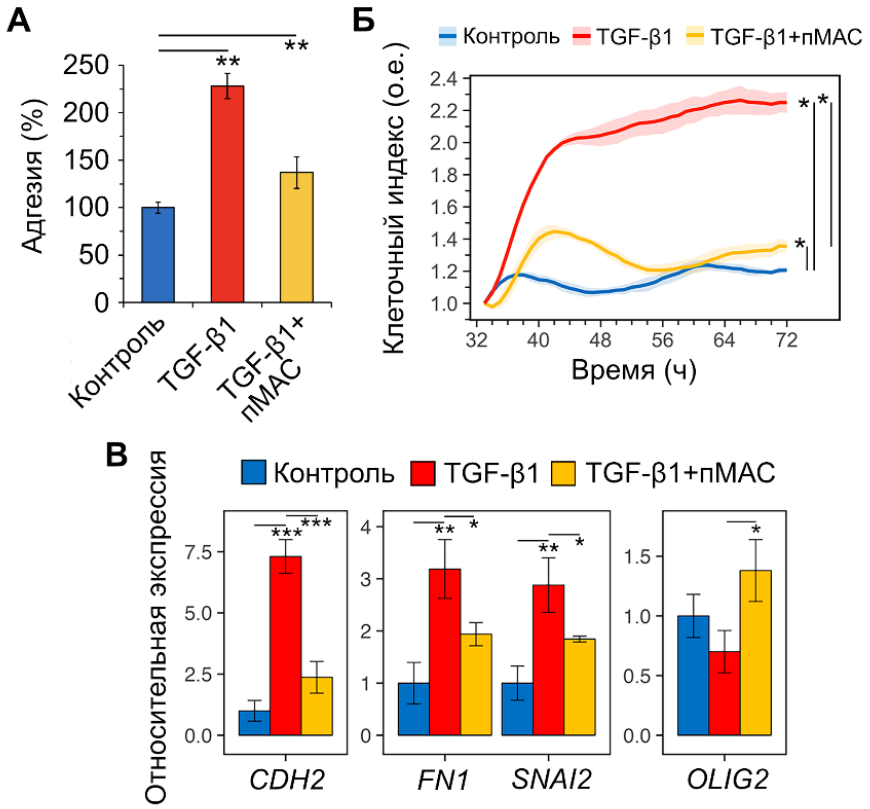

Рисунок 17. Анализ ПМП-ингибирующей активности пМАС. Клетки U87 инкубировали с TGF-β1 (50 нг/мл) и пМАС (50 нМ) в течение 48 ч, после чего анализировали ПМП-ассоциированные фенотипические характеристики. (**А**) Адгезия клеток U87 к матригелю. (**Б**) Миграция клеток U87, оцененная в режиме реального времени с использованием трансвелл-системы xCELLigence. (**В**) Экспрессия генов-маркеров ПМП в клетках U87, оцененная методом RT-qPCR и нормализованная по гену домашнего хозяйства *HPRT*. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Для оценки миграционной активности клетки U87, предварительно инкубированные с TGF-β1 и пМАС в течение 48 ч, помещали в CIM-планшеты и контролировали их проникновение сквозь пористую мембрану с помощью системы xCELLigence в течение 72 ч. Как видно из Рис. 17Б, предынкубация клеток U87 с TGF-β1 значительно увеличила их подвижность, которая достигла 186% от уровня контрольных нестимулированных клеток через 66 ч наблюдения. Добавление пМАС привело к снижению подвижности TGF-β1-индуцированных клеток в 1,7 раза, приблизив её к контрольному уровню (Рис. 17Б).

Результаты RT-qPCR анализа согласовались с данными функциональных тестов. Инкубация клеток U87 в присутствии TGF-β1 в течение 48 ч приводила к достоверному усилению экспрессии мезенхимальных генов *CDH2*, *FN1* и *SNAI2* в 7,3, 3,2 и 2,9 раза соответственно, тогда как добавление пМАС снижало эти эффекты на 67,6%, 39,2% и 35,8% соответственно (Рис. 17В). Кроме того, индукция TGF-β1 не оказывала значимого влияния на экспрессию пронейрального гена *OLIG2*. Однако добавление пМАС достоверно увеличивало уровень его экспрессии в два раза в TGF-β1-индуцированных клетках U87 (Рис. 17В).

Таким образом, полученные результаты показывают, что пМАС эффективно ингибирует TGF-β1-индуцированный ПМП в клетках ГБ человека, сдвигая их фенотип в сторону пронейрального, который ассоцирован с более благоприятным прогнозом выживаемости у пациентов [166].

3.3.3. Исследование молекулярного механизма ингибирования ПМП клеток глиобластомы под действием пМАС

На следующем этапе был изучен молекулярный механизм действия пМАС в отношении TGF-β1-индуцированнного ПМП в клетках ГБ. Как известно, сигнальный путь TGF-β1 включает связывание TGF-β1 с рецептором TGF-β типа II (TβRII), что приводит к активации рецептора TGF-β типа I (TβRI) и последующему фосфорилированию нижележащих SMAD2 и SMAD3. В дальнейшем фосфорилированные SMAD2/3, образуя комплекс со SMAD4, транслоцируются в ядро, где функционируют в качестве факторов транскрипции, индуцируя экспрессию ПМП-ассоциированных генов (см. п. 1.1.2).

Для оценки влияния пМАС на ядерную транслокацию SMAD2/3 в клетках U87 были использованы иммунофлуоресцентное (ИФ) окрашивание и конфокальная микроскопия. Как показано на Рис. 18А, в контрольных клетках U87 SMAD2/3 характеризовались преимущественно цитоплазматической локализацией и слабым уровнем флуоресценции. Стимуляция клеток TGF-β1 в течение 1 ч приводила к выраженному перемещению SMAD2/3 в ядро (Рис. 18А), о чем свидетельствует 3,3-кратное увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения сигнала (Рис. 18Б). Предынкубация клеток с пМАС в течение 48 ч до стимуляции TGF-β1 существенно ослабляла данный эффект, снижая ядерно-цитоплазматическое соотношение SMAD2/3 на 52% по сравнению с группой, активированной TGF-β1 (Рис. 18Б). Неполная блокировка ядерной трансклокации SMAD2/3 под действием пМАС согласуется со статистически значимым, но не полным, ингибированием данным соединением экспрессии SMAD2/3-зависимых генов *CDH2*, *FN1* и *SNAI2* в TGF-β1-стимулированных клетках U87 (Рис. 17В).

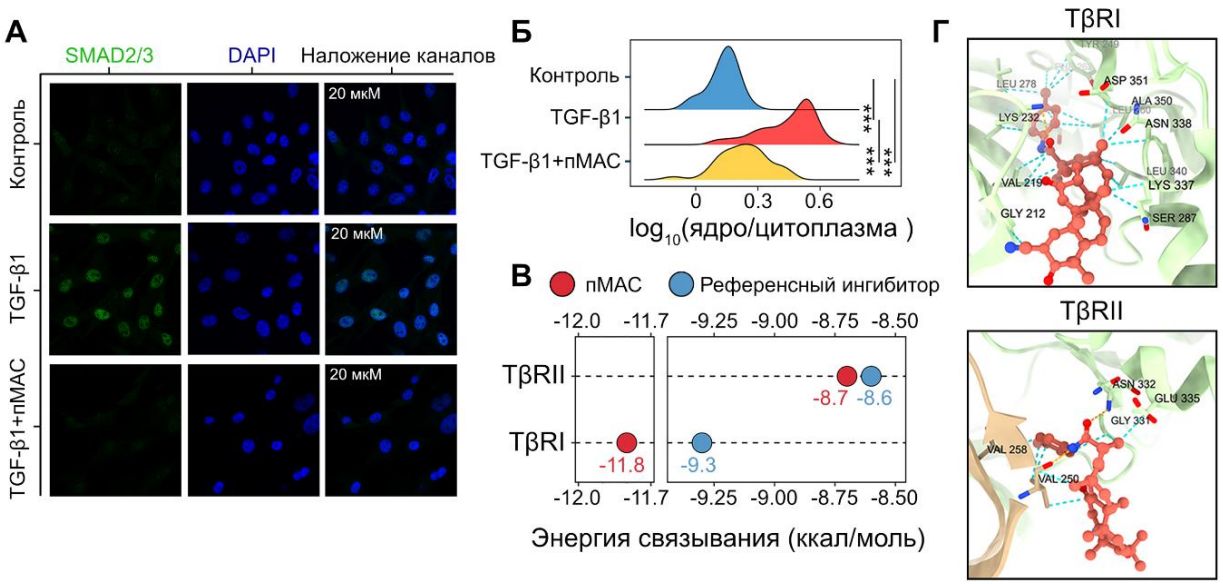

Рисунок 18. Ингибирование сигнального пути TGF-β1/SMAD2/3 под действием пМАС. (**А**) ИФ-окрашивание SMAD2/3 (зеленый) и окрашивание ядер DAPI (синий) в клетках U87 после инкубации с пМАС в течение 48 ч и последующей активации TGF-β1 в течение 1 ч. (**Б**) Распределение SMAD2/3 в клетках U87, выраженное как отношение ядерной флуоресценции к цитоплазматической. (**В**) Энергии связывания пМАС с киназными доменами TβRI и TβRII, оцененные с помощью AutoDock Vina. Для сравнения приведены значения аффинности известных ингибиторов рецепторов (таблица 7). (**Г**) Трехмерные модели взаимодействия пМАС с TβRI и TβRII, визуализированные с помощью ChimeraX. Оранжевые и голубые пунктирные линии обозначают водородные связи и взаимодействия Ван-дер-Ваальса соответственно. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Можно предположить, что пМАС ингибирует транслокацию SMAD2/3 в ядро посредством прямого взаимодействия с рецепторами TGF-β. Молекулярный докинг показал, что пМАС способен связываться с киназными доменами TβRI и TβRII, причем значения ΔG оказались сопоставимыми с таковыми для ранее описанных ингибиторов TβRI/II или несколько ниже их (Рис. 18В). Как показано на Рис. 18Г, пМАС глубоко проникал в гидрофобный карман киназного домена TβRI, тогда как в случае TβRII он располагался вблизи входа в киназный домен. Это обусловило более высокое сродство соединения к TβRI (ΔG = −11,8 ккал/моль) по сравнению с TβRII (ΔG = −8,7 ккал/моль). Данное различие согласуется с большей стабилизацией комплекса TβRI-пМАС за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий (24 взаимодействия в TβRI против 8 в TβRII). Кроме того, пМАС формировал одну водородную связь с остатком Lys232 в TβRI, который играет критическую роль в киназной активности этого рецептора [334], а также две водородные связи с остатками Val250 и Asn332 в TβRII, ранее описанные как участники связывания его ингибиторов [335,336] (Рис. 18Г).

Таким образом, пМАС ингибирует ПМП клеток ГБ за счет подавления сигнального пути TGF-β1/SMAD2/3. Интересно, что на клеточных моделях CDDO и CDDO-Me либо не оказывают эффекта, либо, наоборот, активируют данный путь [337–339]. Ряд фармакологических ингибиторов TβRI эффективно блокировал ЭМП *in vitro* и подавлял опухолевую прогрессию *in vivo*. Среди них галусинертиб проходил клинические испытания II фазы и показал положительное влияние на выживаемость пациентов с ГЦК (см. п. 1.2.1.1). Это указывает на перспективность изучения пМАС как ингибитора TβRI; в будущих исследованиях следует экспериментально верифицировать его связывание с TβRI и влияние на киназную активность данного рецептора.

3.3.4. Исследование влияния пМАС на чувствительность клеток глиобластомы к цитотоксическому действию TMZ

Приобретение клетками ГБ устойчивости к TMZ опосредуется несколькими молекулярными механизмами, включая подавление окислительного стресса и ПМП-ассоциированное усиление стволовых свойств опухолевых клеток (см. п. 1.1.8.1). Поскольку ранее было показано, что СТА вызывает гибель клеток ГБ за счет усиления продукции АФК [17], а настоящая работа продемонстрировала ингибирующее действие пМАС в отношении ПМП (Рис. 17), была выдвинута гипотеза о том, что пМАС может сенсибилизировать клетки ГБ к цитотоксическому действию TMZ.

3.3.4.1. Исследование характера цитотоксического взаимодействия пМАС и TMZ

Чтобы оценить, может ли пМАС повысить эффективность цитотоксического действия TMZ, различные концентрации пМАС и TMZ были добавлены к клеткам U87 по отдельности и в комбинации с последующим анализом их жизнеспобности через 72 ч. Анализ цитотоксических профилей показал, что TMZ и пМАС, используемые в монорежиме, вызывали гибель клеток в микромолярном и субмикромолярном диапазонах концентраций соответственно (IC_{50}^{TMZ} = 212,7 мкМ; $IC_{50}^{пМАС}$ = 197,2 нМ). Комбинации TMZ и пМАС обладали более выраженной цитотоксичностью в отношении клеток U87, чем каждое соединение по отдельности (Рис. 19А).

Для оценки характера цитотоксического взаимодействия пМАС и TMZ для каждой комбинации были рассчитаны индексы синергии (δ) в соответствии с моделью HSA с использованием платформы SynergyFinder+. Положительные значения δ указывают на синергическое действие пМАС и TMZ, которое достигает максимума при сочетании 100 нМ пМАС с 50 мкМ TMZ (Рис. 19Б). Эти результаты показывают, что пМАС повышает чувствительность клеток ГБ к TMZ.

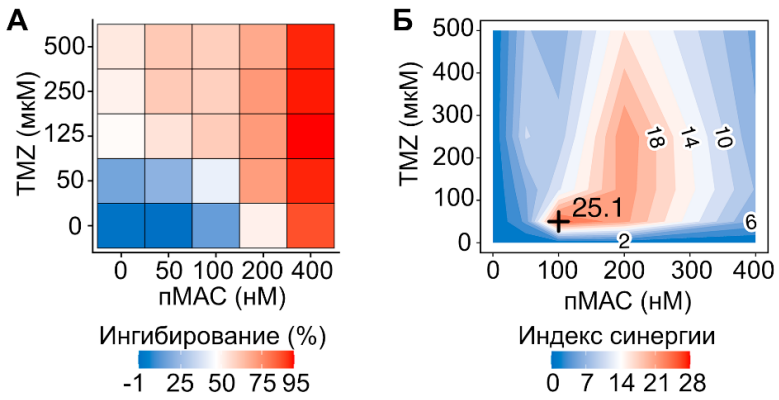

Рисунок 19. Оценка синергического анти-ГБ эффекта пМАС и TMZ. (**А**) Цитотоксичность пМАС (0 – 400 нМ) и TMZ (0 – 500 мкМ) в отношении клеток U87, оцененная с помощью МТТ-теста через 72 ч. (**Б**) Индекс синергии (δ) при различных концентрациях пМАС и TMZ в клетках U87, рассчитанный с использованием модели HSA на платформе SynergyFinder+. Черный крест указывает на максимальное значение δ.

3.3.4.2. Исследование АФК-стимулирующего эффекта пМАС, TMZ и их комбинации

Резистентность клеток ГБ к TMZ связана с их низкой восприимчивостью к индукции окислительного стресса данным препаратом [163,164]. Чтобы проверить, связано ли синергическое взаимодействие пМАС и TMZ с образованием АФК, цитотоксичность соединений оценивали в присутствии N-ацетил-L-цистеина (NAC). Метаболизируясь клетками, NAC превращается в цистеин и H_2S, которые затем используются для синтеза антиоксидантов – глутатиона (GSH) и сульфановых форм серы соответственно [340]. Проточная цитометрия с использованием флуоресцентного зонда DCFDA показала, что через 72 ч TMZ (125 мкМ) в монорежиме не влиял на уровень АФК в клетках U87, тогда как его комбинация с пМАС (100 нМ) увеличивала этот уровень в 1,4 раза. Добавление NAC (2 мМ) полностью блокировало стимулирующее влияние TMZ и пМАС на уровень внутриклеточных АФК (Рис. 20А). Согласно данным МТТ-теста, NAC снизил цитотоксический эффект TMZ, пМАС и комбинации соединений на 22,3%, 56,2% и 13,3% соответственно в клетках U87 через 72 ч (Рис. 20Б). Полученные результаты указывают на то, что повышение чувствительности клеток ГБ к TMZ под действием пМАС зависит от индукции АФК. Это согласуется с ранее показанной связью между цитотоксичностью других цианоенон-содержащих тритерпеноидов (CDDO-Me, CM и CTA) и запуском окислительного стресса в опухолевых клетках [16,17,341].

3.3.4.3. Исследование механизма гибели клеток ГБ под действием TMZ и пМАС

Для исследования механизма гибели клеток U87 под действием TMZ и пМАС был использован метод проточной цитометрии с двойным окрашиванием Annexin V-FITC и йодистым пропидием. Высокие концентрации соединений, 500 мкМ для TMZ и 600 нМ для

пМАС, были использованы для обеспечения достаточно высокого уровня гибели клеток U87 в течение 72 ч инкубации. Цитограммы, представленные на Рис. 20В, показывают, что инкубация клеток с 500 мкМ TMZ приводила к запуску апоптоза лишь у 9% клеток (правые квадранты). Комбинация TMZ и пМАС показала в 6,2 раза более высокую апоптогенную активность по сравнению с применением TMZ в монорежиме, в результате чего апоптозу подверглись 56,2% клеток U87. Добавление NAC снизило наблюдаемый эффект на 41%, что согласуется с результатами МТТ-теста (Рис. 20Б). Примечательно, что NAC не оказывал влияния на долю некротических клеток (около 30%), наблюдаемых при комбинированной обработке (левый верхний квадрант) (Рис. 20В).

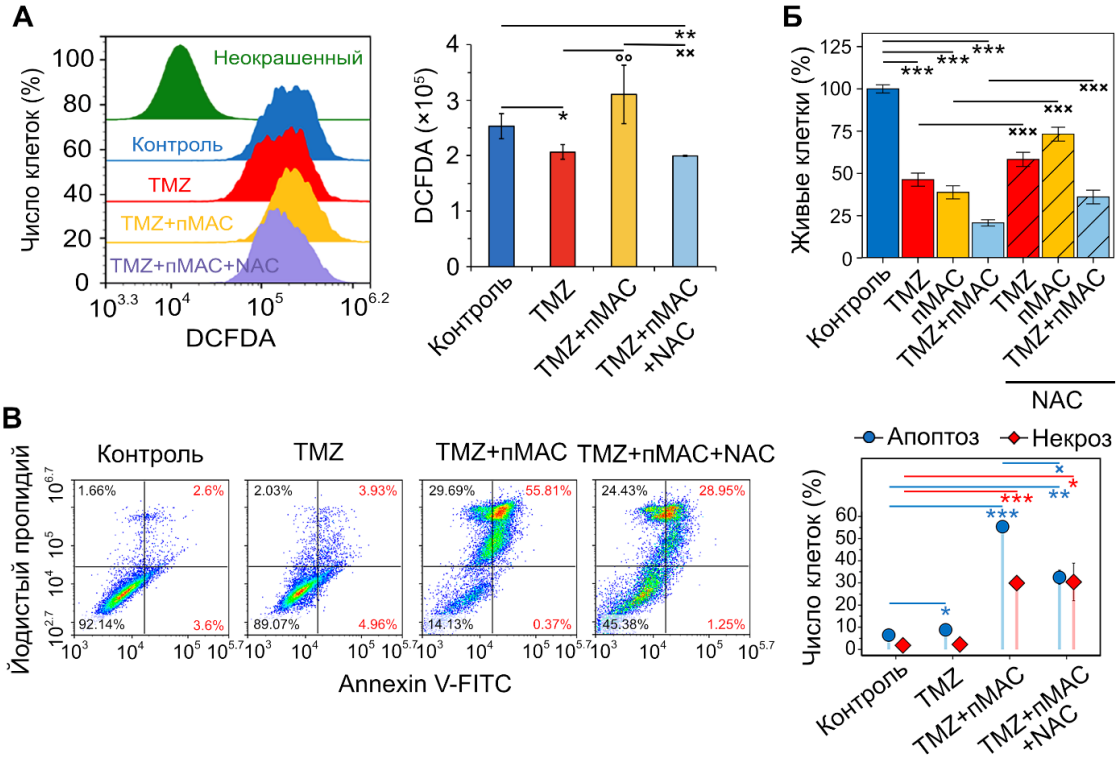

Рисунок 20. Оценка вовлеченности АФК в хемосенсибилизирующий эффект пМАС. (**А**) Образование АФК в клетках U87 после 72 ч инкубации с TMZ (125 мкМ) и пМАС (100 нМ), оцененное с помощью окрашивания DCFDA и проточной цитометрии. (**Б**) Влияние нейтрализации АФК с помощью NAC (2 мМ) на комбинированную цитотоксичность TMZ (125 мкМ) и пМАС (100 нМ) в клетках U87 через 72 ч. (**В**) Анализ механизма гибели клеток U87 под действием TMZ (500 мкМ), пМАС (600 нМ) и NAC (2 мМ) (72 ч) с использованием двойного окрашивания Annexin V-FITC / йодистым пропидием и проточной цитометрии. Левый нижний квадрант соответствует живым клеткам, а правый нижний, правый верхний и левый верхний квадранты – клеткам на ранней стадии апоптоза, поздней стадии апоптоза и подвергающимся некрозу соответственно. Данные представлены как среднее значение ± SD. Статистическая значимость рассчитывалась путем сравнения с контролем (обозначено *), TMZ-

индуцированными клетками (обозначено °) или соответствующей группой, обработанной NAC (обозначено ×). */× $p < 0,05$, **/××/°° $p < 0,01$, ***/××× $p < 0,001$.

Полученные данные позволяют утверждать, что пМАС усиливает ответ клеток ГБ на терапию TMZ за счет увеличения образования АФК с последующей индукцией апоптоза. Это указывает на перспективность использования пМАС в качестве хемосенсибилизатора, однако его некроз-стимулирующий эффект в комбинации с TMZ требует дальнейшего изучения.

3.3.4.4. Исследование эффекта пМАС на столовые характеристики клеток ГБ

ГСК демонстрируют повышенную устойчивостью к радиотерапии и TMZ благодаря экспрессии эффлюксных транспортеров семейства ABC и повышенной способности клеток к самообновлению, что способствует рецидивированию опухоли [142]. Учитывая эту связь, было исследовано влияние пМАС на стволовые свойства клеток U87.

Одним из функциональных показателей стволовости является клоногенность – способность отдельной клетки выживать и сохранять способность к пролиферации [342]. Для оценки клоногенности клетки U87 высевали в культуральные планшеты в низкой плотности в присутствии пМАС (50 – 1000 нМ), после чего спустя 10 суток анализировали образование клеточных колоний. Было установлено, что пМАС вызывает дозозависимое снижение площади колоний по сравнению с контролем, что указывает на подавление клоногенного потенциала клеток U87 (Рис. 21А).

Способность опухолевых клеток формировать сфероиды позволяет оценивать их способность к самообновлению, еще одной ключевой характеристики стволовых клеток [6]. Для оценки влияния пМАС на рост опухолевых сфероидов, клетки U87 высевали на планшеты с низкоадгезивным покрытием в присутствии пМАС, после чего в течение 10 дней оценивали размер формируемых первичных сфероидов с помощью световой микроскопии. Как показано на Рис. 21Б, контрольные сфероиды демонстрировали постепенный рост, достигая 2,9-кратного увеличения размера к 10-му дню. Эффект пМАС на рост сфероидов зависел от концентрации: низкая концентрация тритерпеноида (50 нМ) увеличивала его на 21% к концу эксперимента, средняя концентрация (450 нМ) останавливала рост сфероидов на 4-й день, а высокая концентрация (1000 нМ) полностью блокировала рост и вызывала разрушение сфероидов с уменьшением их размера на 28,6% к 10-му дню (Рис. 21Б).

В независимом эксперименте на 4-й день культивации с пМАС клетки U87 выделяли из первичных сфероидов с помощью TrypLE и оставляли в неадгезивных условиях на 3 дня для формирования вторичных опухолевых сфероидов. Было установлено, что воздействие пМАС на первичные сфероиды изменяло способность входящих в них клеток к образованию вторичных

сфероидов дозозависимым образом: низкая концентрация пМАС (50 нМ) увеличивала размер вторичных сфероидов на 22,6%, в то время как средняя (450 нМ) и высокая (1000 нМ) концентрации уменьшали ее на 23,9% и 84,1% соответственно (Рис. 21В). Полученные результаты показывают, что пМАС (450 – 1000 нМ) способен подавлять самообновление клеток ГБ.

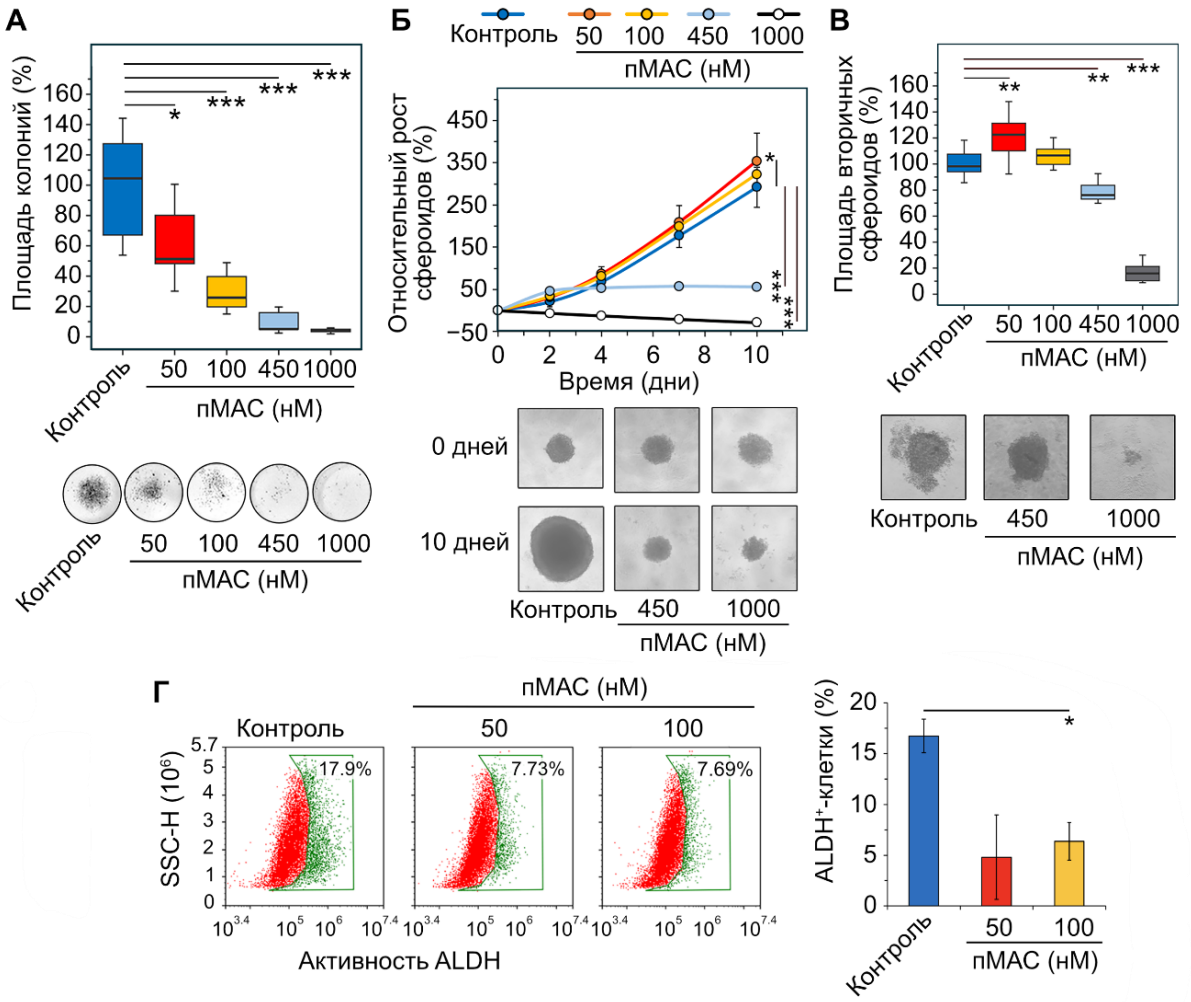

Рисунок 21. Влияние пМАС на стволовые свойства клеток ГБ. (**А**) Колониеобразующая активность клеток U87, оцененная после 10 дней инкубации с пМАС (0 – 1000 нМ). (**Б**) Рост первичных опухолевых сфероидов U87 в течение 10 дней обработки пМАС (0 – 1000 нМ). Увеличение на фотографиях ×100. (**В**) Размер вторичных опухолевых сфероидов U87, образовавшихся из клеток первичных опухолевых сфероидов после обработки пМАС (0 – 1000 нМ) в течение 4 дней. Увеличение на фотографиях ×100. (**Г**) Активность ALDH в первичных опухолевых сфероидах U87 после 4 дней инкубации с пМАС (0 – 100 нМ), оцененная с помощью окрашивания AldeRed и проточной цитометрии. Зеленая область на диаграмме рассеяния соответствует $ALDH^+$-клеткам, как описано в п. 2.2.10.4. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Важно отметить, что наблюдаемое увеличение роста сфероидов под действием низких концентраций пМАС не было связано со стимуляцией стволовых свойств клеток U87. Окраска клеток, входящих в состав первичных сфероидов на 4-й день обработки пМАС (50 – 100 нМ), реагентом AldeRed не выявила в них усиления активности альдегиддегирогеназы (ALDH), ключевого фермента, поддерживающего стволовый фенотип опухолевых клеток (Рис. 21Г). Напротив, добавление пМАС снижало долю ALDH-положительных клеток в составе первичных сфероидов в 2,3 раза по сравнению с контролем, причем этот эффект оказался независимым от концентрации тритерпеноида (Рис. 21Г).

Полученные данные указывают на то, что пМАС подавляет стволовость клеток ГБ, в результате чего снижается их способность к самообновлению. Возможно, стимуляция роста сфероидов под действием 50 нМ пМАС (Рис. 21Б, В) связана с превращением ГСК в дифференцированные клетки ГБ и восстановлением скорости их деления. Эту версию подтверждает снижение доли $ALDH^{+}$-клеток, соответствующих ГСК [343], в клеточной культуре U87 при ее обработке пМАС (Рис. 21Г). Снижение ферментативной активности ALDH может также указывать на увеличение чувствительности клеток к TMZ, поскольку в клетках ГБ ALDH1A3 детоксифицирует альдегиды, образующиеся в результате перекисного окисления липидов, индуцированного TMZ, играя ключевую роль в развитии устойчивости к данному препарату [343].

Таким образом, пМАС повышает чувствительность клеток ГБ к цитотоксическому действию TMZ. Согласно полученным данным, сенсибилизирующий эффект пМАС может быть связан как с индукцией в клетках окислительного стресса, так и со снижением их стволовых характеристик.

3.4. Исследование влияние СМ и пМАС на опухолевую прогрессию *in vivo*

Ранее на животных моделях было показано, что ингибиторы ЭМП подавляют инициацию, рост и метастазирование опухолей, а также повышают эффективность противоопухолевой химиотерапии (см. п. 1.2.1.1). Для подтверждения противоопухолевого потенциала СМ и пМАС, обладающих выраженной ЭМП/ПМП-ингибирующей активностью, был исследован их эффект *in vivo* на метастатической модели меланомы B16 и гетеротопической ксенографтной модели глиобластомы U87 соответственно (исследования выполнены совместно с к.м.н. Сеньковой А. В.).

3.4.1. Антиметастатическая активность СМ в отношении меланомы B16 *in vivo*

Поскольку СМ снижал инвазивную способность опухолевых клеток (Рис. 11), а клетки меланомы мыши B16 продемонстрировали чувствительность к его действию (Рис. 8А), антиметастатический потенциал СМ был исследован на модели меланомы B16 *in vivo*.

Экспериментальную модель формировали путем внутривенного введения клеток меланомы B16 мышам линии C57Bl/6. Начиная с 4-го дня после трансплантации опухолевых клеток животным дважды в неделю проводили внутрибрюшинные (в/б) инъекции СМ в дозе 25 мг/кг (препарат растворяли в 10% Твин-80). В качестве групп сравнения использовали интактных мышей, не получавших лечения, и животных, которым вводили носитель (10% Твин-80) без СМ. На 21-й день животных выводили из эксперимента, после чего извлекали легкие для подсчета метастазов, гистологического и иммуногистохимического анализа.

Было установлено, что шестикратное введение СМ снизило число поверхностных метастазов в 2,4 и 2,6 раза по сравнению с контролем и носителем соответственно (Рис. 22А), что указывает на эффективное подавление метастазирования. Для оценки размеров метастатических узлов провели гистологический анализ легких с окрашиванием гематоксилин-эозином (Рис. 22Б). Анализ площади метастазов не выявил статистически значимых различий между контрольной группой и группами, получавшими СМ или носитель (Рис. 22В), что может свидетельствовать об отсутствии влияния СМ на рост уже сформировавшихся метастазов. Выраженность ЭМП в тканях метастазов оценивали иммуногистохимически по уровням эпителиального маркера CDH1 и мезенхимального маркера MMP9. По сравнению с контролем СМ повышал уровень CDH1 в 3,9 раза и снижал уровень MMP9 в 4,3 раза, что свидетельствует о подавлении ЭМП. Носитель практически не влиял на CDH1 и снижал уровень MMP9, однако этот эффект был значительно слабее, чем при действии СМ (Рис. 22Г).

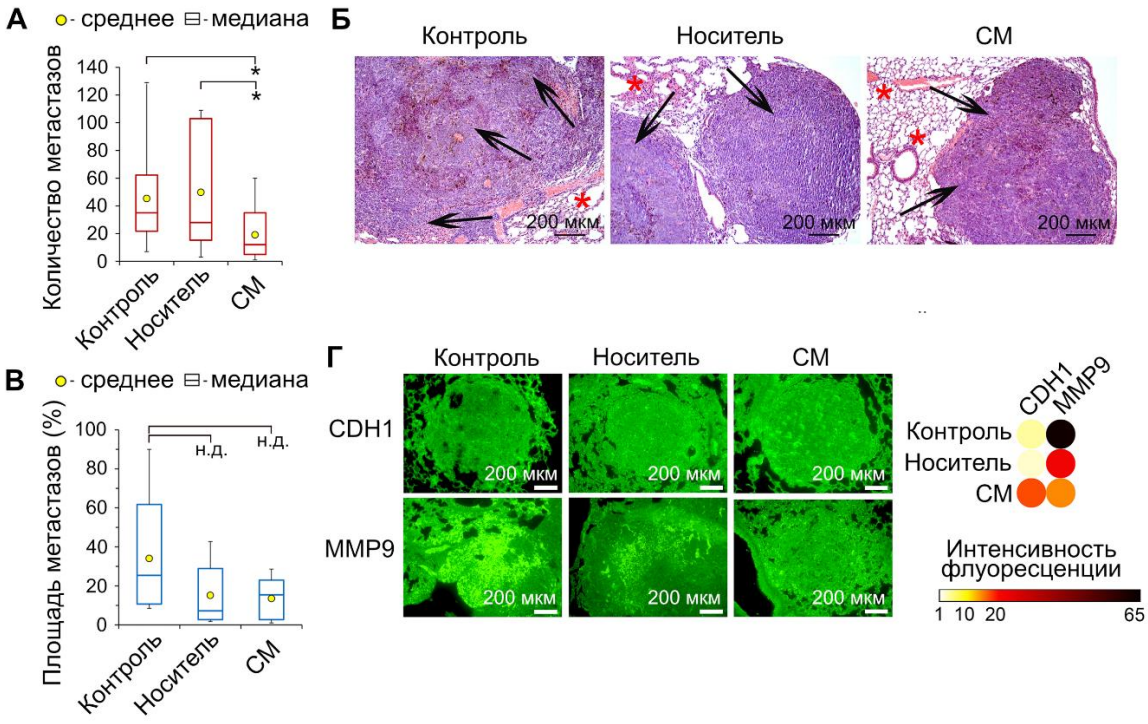

Рисунок 22. Влияние СМ на метастазирование меланомы B16 в легкие мышей C57Bl/6. Контроль

– без терапии; носитель – 10% Твин-80 (в/б); СМ – СМ (25 мк/кг, в/б). (**А**) Оценка количества поверхностных метастазов. (**Б**) Гистологические изображения метастазов меланомы B16 в легких мышей. Окрашивание гематоксилином и эозином. Черные стрелки и красные звездочки указывают на метастатические очаги и нормальную ткань легкого соответственно. (**В**) Площадь внутренних метастазов относительно общей площади срезов легких. (**Г**) Уровни белков CDH1 и MMP9 в тканях метастазов, оцененные с помощью иммуногистохимического анализа. Интенсивность флуоресценции Alexa Fluor 488 количественно определяли с помощью ImageJ и нормировали относительно площади метастатического очага. * $p < 0,05$, н.д. – статистически недостоверно.

Таким образом, СМ демонстрирует значительный антиметастатический потенциал *in vivo*. По-видимому, подавление ЭМП под действием СМ ингибирует диссеминацию опухолевых клеток, однако в случае, когда клетки колонизируют ткань легкого, эпителиальный фенотип может способствовать их пролиферации, как это было показано ранее [8]. Эти результаты свидетельствуют о том, что включение СМ в терапевтические протоколы должно сопровождаться строгим контролем фенотипа опухолевых клеток, что позволит избежать назначения препарата на стадиях, когда его ЭМП-ингибирующая активность может привести к нежелательным последствиям.

3.4.2. Противоопухолевая активность пМАС в отношении глиобластомы U87 *in vivo*

Влияние пМАС на прогрессию ГБ изучали на ксенографтной модели: клетки U87 подкожно вводили иммунодефицитным мышам линии Nude для образования опухолевых узлов [17,278]. Начиная с 4-го дня после трансплантации опухолевых клеток мышам вводили пМАС (20 мг/кг, в/б) три раза в неделю и/или TMZ (10 мг/кг, в/б) ежедневно. Мыши в группе сравнения получали инъекции 10% Твин-80, служившим носителем для обоих соединений.

Было установлено, что семикратная инъекция пМАС подавляет рост ксенографтов с эффективностью, сопоставимой с TMZ: пМАС уменьшал объем опухолей в 2,1 и 7,2 раза на 11-й и 18-й дни эксперимента соответственно по сравнению с носителем (Рис. 23А). Кроме того, в комбинации с TMZ пМАС синергически усиливал его противоопухолевое действие, что согласуется с данными *in vitro* (Рис. 19): на 13-й день комбинация пМАС и TMZ ингибировала рост опухоли сильнее, чем каждое соединение по отдельности. Однако в последующие дни данный эффект исчезал, и комбинация становилась сопоставимой по эффективности с монотерапией TMZ (Рис. 23А). К концу эксперимента пМАС, TMZ и их комбинация привели к уменьшению массы опухоли в 8, 21,9 и 22,5 раз соответственно по сравнению с носителем (Рис. 23Б, В).

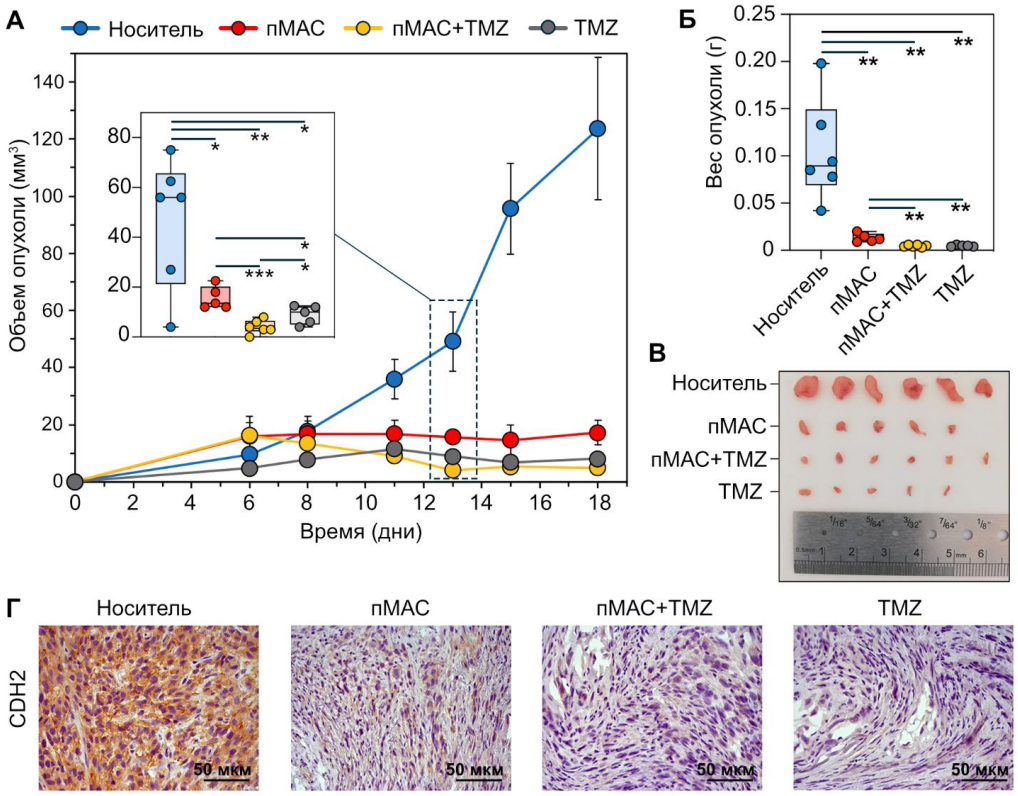

Рисунок 23. Влияние пМАС и его комбинации с TMZ на рост подкожных ксенографтных опухолей U87 у мышей линии Nude. Группы лечения: носитель (10% Твин-80, в/б), пМАС (20 мг/кг, в/б), TMZ (10 мг/кг, в/б), пМАС+TMZ (комбинированная терапия). (**А**) Динамика роста подкожных ксенографтов в течение 18 дней. На вставке показан синергический эффект комбинации пМАС и TMZ на 13-й день. (**Б**, **В**) Масса (**Б**) и размер (**В**) опухолей через 19 дней после ксенотрансплантации. (**Г**) Уровни CDH2 в образцах опухолей на 19-й день (иммуногистохимический анализ). Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Выраженность ПМП в опухолевой ткани определяли путем оценки уровня мезенхимального маркера CDH2 с использованием иммуногистохимического анализа. Ксенографты мышей, получавших только носитель, демонстрировали высокие уровни CDH2. Введение TMZ, пМАС или их комбинации значительно снижало уровень CDH2, что указывет на подавление ПМП (Рис. 23Г).

Таким образом, пМАС значительно подавляет прогрессию ГБ и улучшает эффективность терапии TMZ, что связано с его ингибирующим действием на ПМП. Исследуемый тритерпеноид обладает низкой системной токсичностью: при монотерапии он не влиял на массу тела и органные индексы экспериментальных животных, а в комбинации с TMZ вызывал лишь незначительное их снижение (менее 10% относительно носителя), что указывает на хорошую переносимость использованных режимов лечения (Рис. S5А, Б). Выявленные свойства позволяют

рассматривать пМАС как перспективный компонент комбинированных схем терапии ГБ. Недостатком пМАС является кратковременность повышения чувствительности опухолей к TMZ, что, вероятно, связано с особенностями фармакокинетики и биораспределения пМАС. Для продления синергического эффекта с TMZ *in vivo* необходимы дальнейшие исследования, направленные на подбор оптимальной фармацевтической субстанции пМАС, а также путей и схем его введения. Перспективным направлением дальнейших исследований является изучение противоопухолевой активности пМАС на ортотопической модели ГБ.

Таким образом, эксперименты *in vivo* подтвердили способность СМ и пМАС ингибировать ЭМП и ПМП соответственно. Оба соединения продемонстрировали выраженный противоопухолевый эффект: СМ снизил метастатическое поражение легких меланомой B16, а пМАС подавил рост ксенографтов ГБ и обеспечил временную сенсибилизацию к действию TMZ. Эти данные, согласующиеся с результатами *in vitro*, свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале СМ и пМАС и обосновывают целесообразность их дальнейшего изучения в качестве кандидатов на роль противоопухолевых агентов.

3.5. Исследование роли *ADAMTS6* в ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека

Экспрессия генов семейства ADAMTS повышена в опухолях пациентов с НМРЛ и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом выживаемости [25–28]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что протеазы ADAMTS1, ADAMTS4 и ADAMTS16 усиливают метастатический потенциал клеток АЛ через индукцию ЭМП [25–27]. Ингибирование ADAMTS может служить стратегией подавления метастазирования, что подтверждается работами по селективным ингибиторам ADAMTS1 [25,229]. Несмотря на это, терапевтический потенциал протеаз ADAMTS как мишеней в контексте ЭМП изучен недостаточно. В частности, отсутствует понимание того, вовлечена ли протеаза ADAMTS6 в патогенез АЛ. Поскольку TNF-α/TGF-β-индуцированный ЭМП в клетках АЛ сопровождается гиперэкспрессией гена *ADAMTS6* [28], была сформулирована гипотеза, что ADAMTS6 может играть важную роль в регуляции данного процесса. Для проверки этой гипотезы в рамках настоящей диссертационной работы была изучена роль гена *ADAMTS6* в регуляции ЭМП клеток АЛ, а также оценен потенциал его использования в качестве мишени для анти-ЭМП терапии с помощью мишень-ориентированного подхода.

3.5.1. Оценка регуляторного потенциала *ADAMTS6* с помощью анализа генных сетей

Для определения топологической позиции *ADAMTS6* в регуломе ЭМП был применен анализ генных сетей, ранее успешно использовавшийся для идентификации регуляторных элементов ЭМП в клетках различного гистогенеза [344,345]. На первом этапе была проанализирована

дифференциальная экспрессия генов в клетках АЛ человека, индуцированных TGF-β1, относительно интактного контроля. Для получения объективных результатов использовали четыре независимых набора данных кДНК-микрочипирования из базы Gene Expression Omnibus (GEO), которые различались концентрацией TGF-β1, длительностью воздействия ростового фактора и используемыми клеточными линиями (Рис. 24А).

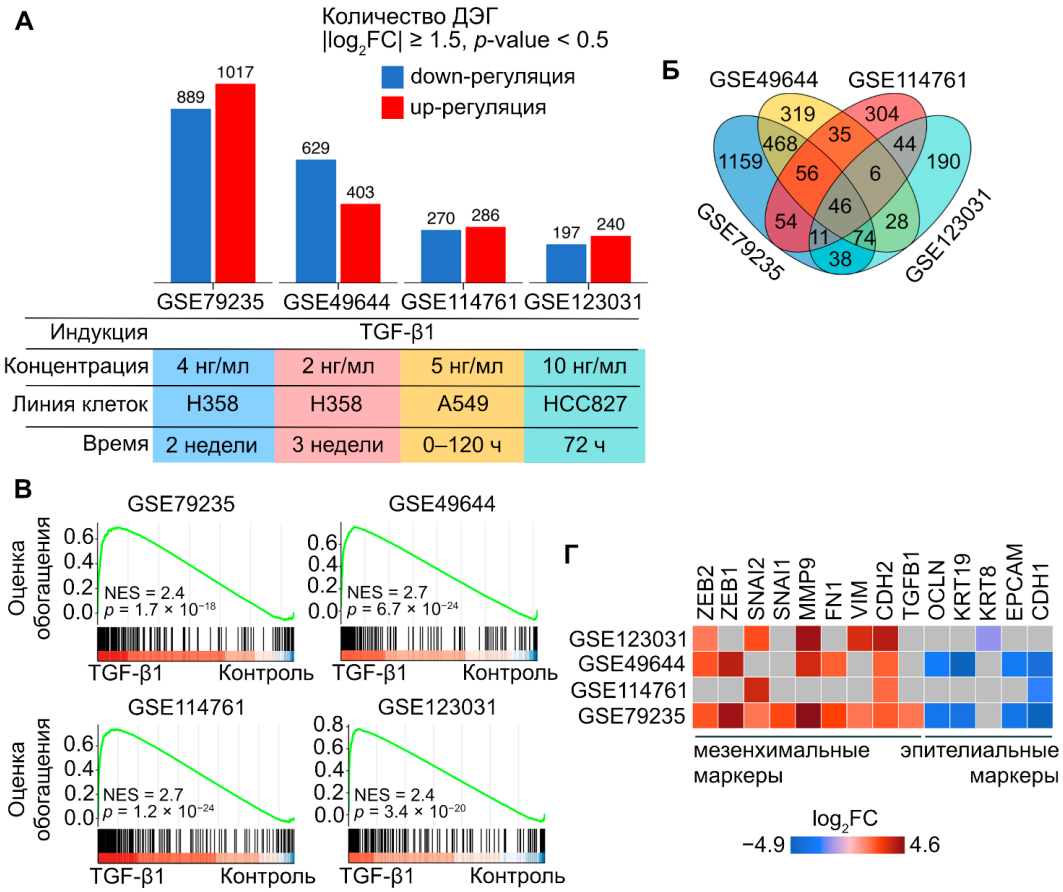

Рисунок 24. Изменения транскриптома клеток АЛ при TGF-β1-индуцированном ЭМП. (**А**) ДЭГ, изменяющие экспрессию в клетках АЛ человека при индукции TGF-β1. В таблице показаны экспериментальные условия, использованные в каждом наборе данных кДНК-микрочипов. (**Б**) Диаграмма Венна, иллюстрирующая пересечение ДЭГ между наборами данных. (**В**) Обогащение ЭМП-ассоциированной генной сигнатуры в наборах данных, определенное с помощью GSEA. (**Г**) Дифференциальная экспрессия маркеров ЭМП (|log2(кратное изменение (FC))| ≥ 1,5) в TGF-β1-индуцированных клетках по сравнению с контрольными клетками. Статистически недостоверные результаты (p ≥ 0,05) обозначены серым цветом.

Для клеток H358 были взяты два независимых набора с разными режимами инкубации: 4 нг/мл TGF-β1 в течение 2 недель (GSE79235; выявлено 1906 дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ)) и 2 нг/мл TGF-β1 в течение 3 недель (GSE49644; выявлено 1032 ДЭГ). Оба режима индуцировали общий транскриптомный ответ, включающий 643 ДЭГ, а также 1263 и 389

уникальных ДЭГ соответственно. Для клеток A549 (GSE114761) экспериментальные образцы, обработанные 5 нг/мл TGF-β1 в течение 24, 48 и 120 ч, были объединены в одну группу и сравнены с контрольными образцами, что позволило выявить 556 ДЭГ, характерных для TGF-β1-индуцированного ЭМП в клетках данной линии. В клетках HCC827 после индукции 10 нг/мл TGF-β1 в течение 72 ч (GSE123031) было идентифицировано 437 ДЭГ.

Лишь 46 ДЭГ оказались общими для четырех наборов транскриптомных данных (Рис. 24Б). Несмотря на это, анализ GSEA выявил достоверное обогащение генной сигнатуры ЭМП при индукции TGF-β1 в каждом из наборов (Рис. 24В). Индукция ЭМП также подтверждалась снижением экспрессии эпителиальных генов (например, *CDH1*, *EPCAM* и *KRT19*) и повышением экспрессии мезенхимальных генов (например, *CDH2*, *VIM* и *FN1*) (Рис. 24Г). Эти результаты демонстрируют, что ЭМП-ассоциированный транскриптомный ответ в значительной степени зависит от клеточного контекста и условий инкубации, что согласуется с ранее опубликованными сведениями [320].

На основе выявленных ДЭГ (Рис. 24А) с помощью базы данных белок-белковых взаимодействий STRING были реконструированы четыре генные ассоциативные сети (Рис. S6). Поскольку хаб-гены, занимающие узловое положение в генных сетях, часто служат ключевыми регуляторами соответствующих биологических процессов [319], был проведен топологический анализ полученных сетей с использованием плагина CytoHubba в программе Cytoscape. Для каждой генной сети были определены ДЭГ, входящие в топ 15% хотя бы по одной из двенадцати метрик центральности CytoHubba (подробнее см. в п. 2.2.17.5). В результате анализа было выявлено 50 хаб-генов, общих не менее чем для трех используемых наборов данных (Рис. 25А; пересечение, отмеченное желтым цветом). Среди хаб-генов 23 были up-регулированы, 23 – down-регулированы и 4 демонстрировали вариабельную экспрессию в зависимости от условий эксперимента (Рис. 25Б).

ADAMTS6 был идентифицирован как хаб-ген в трех из четырех наборов данных, экспрессия которого активировалась в ответ на индукцию TGF-β1 ($\log_2FC \geq 2{,}7$). Большинство метрик центральности *ADAMTS6* оказались средними среди up-регулированных хаб-генов, однако плотность максимальной компоненты соседства (DMNC; метрика, выявляющая узлы, окруженные плотными кластерами генов-соседей) и коэффициент кластеризации (ClusteringCoefficient; отражает общую связность соседей узла) демонстрировали высокие значения, указывая на координирующую роль *ADAMTS6* в ЭМП-ассоциированных генных сетях (Рис. 25В).

Для оценки потенциальной вовлеченности хаб-генов в регуляцию ЭМП в клетках АЛ был проведен анализ текстовых данных (текст-майнинг) в платформе GenCLiP 3.0. Оценивалась

совместная встречаемость названий хаб-генов с терминами «LUAD» (АЛ), «lung cancer» (рак легкого), «EMT» (ЭМП) и «metastasis» (метастазирование) в отдельных предложениях аннотаций научных статей из базы данных PubMed. В результате было обнаружено 15 хаб-генов, часто ассоциированных с термином «lung cancer», включая 10 связанных с «LUAD», и 18 хаб-генов, ассоциированных с терминами «metastasis» и «EMT» (Рис. 25Г). Многие хаб-гены с установленными литературными связями кодируют известных участников ЭМП, включая *CDH2*, *MMP9*, *SNAI2* и *ZEB2* [8,125]. Высокая степень изученность значительной части хаб-генов подтверждает, что анализ генных сетей выявил регуляторное ядро ЭМП.

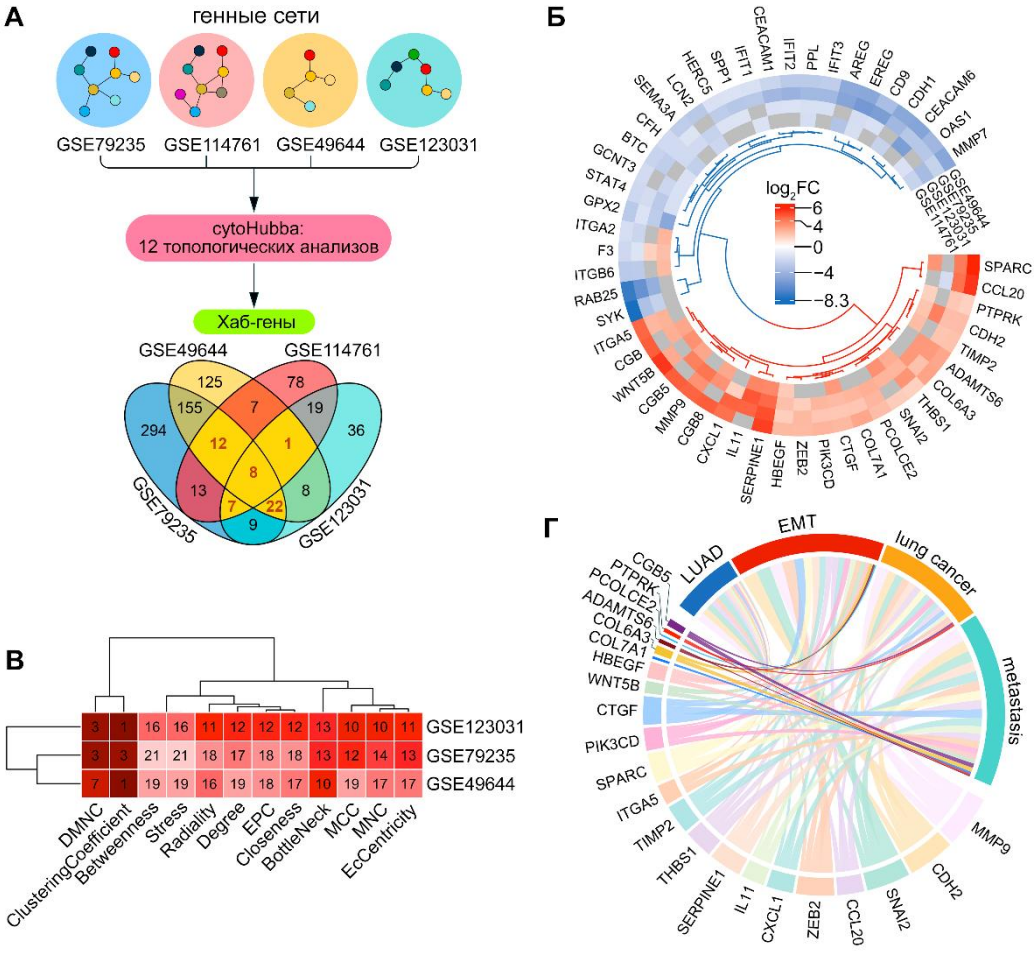

Рисунок 25. Оценка ассоциации гена *ADAMTS6* с TGF-β1-индуцированным ЭМП клеток АЛ. (**А**) Идентификация хаб-генов. Для четырех наборов транскриптомных данных на основе ДЭГ построены генные сети (Рис. S6), анализ которых с помощью CytoHubba позволил выявить хаб-гены. (**Б**) Дифференциальная экспрессия ($|\log_2 FC| \geq 1{,}5$) хаб-генов в TGF-β1-индуцированных клетках АЛ по сравнению с контролем. Статистически недостоверные результаты ($p \geq 0{,}05$) обозначены серым цветом. (**В**) Ранг *ADAMTS6* по 12 метрикам центральности среди 23 up-регулированных хаб-генов. (**Г**) Результаты текст-майнинга. Совместная встречаемость названий хаб-генов с терминами «LUAD», «lung cancer», «EMT» и «metastasis» проанализирована в базе

данных PubMed с помощью GenCLiP 3.0. Толщина линий, соединяющих названия хаб-генов с терминами, отражает относительное количество публикаций, в которых хаб-ген и термин встречаются вместе в пределах одного предложения.

Таким образом, анализ генных сетей выявил *ADAMTS6* в качестве хаб-гена, функционирующего совместно с известными регуляторами ЭМП в клетках АЛ (Рис. 25В). В то же время текст-майнинг показал ограниченное количество публикаций, связывающих *ADAMTS6* с ЭМП и метастазированием при АЛ (Рис. 25Г). В совокупности эти данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения ADAMTS6 как мишени для анти-ЭМП терапии.

3.5.2. Верификация роли *ADAMTS6* как потенциального регулятора ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека

Для верификации регуляторной роли *ADAMTS6,* выявленной при анализе генных сетей, был использован расширенный набор транскриптомных данных. На их основе было оценено участие *ADAMTS6* в формировании мезенхимального фенотипа клеток АЛ, а также проверено, является ли активация экспрессии *ADAMTS6* специфичной для TGF-β1-индуцированного ЭМП или она также происходит при ЭМП, вызванном другими факторами.

Поскольку экспрессия *ADAMTS6* повышается в клетках АЛ после индукции TGF-β1 (Рис. 25Б), было решено установить, связана ли активация данного гена с приобретением клетками АЛ мезенхимального фенотипа. Для этого был выполнен реанализ набора данных scRNA-seq GSE147405, который включал клетки A549, полученные через 0 – 7 дней после индукции TGF-β1 и через 0 – 3 дня после отмены действия данного ростового фактора. Было идентифицировано семь клеточных кластеров: кластеры 1, 2, 3 и 4 присутствовали в культуре контрольных (необработанных клеток), тогда как кластеры 0, 5 и 6 появлялись только после обработки TGF-β1 (Рис. 26А).

Статус ЭМП этих кластеров оценивали с помощью анализа ssGSEA: кластеры 1, 2 и 3 демонстрировали обогащение эпителиальной генной сигнатуры, тогда как кластеры 0, 4, 5 и 6 – мезенхимальной и ЭМП-сигнатур (Рис. 26Б). Соответственно, кластеры 1, 2 и 3 были классифицированы как эпителиальные, а кластеры 0, 4, 5 и 6 – как мезенхимальные. Как видно из Рис. 26В, экспрессия *ADAMTS6* оказалась выше в клетках мезенхимальных кластеров по сравнению с клетками эпителиальных кластеров (Рис. 26В), что было также подтверждено с помощью анализа дифференциальной экспрессии (Рис. 26Г). Таким образом, усиление экспрессии *ADAMTS6* ассоциировано с приобретением клетками A549 мезенхимального фенотипа, что согласуется с потенциальной ролью данного гена как регулятора ЭМП.

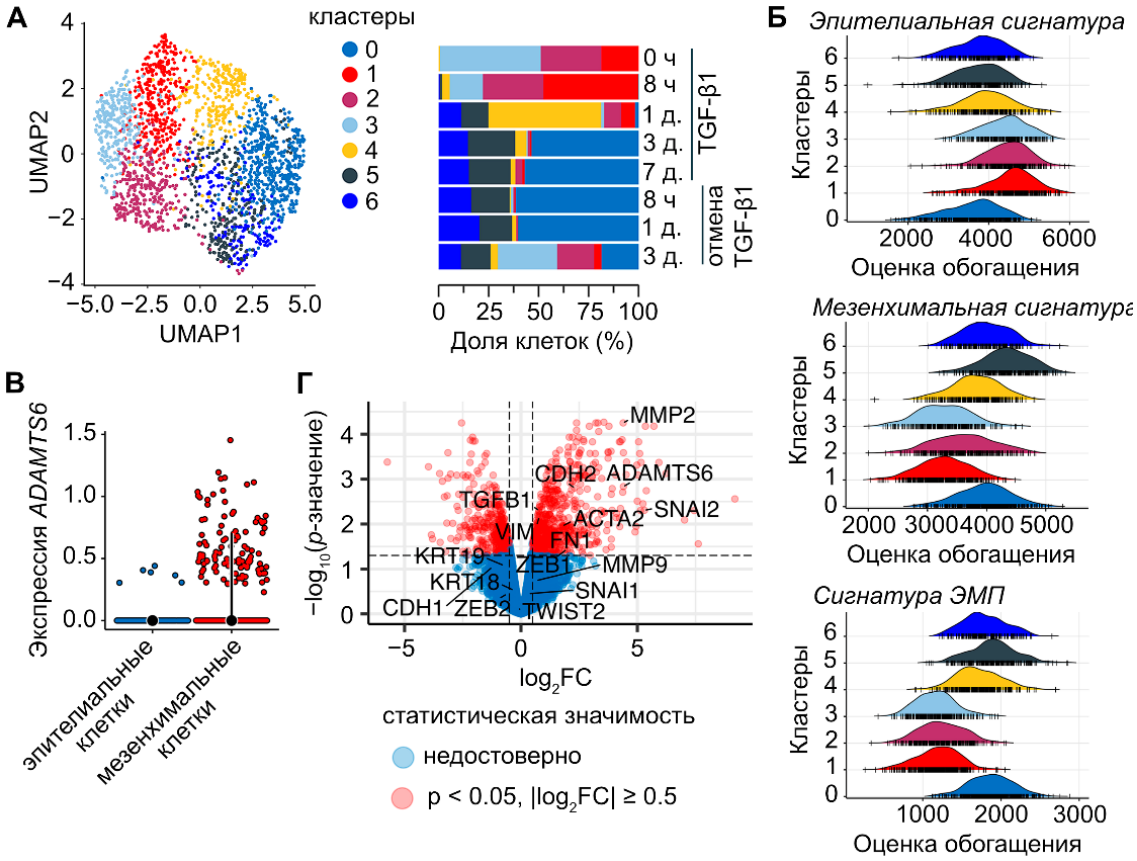

Рисунок 26. Анализ ассоциации экспрессии гена *ADAMTS6* с мезенхимальным фенотипом клеток АЛ. (**А**) Визуализация кластеров клеток A549, полученных в результате анализа scRNA-seq (слева), и график, показывающий относительную представленность кластеров при разных условиях эксперимента (справа). (**Б**) Обогащение наборов генов, ассоциированных с эпителиальным и мезенхимальным фенотипами, а также ЭМП, в кластерах клеток, оцененное с помощью ssGSEA. (**В**) Экспрессия *ADAMTS6* в эпителиальных и мезенхимальных клетках, нормализованная и масштабированная в соответствии со стандартным протоколом анализа scRNA-seq (см. п. 2.2.17.8). (**Г**) Диаграмма, показывающая гены, дифференциально экспрессирующиеся в мезенхимальных клетках по сравнению с эпителиальными клетками. Текстом обозначены названия классических генов-маркеров ЭМП и *ADAMTS6*.

Для лучшего понимания регуляторной сети *ADAMTS6* был выполнен дополнительный анализ транскриптомных данных из базы данных GEO (см.п. 2.1.8, таблица 4). Согласно литературным данным, TGF-β1 индуцирует ЭМП через SMAD2-зависимый сигнальный путь [346], причем эта индукция дополнительно поддерживается низким уровнем синтеза ацетил-КоА в результате метаболизма жирных кислот [347]. В клетках A549 мутация с потерей функции SMAD2 блокировала TGF-β1-индуцированное повышение экспрессии *ADAMTS6* ($\log_2$FC = −2,6), тогда как модуляция уровня ацетил-КоА в TGF-β1-стимулированных клетках A549 с помощью ацетата натрия не оказывала существенного влияния на его экспрессию (Рис. 27А). Эти данные

свидетельствуют о том, что влияние TGF-β1 на экспрессию *ADAMTS6* опосредуется SMAD2, но не зависит от уровня ацетил-КоА.

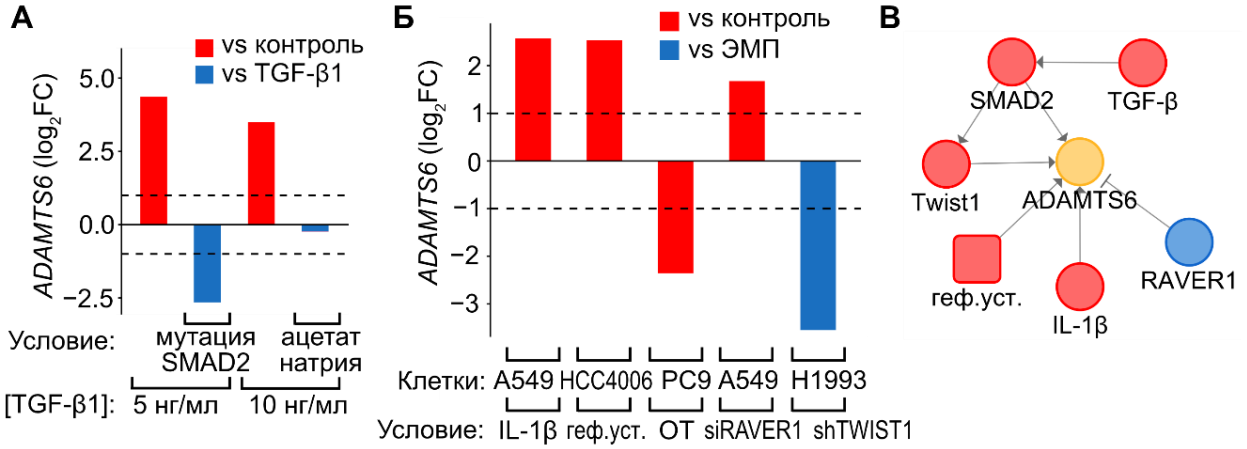

Рисунок 27. Изменение экспрессии *ADAMTS6* при ЭМП, индуцированном различными факторами. Столбчатые диаграммы показывают кратность изменения экспрессии *ADAMTS6*; пунктирные линии на (**А**) и (**Б**) соответствуют двукратному изменению ($|\log_2 FC| \geq 1$). (**А**) Роль SMAD2 и уровня ацетил-КоА в регуляции экспресии *ADAMTS6* в TGF-β1-стимулированных клетках A549. Красные столбики – сравнение TGF-β1-индуцированных клеток с неиндуцированным контролем. Синие столбики – сравнение TGF-β1-индуцированных клеток с мутацией SMAD2 или обработанных ацетатом натрия и клеток, индуцированных только TGF-β1. (**Б**) Изменение экспрессии *ADAMTS6* в клетках АЛ при ЭМП, индуцированном разными факторами. Красные столбики – сравнение клеток с индуцированным ЭМП с клетками без индукции; синие – сравнение клеток с подавленным ЭМП с клетками, в которых ЭМП произошел. Геф. уст. – устойчивость к гефитинибу; ОТ – терапия осимертинибом и траметинибом; siRAVER1 и shTWIST1 – нокдаун *RAVER1* и *TWIST1* соответственно. Подробная информация о наборах данных, группах сравнения и экспериментальных условиях представлена в таблице 4. (**В**) Сеть регуляции экспрессии *ADAMTS6* факторами, индуцирующими ЭМП. Красный и синий цвета указывают на положительные и отрицательные регуляторы экспрессии соответственно.

Далее было исследовано, связана ли экспрессия *ADAMTS6* с ЭМП, индуцированным факторами, отличными от TGF-β1. С этой целью уровень экспрессии *ADAMTS6* оценивали в клетках АЛ с ЭМП, вызванным гетерогенными стимулами, включающими воспалительные, лекарственные и генетические воздействия.

Как видно из Рис. 27Б, уровень экспрессии *ADAMTS6* достоверно повышался ($\log_2 FC > 1{,}5$) в клетках АЛ при запуске ЭМП тремя воздействиями: индукцией провоспалительным цитокином IL-1β [125], длительной обработкой гефитинибом (ингибитором EGFR), приводящей к

формированию химиорезистентности [348], и нокдауном гена *RAVER1* (кодирует регулятор альтернативного сплайсинга) [349].

Важно отметить, что нокаут ключевого ТФ мезенхимального перехода *TWIST1* в клетках H1993, подвергшихся ЭМП на фоне инактивации гена-онкосупрессора *BRMS1* [350], приводил к значительному снижению экспрессию *ADAMTS6* ($\log_2$FC = −3,6) (Рис. 27Б). Поскольку нокаут *TWIST1* подавляет ЭМП, индуцированный инактивацией *BRSM1*, наблюдаемое параллельное снижение экспрессии *ADAMTS6* указывает на прямую корреляцию между уровнем экспрессии данного гена и степенью мезенхимального перехода клеток.

В то же время в мезенхимально-подобных клетках PC9 с устойчивостью к осмертинибу и траметинибу (ингибиторам EGFR и MEK соответственно) наблюдалась противоположная закономерность: несмотря на запуск ЭМП на фоне развития химиорезистентности [351], экспрессия *ADAMTS6* была подавлена ($\log_2$FC = −2,4) (Рис. 27Б). Это свидетельствует о том, что в отдельных клеточных контекстах регуляция *ADAMTS6* может отклоняться от классической программы ЭМП, что отражает гетерогенность транскриптомного ответа при различных путях индукции этого процесса (Рис. 27В).

Таким образом, активация экспрессии *ADAMTS6* ассоциирована с приобретением клетками АЛ мезенхимального фенотипа в ходе ЭМП (Рис. 26). Полученные данные указывают на то, что роль данного гена не ограничивается регуляцией TGF-β1-индуцированного ЭМП, а распространяется на случаи ЭМП, вызванного разнородными внешними и внутренними стимулами (Рис. 27). В совокупности эти результаты подтверждают, что ген *ADAMTS6* является важным компонентом регуляторной сети ЭМП. Предполагается, что данная функция реализуется через кодируемую им протеазу ADAMTS6, что обосновывает целесообразность рассмотрения данной протеазы в рамках мишень-ориентированной разработки анти-ЭМП препаратов.

3.5.3. Исследование ингибирования *ADAMTS6* как стратегии подавления ЭМП в клетках аденокарциномы легкого человека *in vitro*

На следующем этапе было экспериментально изучено, способно ли ингибирование ADAMTS6 заблокировать процесс ЭМП в клетках АЛ. Поскольку в настоящее время отсутствуют селективные ингибиторы ADAMTS6, для этой цели был использован нокаут гена *ADAMTS6*.

3.5.3.1. Получение *ADAMTS6*-нокаутной линии клеток аденокарциномы легкого человека

В Лаборатории геномного редактирования ИХБФМ СО РАН м.н.с. Матвеевой А. М. под руководством к.х.н. Степанова Г. А. была получена линия клеток A549 нокаутных по гену *ADAMTS6* (далее – AD6-KO). Дизайн нокаута предполагал введение разрывов в интрон 3 и экзон

4 *ADAMTS6* с помощью системы CRISPR/Cas9 для нарушения открытой рамки считывания. Анализ клеток AD6-KO с помощью ПЦР и секвенирования показал успешное внесение двух мутаций: (1) делеции размером 1047 п.н., охватывающей части экзона 4 и интронов 3 и 4; и (2) инверсии между сайтами двуцепочечных разрывов ДНК, нарушающей структуру экзона. Предполагалось, что обе мутации приведут к потере функционального белка *ADAMTS6* (Рис. 28А).

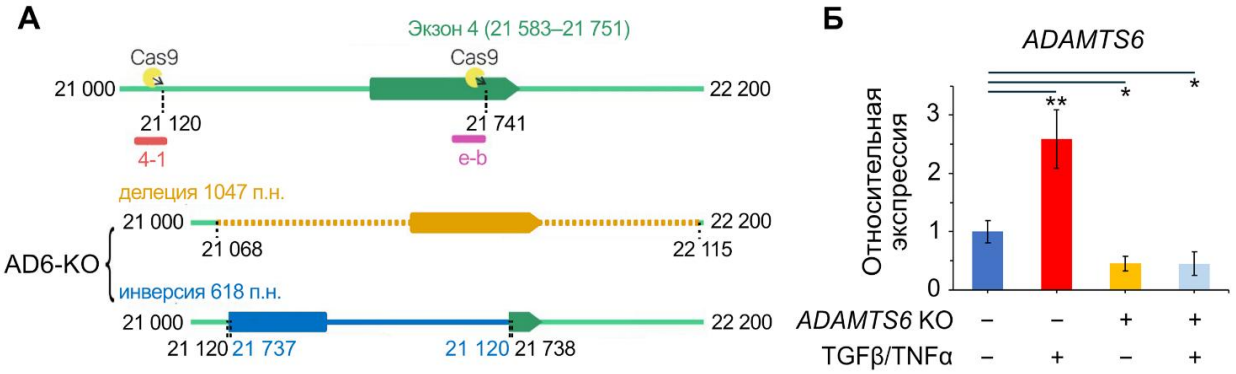

Рисунок 28. CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут *ADAMTS6* в клетках A549. (**А**) Мутации, индуцированные CRISPR/Cas9 в клетках A549. (**Б**) Относительная экспрессия *ADAMTS6* в контрольных клетках A549 и клетках с нокаутом *ADAMTS6* (AD6-KO), инкубированных в присутсвии TGF-β (4 нг/мл) в течение 3 дней и TNF-α (20 нг/мл) в течение последующих 2 дней. Контроль – клетки, инкубированные без индукции в течение 5 дней. Оценку проводили методом RT-qPCR с нормализацией по гену домашнего хозяйства *GAPDH*. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Нокаут *ADAMTS6* был подтвержден с помощью RT-qPCR с использованием праймеров, расположенных ниже установленных мутационных участков. Как показано на Рис. 28Б, клетки AD6-KO характеризовались 2,2-кратным снижением экспрессии *ADAMTS6* по сравнению с родительской линией A549. Лашат и коллеги ранее продемонстрировали, что последовательная инкубация клеток A549 с 4 нг/мл TGF-β1 в течение 3 дней и 20 нг/мл TNF-α в течение 2 дней значительно усиливает экспрессию *ADAMTS6* [28]. Используя этот протокол, было установлено, что TGF-β1/TNF-α увеличивали экспрессию *ADAMTS6* в клетках дикого типа в 2,6 раза по сравнению с необработанным контролем, тогда как AD6-KO не отвечали на эту стимуляцию (Рис. 28Б).

Таким образом, проведенные манипуляции нарушили структуру гена *ADAMTS6* и привели к утрате его стабильной экспрессии в клетках AD6-KO, предположительно, за счет нонсенс-опосредованного распада РНК [352]. Опираясь на это, клетки AD6-KO были далее использованы для оценки влияния нокаута *ADAMTS6* на ЭМП.

3.5.3.2. Функциональная оценка нокаута *ADAMTS6* в клетках аденокарциномы легких человека

Было исследовано влияние нокаута *ADAMTS6* на функциональные характеристики клеток, ассоциированные с ЭМП. Чтобы исключить влияние клеточной гибели на результаты, был проведен МТТ-тест, который показал, что клетки AD6-KO и родительская линия A549 имели соспоставимую жизнеспособность после 24 и 48 ч инкубации (Рис. S7A). Интересно, что световая микроскопия не выявила влияния нокаута *ADAMTS6* на клеточную морфологию (Рис. S7Б).

Поскольку ЭМП стимулирует метастазирование (см. п. 1.1.5), был изучен миграционный и инвазивный потенциал клеток AD6-KO. Было установлено, что данные клетки обладают меньшей подвижностью по сравнению с контрольными клетками A549 как в эксперименте с зарастанием царапины (Рис. 29A), так и при миграции через пористую мембрану (Рис. 29Б). Кроме этого, клетки AD6-KO обладали меньшим инвазивным потенциалом по сравнению с клетками A549. Несмотря на сходный уровень инвазии на ранних этапах, после 72 ч наблюдения клетки AD6-KO инвазировали матригель медленнее клеток A549; статистически значимая разница в 29,6% была выявлена через 83 ч (Рис. 29B). Полученные данные хорошо согласуются с предыдущими работами, выявившими снижение подвижности и инвазивности клеток РМЖ и КР при нокдауне *ADAMTS6* [232,353].

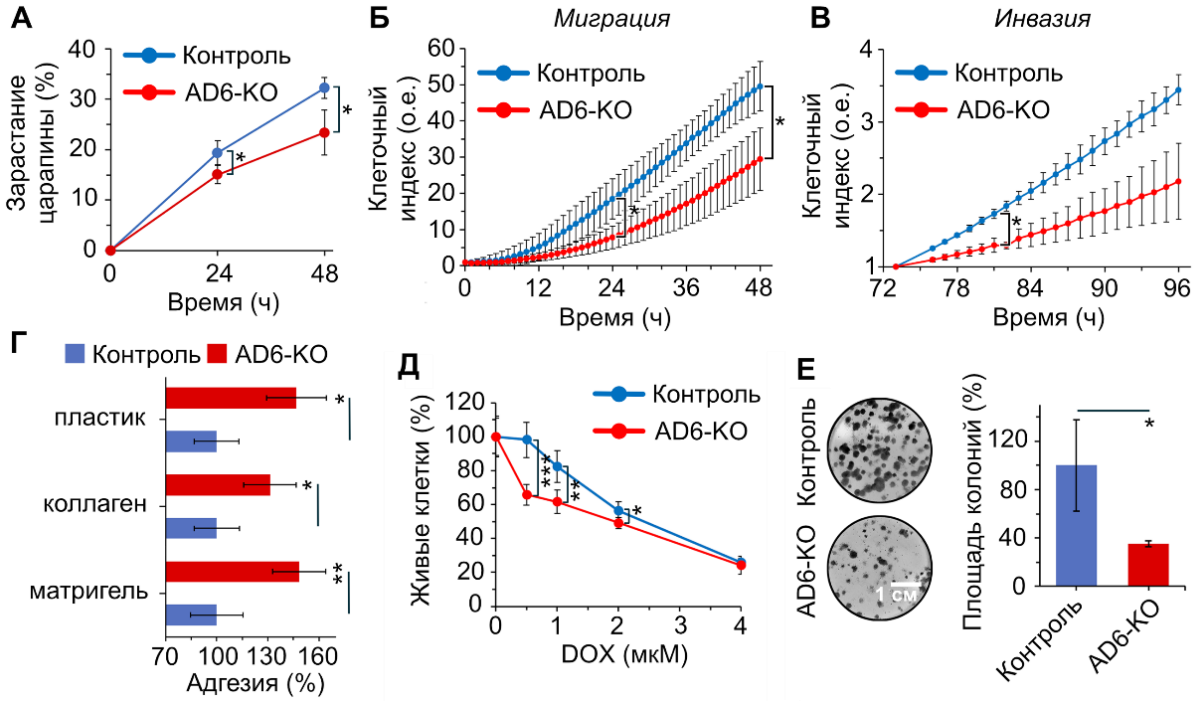

Рисунок 29. Влияние нокаута гена *ADAMTS6* на функциональные характеристики клеток АЛ, ассоциированные с ЭМП. Контроль – родительские клетки A549; AD6-KO – клетки A549 с нокаутом *ADAMTS6*. (**А**) Миграция клеток, оцененная с помощью теста зарастания царапины. Фотографии царапин показаны на Рис. S7B (**Б**) Миграция клеток, оцененная в режиме реального

времени с использованием трансвелл-системы xCELLigence, с нормализацией клеточного индекса относительно временной точки 1 ч. (**В**) Инвазия клеток через матригель, оцененная в режиме реального времени с использованием трансвелл-системы xCELLigence, с нормализацией клеточного индекса относительно временной точки 73 ч. (**Г**) Адгезия клеток к культуральному пластику, коллагену и матригелю. (**Д**) Жизнеспособность клеток после 72 ч инкубации с указанными концентрациями DOX, оцененная с помощью МТТ-теста. (**Е**) Образование клеточных колоний после 10 дней инкубации. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Известно, что для миграции клеткам необходима умеренная адгезия к ВКМ, в то время, как избыточная адгезия, напротив, ограничивает подвижность [354]. Анализ с использованием различных субстратов показал, что адгезия клеток AD6-KO к культуральному пластику, коллагену и матригелю была на 46,8%, 31,3% и 48,6% выше по сравнению с клетками A549 соответственно (Рис. 29Г). Эти результаты позволяют предположить, что подавление миграции и инвазии клеток АЛ при нокауте *ADAMTS6* может быть опосредовано усилением их адгезии к ВКМ. Это согласуется с ранее показанной способностью ADAMTS6 расщеплять синдекан-4 и тем самым ингибировать формирование фокальных контактов эпителиальными клетками [355].

Помимо метастазирования, ЭМП также способствует снижению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии посредством индукции стволовых характеристик (см. п. 1.1.7). Как видно из Рис. 29Д, нокаут *ADAMTS6* достоверно повышал чувствительность клеток АЛ к цитотоксическому действию DOX ($IC_{50}^{AD6\text{-}KO}$ = 1,45 мкМ, IC_{50}^{A549} = 2,4 мкМ). Интересно, что, согласно данным Жанг и коллег, гиперэкспрессия *ADAMTS6* подавляет устойчивость клеток РЯ к цисплатину, что указывает на то, что влияние данной протеазы на химиорезистентность зависит от клеточного контекста и/или используемого препарата [356].

Поскольку клоногенный потенциал коррелирует со стволовыми свойствами опухолевых клеток [342], далее была проанализирована способность клеток AD6-KO и A549 формировать клеточные колонии *in vitro*. Через 10 дней после посева в планшеты в низкой плотности клетки AD6-KO формировали колонии, площадь которых оказалась в 2,9 раза меньше, чем у колоний A549, что указывает на снижение клоногенного потенциала при нокауте *ADAMTS6* (Рис. 29Е). Аналогичный эффект *ADAMTS6* на колониеобразование был показан ранее в клетках КР [232].

Таким образом, нокаут *ADAMTS6* приводил к снижению миграции, инвазии и клоногенности клеток АЛ, а также к повышению их чувствительности к DOX, что свидетельствует об ингибировании функциональных характеристик, связанных с ЭМП-опосредованной агрессивностью опухолевых клеток.

3.5.3.3. Молекулярный механизм влияния нокаута *ADAMTS6* на ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека

На следующем этапе был исследован молекулярный механизм ингибирования ЭМП при нокауте *ADAMTS6* в клетках АЛ. Методом RT-qPCR было установлено, что по сравнению с клетками A549 клетки AD6-KO характеризовались 3,8-кратным повышением экспрессии эпителиального гена *CDH1* и 1,5-кратным снижением экспрессии мезенхимальных генов *CDH2*, *VIM* и *TWIST1* (Рис. 30А). Аналогичная регуляция экспрессии CDH1, CDH2 и VIM на белковом уровне была показана ранее в клетках КР при нокдауне *ADAMTS6* [232]. В соответствии с этими данными, клетки AD6-KO показали более низкий уровень белка VIM, чем клетки A549 (Рис. 30Б). Важно отметить, что выявленная *in vitro* зависимость находит подтверждение в клинических данных: положительная корреляция между уровнями белков ADAMTS6 и VIM была продемонстрирована в опухолях пациентов с раком легкого [28]. Таким образом, изменения уровней молекулярных маркеров в клетках АЛ после нокаута *ADAMTS6* подтверждают ингибирование ЭМП, продемонстрированное выше с помощью функциональных тестов (Рис. 29).

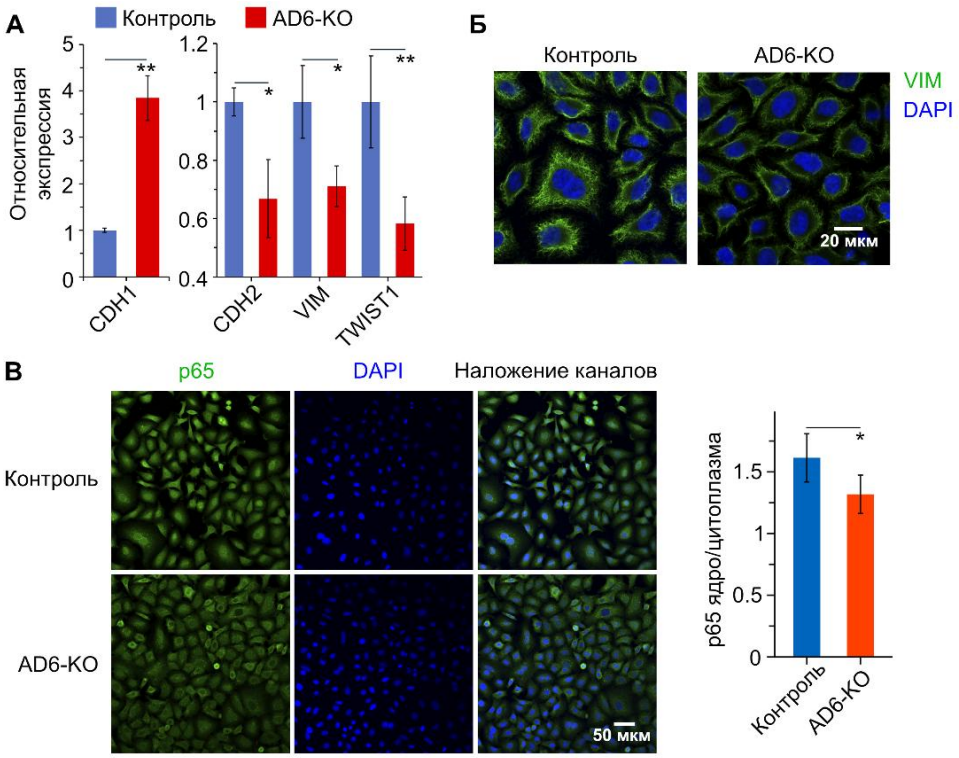

Рисунок 30. Анализ молекулярного механизма ингибирующего влияния нокаута *ADAMTS6* на ЭМП клеток АЛ. Контроль – родительские клетки A549; AD6-KO – клетки A549 с нокаутом *ADAMTS6*. (**А**) Относительная экспрессия эпителиального маркера *CDH1* и мезенхимальных маркеров *CDH2*, *VIM* и *TWIST1*, оцененная с помощью RT-qPCR и нормализованная по экспрессии *GAPDH*. (**Б**) ИФ-окрашивание VIM (зеленый) и окрашивание ядер DAPI (синий). (**В**)

ИФ-окрашивание NF-κB p65 (зеленый) и окрашивание ядер DAPI (синий). Ядерная транслокация p65 оценивалась по соотношению интенсивности зеленой флуоресценции в области ядра к данному показателю в цитоплазме. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Поскольку ADAMTS6 индуцирует ЭМП в клетках рака толстой кишки через путь NF-κB [232] и действует как индуктор пути TGF-β1/SMAD2/3 в неопухолевых клетках [233,355], мы предположили, что ЭМП-ингибирующее действие нокаута *ADAMTS6* связано с влиянием на эти сигнальные пути. Действительно, нокаут *ADAMTS6* подавлял ядерную транслокацию субъединицы NF-κB p65: методом ИФ было показано снижение соотношения ядерной и цитоплазматической фракций p65 в клетках AD6-KO по сравнению с клетками A549 (Рис. 30В). В то же время анализ ядерной транслокации SMAD2/3 не выявил достоверных различий между клетками AD6-KO и A549 (Рис. S7Г). Таким образом, нокаут *ADAMTS6* подавляет ЭМП и сдвигает фенотип клеток АЛ в эпителиальную сторону за счет ингибирования пути NF-κB, но не пути TGF-β1/SMAD2/3.

3.5.4. Связь ADAMTS6 с клинико-патологическим профилем пациентов с АЛ

На завершающем этапе была оценена перспективность ADAMTS6 в качестве терапевтической мишени с помощью поиска связи между уровнем экспрессии *ADAMTS6* в опухолевой ткани пациентов АЛ и их выживаемостью. В наборе данных TCGA-LUAD уровень мРНК *ADAMTS6* оказался выше в опухолевой ткани, чем в нормальной легочной (Рис. 31А). Для оценки прогностической роли гена были построены кривые выживаемости Каплана-Мейера на основе медианной экспрессии *ADAMTS6* с помощью платформ GEPIA2 и KMplotter, используя два независимых источника транскриптомных данных: базу TCGA-LUAD и данные кДНК-микрочипирования соответственно. В когорте TCGA-LUAD группа пациентов с высокой экспрессией *ADAMTS6* показала более короткую безрецидивную выживаемость по сравнению с группой с низкой экспрессией *ADAMTS6* (p = 0,0036) (Рис. 31Б). Аналогичная тенденция наблюдалась и для общей выживаемости, однако различия не достигли статистической значимости (p = 0,095). В объединенной когорте данных кДНК-микрочипирования группа пациентов с высоким уровнем экспрессии *ADAMTS6* продемонстрировала худшие показатели как выживаемости без прогрессирования ($p = 8,2 \times 10^{-16}$), так и общей выживаемости ($p = 3,3 \times 10^{-7}$) (Рис. 31В). Эти данные указывают на то, что высокая экспрессия *ADAMTS6* может служить маркером неблагоприятного прогноза при АЛ. Аналогичная функция была показана для генов *ADAMTS4* [26] и *ADAMTS16* [27], которые также кодируют протеазы семейства ADAMTS, способные индуцировать ЭМП. Таким образом, экспрессия гена *ADAMTS6* повышена в

опухолевой ткани и ассоциирована с худшей выживаемостью пациентов. Это косвенно указывает на то, что подавление кодируемой этим геном протеазы ADAMTS6 может способствовать улучшению прогноза выживаемости при АЛ.

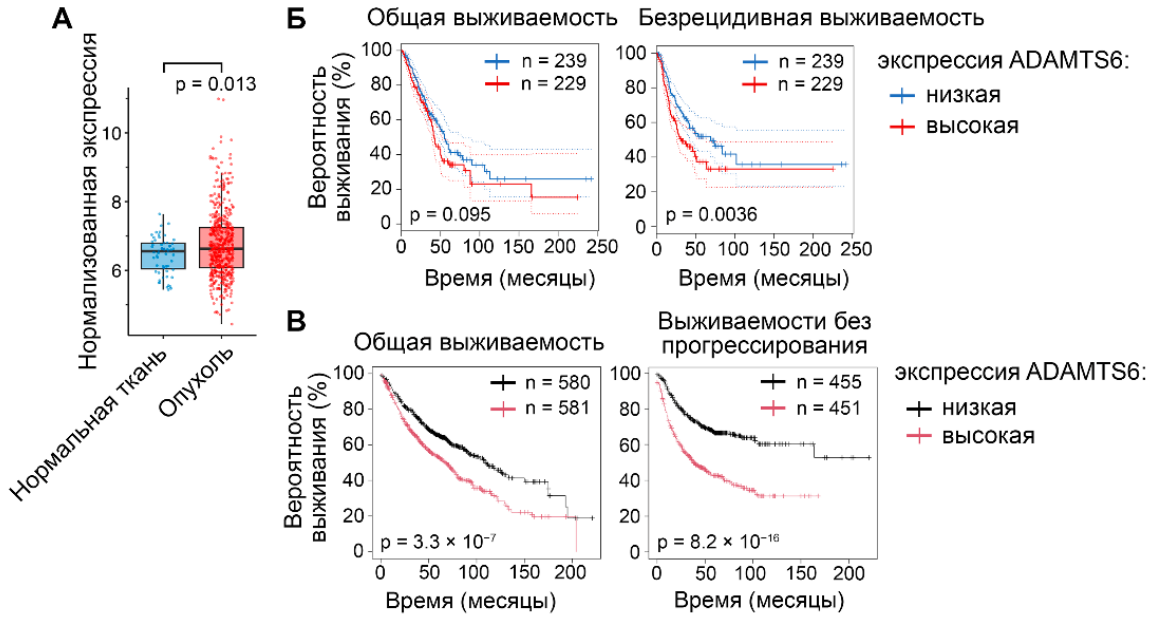

Рисунок 31. Корреляции экспрессии *ADAMTS6* с клинико-патологическими характеристиками у пациентов с АЛ. (**А**) Экспрессия *ADAMTS6* в нормальных тканях легких и опухолях из набора данных TCGA-LUAD. (**Б**, **В**) Анализ выживаемости по Каплану-Мейеру у пациентов с АЛ, стратифицированных по медианному уровню экспрессии *ADAMTS6*, выполненный с использованием GEPIA2 (**Б**) и KMplotter (**В**).

Подводя итог, биоинформатическое исследование выявило ключевую роль гена *ADAMTS6* в регуляции ЭМП в клетках АЛ (см. п. 3.5.1, 3.5.2). Эксперименты *in vitro* показали, что нокаут *ADAMTS6* подавляет ЭМП клеток A549, что приводит к снижению их метастатического потенциала и повышению чувствительности к DOX (см. п. 3.5.3). Анализ клинических данных продемонстрировал, что высокая экспрессия гена *ADAMTS6* служит маркером неблагоприятного прогноза при АЛ (см. п. 3.5.4). Эти данные позволяют предположить, что регуляция ЭМП данным геном обусловена ферментативной активностью кодируемой им протеазы ADAMTS6. Несмотря на установленную роль сигнального пути NF-κB в данном процессе (Рис. 30В), необходимы дальнейшие исследования для идентификации субстратов ADAMTS6, опосредующих модуляцию этого сигнального каскада.

Таким образом, проведенное комплексное исследование показывает, что протеаза ADAMTS6 представляет собой перспективную мишень для мишень-ориентированного поиска новых ингибиторов ЭМП с целью подавления метастазирования и повышения эффективности химиотерапии при АЛ.

3.6. Поиск потенциальных ингибиторов ПМП клеток глиобластомы в библиотеке низкомолекулярных соединений с помощью перепрофилирования, основанного на анализе транскриптомных данных

В ряде исследований было продемонстрировано успешное перепрофилирование известных лекарственных препаратов в ингибиторы ЭМП методом connectivity map [29,30,302]. В основе данного подхода лежит выявление отрицательной связности между генными сигнатурами ЭМП и профилями экспрессии опухолевых клеток, обработанных лекарственными агентами (Рис. 7). В рамках настоящей диссертационной работы перепрофилирование, основанное на методе connectivity map, было впервые применено для выявления ингибиторов ПМП, перспективных для использования в терапии ГБ.

3.6.1. Определение генной сигнатуры ПМП

Для того чтобы идентифицировать генную сигнатуру ПМП – набор генов, играющих ключевую роль в регуляции данного процесса, – был проведен анализ ранее опубликованных транскриптомных данных. На первом этапе была оценена выраженность ПМП в опухолях пациентов с ГБ в соответствии с методическим подходом, описанным ранее [318]. Методом GSVA было оценено обогащение пронейральными и мезенхимальными генами в опухолях ГБ из набора данных TCGA-GBM. Далее для каждой опухоли был рассчитан показатель ПМП (PMTscore) путем вычитания показателя обогащения пронейральных генов из соответствующего показателя мезенхимальных генов. Ожидаемо, самые высокие и самые низкие значения PMTscore были обнаружены в опухолях мезенхимального и пронейрального подтипов соответственно, в то время как классический подтип продемонстрировал промежуточные значения (Рис. 32А), что согласуется с ранее опубликованными данными [357].

Для определения точности оценки статуса ПМП образцы ГБ с высоким и низким PMTscore, разделенные по медианному значению данного показателя, были сравнены между собой. Кривые Каплана-Мейера показали более низкую общую выживаемость в группе пациентов с высоким PMTscore, что указывает на более агрессивный характер опухолевого роста (Рис. 32Б).

ПМП является подтипом ЭМП, специфичным для клеток ГБ, и характеризуется экспрессией множества маркерных генов, общих с ЭМП, включая *CDH2, VIM, FN1* и *SNAI1/2* (см. п. 1.1.8.1). В связи с этим анализ GSEA выявил обогащение генной сигнатуры ЭМП в опухолях с высоким PMTscore по сравнению с опухолями с низким PMTscore (Рис. 32В). Кроме того, было показано обогащение наборов генов, ассоциированных с гипоксией, воспалением и сигнальным путем TGF-β (Рис. 32В), – ключевыми факторами опухолевого микроокружения, индуцирующими ПМП [174–176,178]. Полученные данные подтверждают связь PMTscore с выраженностью ПМП в опухолях ГБ и обосновывают корректность его использования в последующем анализе.

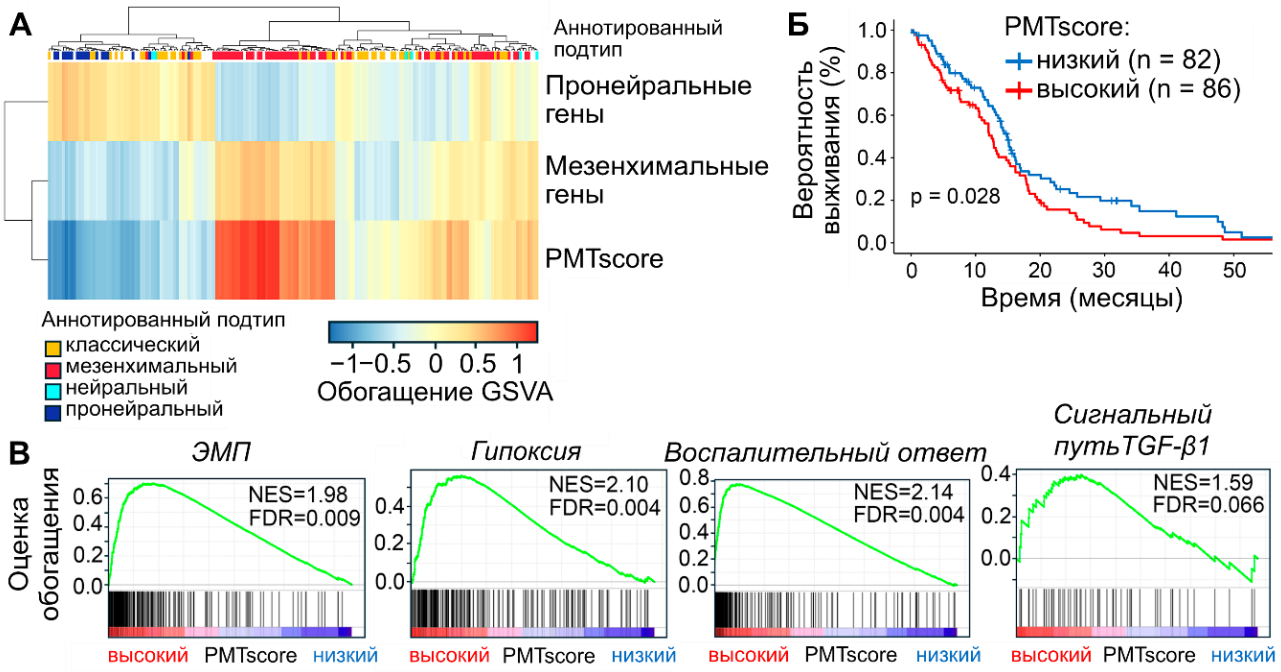

Рисунок 32. Идентификация ПМП-ассоциированного кластера генов в транскриптомах опухолей пациентов с ГБ из когорты TCGA-GBM. (**А**) Оценка выраженности ПМП в опухолях пациентов с ГБ. Тепловая карта показывает оценки обогащения пронейральных и мезенхимальных генов, определенные с помощью GSVA, а также PMTscore. Цветовая легенда в верхней части тепловой карты указывает на подтип опухоли, извлеченный из метаданных когорты TCGA-GBM. (**Б**) Кривые выживаемости Каплана-Мейера для пациентов, стратифицированных по медианному показателю PMTscore. (**В**) Обогащение генных сигнатур, ассоциированных с ЭМП, гипоксией, воспалительной реакцией и сигнальным путем TGF-β, определенное методом GSEA.

На втором этапе был выполнен поиск генов, связанных с ПМП. Методом WGCNA в данных TCGA-GBM был обнаружен 21 кластер (модуль) коэкспрессирующихся генов, каждый из которых был обозначен определенным цветом (Рис. 33А). Для каждого опухолевого образца были рассчитаны показатели eigengene, соответствующие первым главным компонентам матриц экспрессии выявленных модулей и являющиеся интегральными оценками их активности [358]. Далее с помощью корреляционного анализа была оценена взаимосвязь между генными модулями и PMTscore. Для «синего» модуля была показана самая сильная положительная корреляция eigengene и PMTscore (R = 0,73) (Рис. 33Б), что указывает на связь активации входящих в него генов с индукцией ПМП. Данный модуль, состоящий из 694 генов, был выбран для дальнейшего анализа.

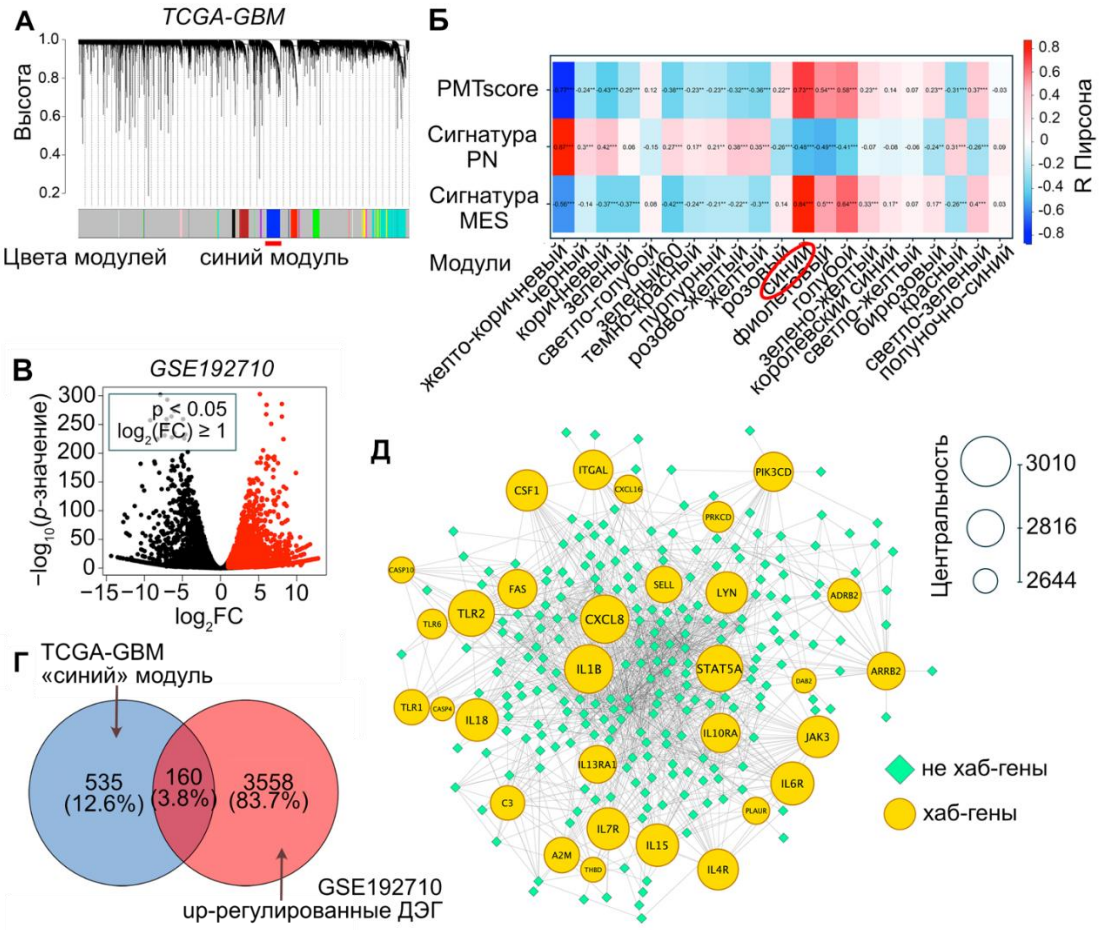

Рисунок 33. Идентификация генной сигнатуры ПМП. (**А**) Кластерная дендрограмма опухолей TCGA-GBM, сконструированная с помощью WGCNA. Цветами обозначены модули коэкспрессирующихся генов; красная линия указывает на «синий» модуль, для которого в ходе последующего анализа была показана ассоциация с ПМП. (**Б**) Взаимосвязь модулей с ПМП, оцененная путем анализа корреляции eigengene и PMTscore. Красный овал указывает на «синий» модуль, обладающий наибольшим коэффициентом корреляции Пирсона (R). (**В**) Диаграмма «вулкан», отображающая результаты анализа дифференциальной экспрессии в мезенхимальных клетках ГБ G7 по сравнению с пронейральными клетками ГБ E2 из набора данных GSE192710. Гены, экспрессия которых значительно повышена ($p < 0,05$ и $\log_2FC \geq 1$), представлены красными точками. (**Г**) Пересечение up-регулированных ДЭГ из набора данных GSE192710 и генов из ПМП-ассоциированного «синего» модуля WGCNA. (**Д**) Идентификация хаб-генов. На основе up-регулированных ДЭГ (**В**) была построена генная сеть, в которой было оценено положение генов из пересечения (**Г**) с помощью CytoHubba, в результате чего был выявлен 31 хаб-ген. Центральность – средний ранг гена по критериям Degree, MCC, MNC, EPC, Closeness и Radiality.

Поскольку в образцах опухолей пациентов содержатся неопухолевые клетки, включая иммунные клетки и нейроны [166], был проведен дополнительный этап фильтрации ПМП-

ассоциированных генов, чтобы сфокусировать проводимый анализ исключительно на клетках ГБ. Для этого использовали независимый набор данных RNA-seq клеток ГБ *in vitro*, депонированный в GEO (GSE192710). Анализ дифференциальной экспрессии выявил 3718 ДЭГ, up-регулированных в клетках G7 по сравнению с клетками E2, относящихся к мезенхимальному и пронейральному подтипам ГБ соответственно (Рис. 33В). Пересечение этих ДЭГ с генами «синего» модуля позволило выявить 160 генов, специфичных для клеток ГБ (Рис. 33Г).

На третьем этапе был проведен анализ генных сетей для поиска узловых генов, потенциально играющих важную роль в регуляции ПМП. На основе up-регулированных ДЭГ с использованием данных о белок-белковых взаимодействиях из базы STRING была реконстрирована генная ассоциативная сеть, топология которой затем была исследована с помощью шести критериев центральности плагина CytoHubba (Degree, MCC, MNC, EPC, Closeness и Radiality) в программе Cytoscape. Среди 160 генов, специфичных для клеток ГБ, был выявлен 31 хаб-ген, занимающий центральной положение в сети и, следовательно, обладающий значительным регуляторным потенциалом (Рис. 33Д). Важно отметить, что 25 из этих хаб-генов ранее не входили в сигнатуру мезенхимального подтипа ГБ [167], что обусловило целесообразность дальнейшего детального изучения их роли в регуляции ПМП.

Экспрессия хаб-генов положительно коррелировала с обогащением генных сигнатур, связанных с ПМП (ЭМП, гипоксия, воспаление и активация пути TGF-β), в опухолях пациентов из когорты TCGA-GBM (Рис. 34А). Для дополнительной верификации были проанализированы независимые клинические наборы транскриптомных данных: Китайский атлас генома глиомы (CGGA) и данные Гравендела и коллег из Медицинского центра Университета Эразма, Нидерланды (Gravendeel), содержащие информацию о 218 и 155 пациентах с ГБ соответственно [359,360]. По аналогии с процедурами, примененными к анализу данных TCGA-GBM, показатель PMTscore был рассчитан для каждого образца опухоли на основе обогащения мезенхимальных и пронейральных генов. Анализ выявил положительную корреляцию экспрессии хаб-генов с PMTscore и обогащением сигнатуры ЭМП во всех наборах данных (Рис. 34Б). Примечательно, что мезенхимальные гены демонстрировали закономерности, сходные с таковыми для хаб-генов, включая положительные ассоциации с процессами, сопряженными с ПМП (Рис. 34А), и с PMTscore (Рис. 34Б), в то время как пронейральные гены демонстрировали отрицательные корреляции со всеми перечисленными признаками (Рис. 34А, Б). Эти результаты показывают, что хаб-гены являются регуляторами ПМП и перспективными маркерами мезенхимального подтипа ГБ.

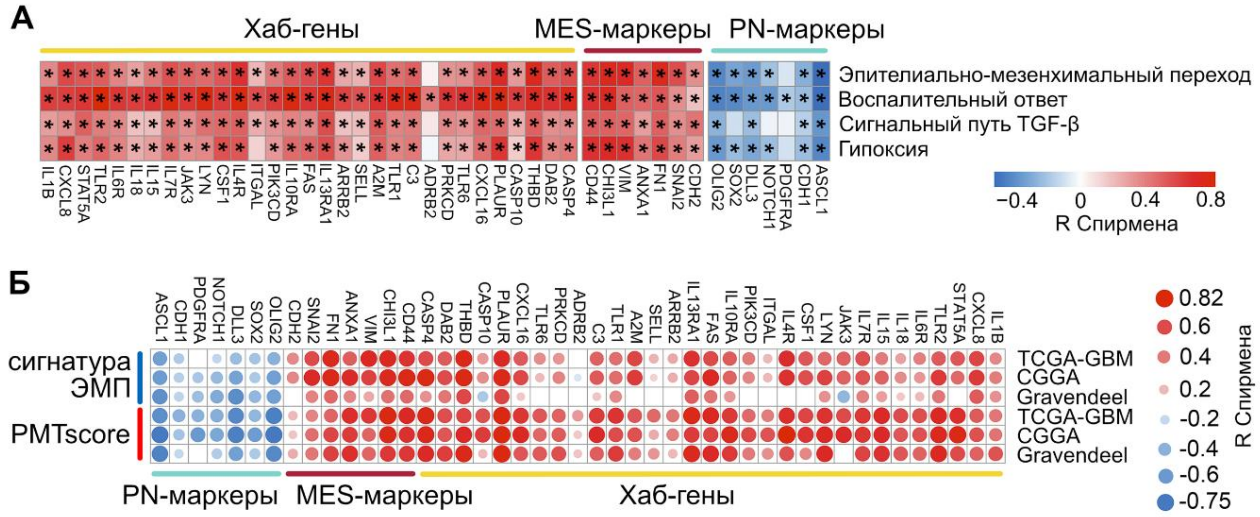

Рисунок 34. Верификация генной сигнатуры ПМП. (**А**) Корреляция Спирмена между экспрессией хаб-генов и показателями обогащения GSVA для сигнатур ЭМП, воспалительной реакции, сигнального пути TGF-β и гипоксии в наборе данных TCGA-GBM. Значимые результаты отмечены звездочкой (* p < 0,05). (**Б**) Анализ корреляции Спирмена между экспрессией хаб-генов и PMTscore / оценкой обогащения сигнатуры ЭМП в наборах данных TCGA-GBM, CGGA и Gravendeel. Приведены только статистически значимые результаты (p < 0,05).

На важную роль хаб-генов в регуляции ПМП может также указывать их ассоциация с выживаемостью пациентов с ГБ. С помощью одномерного анализа Кокса было установлено, что повышение экспрессии 24 хаб-генов ассоциировано с худшим прогнозом выживаемости пациентов с ГБ (HR > 1), причем для *CASP4*, *IL13RA1*, *PLAUR* и *THBD* данная закономерность была показана во всех исследованных наборах данных (Рис. 35А). Для верификации прогностической роли этих четырех генов были построены кривые Каплана-Мейера на основе данных TCGA-GBM. Для каждого гена отмечена тенденция к снижению общей выживаемости пациентов при высоком уровне экспрессии, однако только в случае *PLAUR* и *IL13RA1* она преодолела порог статистической значимости (p < 0,05) (Рис. 35Б). Интересно, что *PLAUR* ранее был идентифицирован как ген, входящий в сигнатуру мезенхимального подтипа ГБ [167], в то время как *IL13RA1* в ней отсутствовал. Возможно, негативная ассоциация экспрессии данных генов с выживаемостью пациентов с ГБ связана с их способностью индуцировать ПМП. Действительно, нокдаун *PLAUR*, кодирующего рецептор урокиназы, смещает экспрессию ПМП маркеров с сторону мезенхимального фенотипа, а также подавляет сфероидный рост клеток ГБ, что указывает на его важную роль в регуляции ПМП [361]. *IL13RA1*, кодирующий субъединицу альфа-1 рецептора интерлейкина-13, ранее не изучался в контексте ПМП, однако его способность

индуцировать ЭМП в клетках КР [362] позволяет предположить аналогичное влияние на процесс ПМП, что требует дальнейшего исследования.

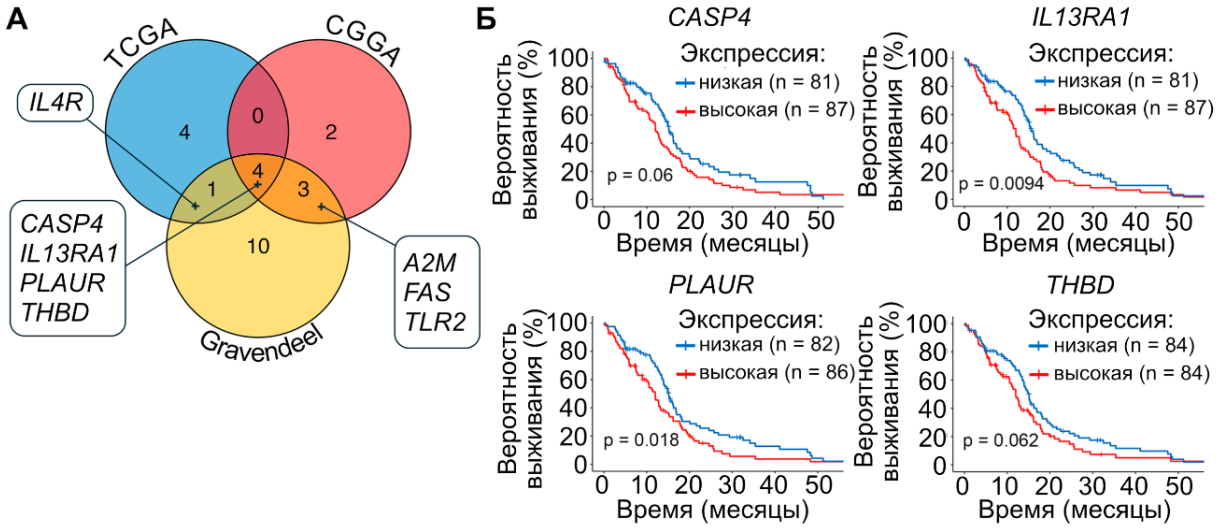

Рисунок 35. Ассоциация между экспрессией хаб-генов и показателями выживаемости пациентов при ГБ. (**А**) Пересечение прогностически значимых хаб-генов, выявленных с помощью одномерного анализа Кокса (HR > 1) в наборах данных TCGA-GBM, CGGA и Gravendeel. (**Б**) Кривые выживаемости Каплана-Мейера для пациентов из наборов данных TCGA-GBM, стратифицированные по медианным уровням экспрессии прогностически-значимых хаб-генов.

Таким образом, была выявлена генная сигнатура ПМП, представленная 31 хаб-геном. Эти гены потенциально вовлечены в регуляцию ПМП (Рис. 33Д), ассоциированы с ключевыми факторами микроокружения, индуцирующими данный процесс, включая гипоксию, воспаление и TGF-β (Рис. 34А), а также являются маркерами неблагоприятного прогноза при ГБ (Рис. 35А, Б). Полученные результаты подтверждают перспективность выявленного набора генов в качестве итоговой сигнатуры для поиска ингибиторов ПМП с помощью метода connectivity map.

3.6.2. *In silico* перепрофилирование с использованием подходов connectivity map и сетевой фармакологии

Connectivity map анализ был проведен на основе выявленной сигнатуры ПМП с помощью платформы CLUE, в результате чего были установлены 120 низкомолекулярных соединений, снижающих экспрессию хаб-генов в опухолевых клетках различного гистогенеза, включая предстательную и молочную железы, легкие, толстую кишку и печень (Рис. 36А). Интересно, что список выявленных препаратов включал одобренный для лечения ГБ TMZ и вемурафениб, проходящий в настоящее время клинические испытания на пациентах с ГБ [158]. Как показано на Рис. 36А, наибольшая группа идентифицированных препаратов включала 35 соединений, воздействующих на сигнальные пути нейромедиаторов, в том числе модуляторы

адренергических рецепторов (7 соединений), ацетилхолиновой (6) и серотониновой (6) систем. Вторая по величине категория состояла из 25 соединений, нацеленных на киназы, включая VEGFR (4), JNK (2), GSK-3 (2), ERK5 (2) и LRRK2 (2). Третья категория включала 12 ингибиторов некиназных ферментов, в основном метилтрансфераз (3), пептидаз (3), деацетилаз (2) и пренилтрансфераз (2). Помимо этих основных классов, было выявлено несколько дополнительных категорий лекарственных препаратов, включая модуляторы апоптоза (10), ядерных рецепторов (9) и мембранного транспорта (5), противомикробные препараты (7), противовоспалительные средства (5) и другие (12) (Рис. 36А). Все эти соединения обладают отрицательной связностью с генной сигнатурой ПМП, что указывает на их потенциальную способность подавлять данный процесс.

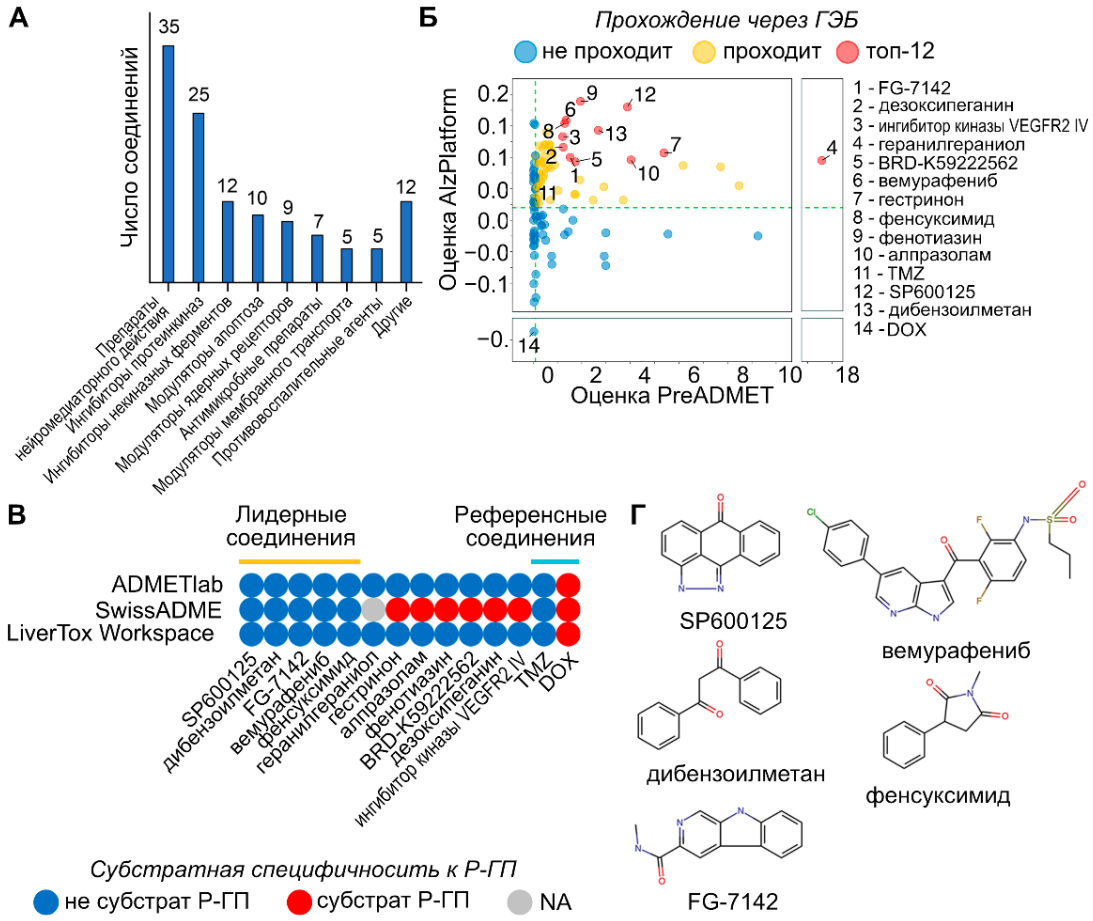

Рисунок 36. *In silico* перепрофилирование низкомолекулярных препаратов для таргетного ингибирования ПМП. (**А**) Механизмы действия перепрофилированных препаратов, подавляющих сигнатуру ПМП, согласно данным анализа connectivity map на платформе CLUE. (**Б**) Предсказание прохождения через ГЭБ для выявленных препаратов с помощью платформ AlzPlatform и PreADMET. TMZ и DOX служат соответственно отрицательным и положительным контролем. (**В**) Предсказание субстратной специфичности к Р-ГП для препаратов, способных проникать через ГЭБ, с помощью платформ LiverTox Workspace, SwissADME и ADMETlab. DOX

и TMZ служат соответственно положительным и отрицательным контролем. (**Г**) Структура лидерных соединений.

Поскольку для эффективного применения в терапии ГБ ингибиторы ПМП должны достигать опухоли в головном мозге [158], была проведена дополнительная фильтрация выявленных препаратов по способности проникать через ГЭБ с использованием хемоинформатических платформ AlzPlatform и PreADMET. Согласно полученным результатам (Рис. 36Б), препарат сравнения DOX корректно идентифицирован как не проникающий через ГЭБ, тогда как TMZ успешно его преодолевает, что подтверждает достоверность проведенного анализа. Как видно из Рис. 36Б, 59 соединений из 120 проанализированных обладали высоким потенциалом прохождения через ГЭБ, сопоставимым с таковым для TMZ или превышающим его (Рис. 36Б).

Поскольку Р-гликопротеин (Р-ГП) является наиболее значимым эффлюксным насосом в ГЭБ, ограничивающим эффективное накопление низкомолекулярных препаратов в мозге [158], дополнительно было оценено, являются ли его субстратами 12 молекул-лидеров, обладающих наивысшей предсказанной ГЭБ-проникающей способностью среди 59 соединений (Рис. 36Б; отмечены красным цветом). Анализ с помощью хемоинформатических платформ LiverTox Workspace, SwissADME и ADMETlab показал, что пять соединений из этого списка, включая SP600125, дибензоилметан, FG-7142, вемурафениб и фенсуксимид, не являются субстратами для Р-ГП (Рис. 36В, Г).

Для последующего отбора соединения для тестирования *in vitro* был применен метод сетевой фармакологии, исходя из предположения, что молекула с наиболее выраженной связью с генной сигнатурой ПМП будет с большей вероятностью подавлять данный патологический процесс. Первичные белковые мишени лидерных соединений были идентифицированы из базы данных STITCH, после чего были реконструированы их взаимодействия с 31-генной хабовой сигнатурой ПМП с помощью STRING, что позволило построить ассоциативную сеть «лекарственный препарат – белковая мишень – хаб-ген» (Рис. 37А). Только вемурафениб, SP600125 и FG-7142 формировали связи с хаб-генами через свои первичные мишени, тогда как дибензоилметан и фенсуксимид вообще не имели прямых связей с ассоциативной сетью. Вероятно, эффект дибензоилметана и фенсуксимида на экспрессию хаб-генов опосредуется более протяженными сигнальными каскадами (Рис. 37А). Анализ ассоциативной сети с использованием CytoHubba показал, что SP600125 обладает самым высоким показателем центральности среди лидерных соединений (Рис. 37Б), что свидетельствует о его наиболее тесной интеграции в регуляторную сеть ПМП. На основании этих результатов SP600125 был выбран для последующего тестирования анти-ПМП потенциала *in vitro*. ПМП-модулирующий эффект вемурафениба, также

обладающего высоким уровнем связности с хаб-генами ПМП, может представлять интерес для будущих исследований.

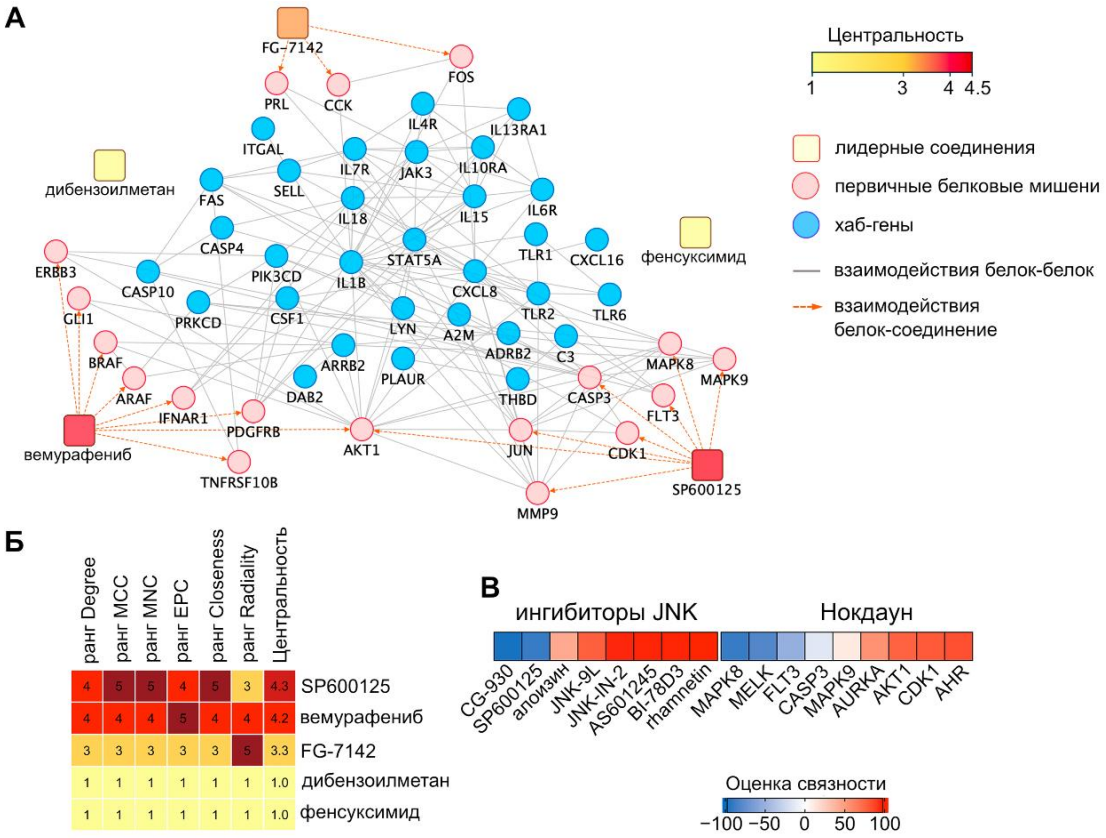

Рисунок 37. *In silico* анализ анти-ПМП активности SP600125. (**А**) Ассоциативная сеть «лекарственный препарат – белковая мишень – хаб-ген». Центральность – средний ранг соединения по критериям Degree, MCC, MNC, EPC, Closeness и Radiality. (**Б**) Тепловая карта, демонстрирующая ранжирование лидерных соединений по шести топологическим метрикам в ассоциативной сети «лекарственный препарат – белковая мишень – хаб-ген». Центральность – средний ранг соединения-лидера. (**В**) Стандартизованный показатель связности τ ингибиторов JNK или нокдауна белковых мишеней SP600125 с генной сигнатурой ПМП.

SP600125 является мультитаргетным соединением, ингибирующим как свою основную мишень JNK1/2, так и ряд других белков, включая FLT3, CASP3, AKT1 и CDK1 (из базы данных STITCH), а также AHR, AURKA и MELK, выявленные при анализе литературы [363–365] (Рис. 37А). Чтобы определить, какая из этих мишеней вовлечена в анти-ПМП потенциал SP600125, с помощью метода connectivity map было оценено, как изменяется экспрессия 31-генной сигнатуры ПМП при действии других ингибиторов JNK1/2 и нокдауне генов мишеней SP600125. Среди ингибиторов JNK только CC-930 (танзисертиб) показал отрицательную связность (подавление сигнатуры), аналогично SP600125, в то время как другие соединения имели положительный показатель τ (активация сигнатуры) (Рис. 37В). Из этого следует, что анти-ПМП потенциал

SP600125 определяется не только его прямым воздействием на JNK1/2, но и на другие мишени. Нокдаун генов *MELK* или *FLT3* показал отрицательную связность с генной сигнатурой ПМП (Рис. 37В), что позволяет предположить, что кодируемые ими киназы могут играть ключевую роль в активности SP600125. Это согласуется с ранее выявленной связью MELK и FLT3 с инвазивностью опухолей головного мозга [366,367]. Интересно, что лишь нокдаун *MAPK8* (кодирует JNK1), но не *MAPK9* (кодирует JNK2), показал отрицательную ассоциацию с ПМП (Рис. 37В). Это предполагает, что селективное подавление JNK1 может быть перспективным для ингибирования ПМП; однако разработка соединений с такой активностью затруднено из-за высокой гомологии активных сайтов JNK1 и JNK2 (98%) [368]. Таким образом, согласно проведенному анализу *in silico,* эффект SP600125 на ПМП предположительно опосредован его ингибирующим действием на JNK1, MELK и FLT3, что требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

3.6.3. Исследование способности соединения-лидера SP600125 ингибировать ПМП клеток глиобластомы человека *in vitro*

Далее была изучена способность SP600125 подавлять ПМП клеток ГБ *in vitro*. На первом этапе было оценено его влияние на жизнеспособность клеток ГБ человека (U87 и U118) и мыши (EPNT-5 и GL261), а также нетрансформированных фибробластов человека hFF3. Как показано на Рис. 38А, SP600125 снижал жизнеспособность всех линий ГБ дозозависимым образом. Клетки U87 оказались более чувствительными к действию соединения (IC_{50}^{U87} = 7,3 ± 0,9 мкМ) по сравнению с другими клеточными линиями (IC_{50}^{EPNT-5} = 35,9 ± 9,1 мкМ, IC_{50}^{U118} = 36,8 ± 4,2 мкМ, IC_{50}^{GL261} = 47,3 ± 13,2 мкМ). Интересно, что фибробласты hFF3 реагировали на SP600125 в значительно меньшей степени, чем опухолевые клетки (IC_{50}^{hFF3} = 87,1 ± 22,7 мкМ) (Рис. 38А), что свидетельствует о селективности его цитотоксического действия. Так как клетки U87 обладали наибольшей чувствительностью к SP600125, последующие эксперименты были проведены на данной клеточной линии.

Поскольку ЭМП-модулирующий эффект SP600125 в отношении клеток карцином был продемонстрирован ранее как при длительной инкубации [369], так и после короткой предынкубации [370], влияние SP600125 на подвижность клеток U87 было изучено с использованием обоих режимов обработки. Длительная инкубация с нетоксичными концентрациями SP600125 умеренно снижала миграционный потенциал клеток U87: самая высокая доза (2,5 мкМ) подавляла подвижность на 19,3% и 21,3% через 24 и 48 ч соответственно. Напротив, кратковременная 30-мин предынкубация клеток с 20 мкМ SP600125 оказала значительно более выраженный эффект, подавляя подвижность клеток в 1,5 и 2,1 раза через 24 и 48 ч соответственно после удаления соединения (Рис. 38Б, S8A). Поскольку короткая

предынкубации оказывала более выраженный эффект на миграционный потенциал клеток ГБ, именно этот режим был использован в последующих экспериментах.

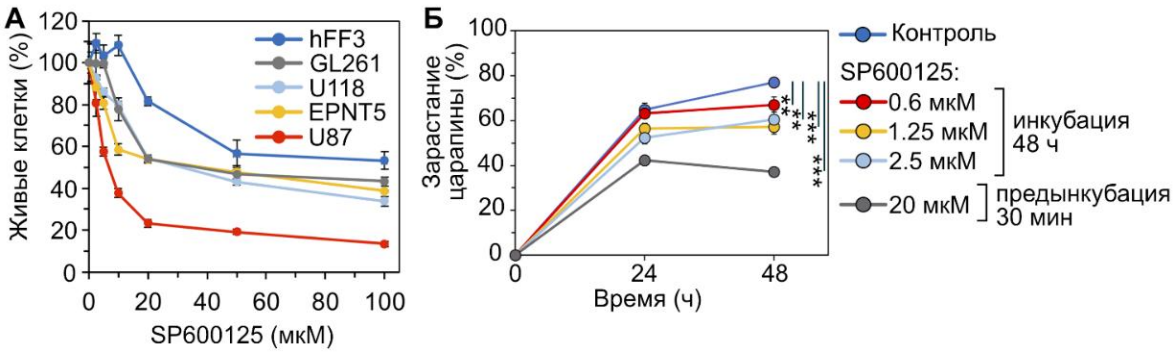

Рисунок 38. Выбор эффективной схемы инкубации клеток ГБ с SP600125. (**А**) Жизнеспособность клеток ГБ человека (U87 и U118) и мыши (EPNT-5 и GL261), а также фибробластов человека (hFF3) после 48 ч инкубации с SP600125, оцененная с помощью МТТ-теста. (**Б**) Влияние различных режимов инкубации с SP600125 на миграцию клеток U87 в тесте зарастания царапины. Клетки U87 инкубировали с низкими концентрациями SP600125 (0 – 2,5 мкМ) в течение 48 ч или предынкубировали с 20 мкМ SP600125 в течение 30 минут, а затем инкубировали в отсутствие соединения в течение оставшегося времени. Фотографии царапин показаны на Рис. S8A. Данные представлены как среднее значение ± SD. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Далее была изучена биоактивность SP600125 в условиях индукции ПМП факторами микроокружения. Ранее в работе Лин и коллег была показана способность SP600125 подавлять ПМП, стимулированный в клетках ГБ воспалительным цитокином IL33 [371]. Однако оставался открытым вопрос, может ли данный антрапиразолон ингибировать ПМП в клетках ГБ на фоне действия TGF-β1 и гипоксии (Рис. 32B).

Изучение эффекта SP600125 на TGF-β1-индуцированный ПМП клеток U87 было начато с оценки их функциональных характеристик. Световая микроскопия показала, что TGF-β1 в концентрации 50 нг/мл значительно изменял морфологию клеток U87 через 48 ч, увеличивая их вытянутость (AR) на 37,5% и площадь на 74,4% по сравнению с контролем. Предынкубация клеток с 20 мкМ SP600125 в течение 30 мин перед их стимуляцией TGF-β1 частично блокировала эти изменения, уменьшая площадь клеток на 26,2%, не оказывая при этом влияния на AR (Рис. 39A).

Анализ с помощью трансвелл-системы xCELLigence показал, что TGF-β1 усиливал миграцию клеток U87 в 2,4 раза по сравнению с контролем через 24 ч, тогда как предынкубация с SP600125 снижала этот параметр в TGF-β1-индуцированных клетках на 32,4%. Примечательно, что SP600125 не оказывал влияния на миграцию клеток в отсутствие TGF-β1 (Рис. 39Б). Эти

результаты свидетельствуют о том, что SP600125 ослабляет фенотипические проявления TGF-β1-индуцированного ПМП в клетках U87.

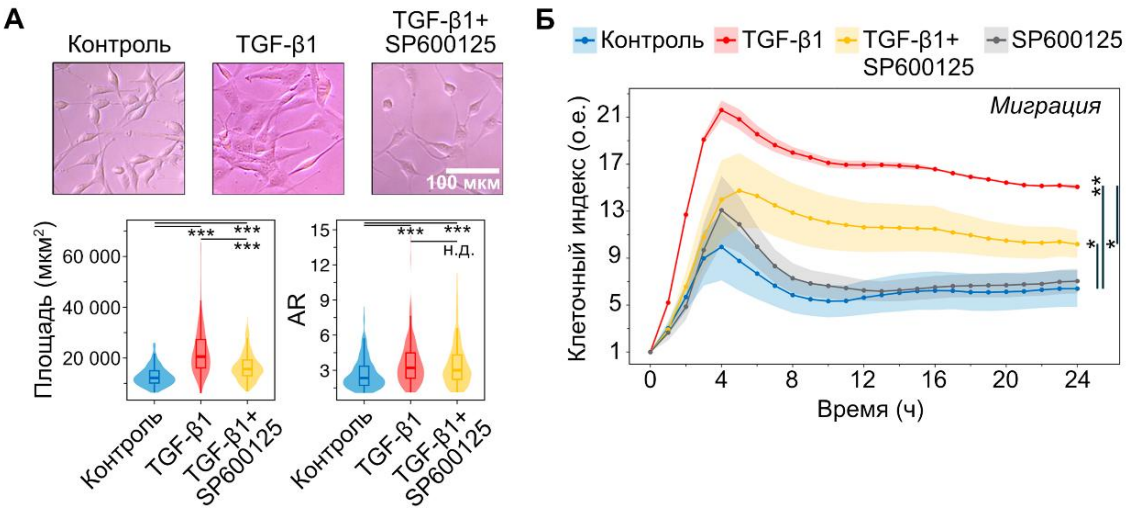

Рисунок 39. Влияние SP600125 на фенотипические признаки ПМП клеток U87, индуцированного TGF-β1. (**А**) Морфология клеток U87 после 30 мин индукции SP600125 (20 мкМ) и последующей 48 ч стимуляции TGF-β1 (50 нг/мл). На графиках показано распределение клеток по площади и AR. (**Б**) Миграция клеток, оцененная в режиме реального времени с использованием трансвелл-системы xCELLigence, с нормализацией клеточного индекса относительно временной точки 0 ч. Клетки U87 инкубировали 30 мин с SP600125, затем 48 ч с TGF-β1, после чего помещали в верхнюю камеру CIM-планшета и изучали миграцию через пористую мембрану в течение 24 ч. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, н.д. – статистически недостоверно.

Далее было проанализировано влияние SP600125 на уровень молекулярных маркеров мезенхимального фенотипа в TGF-β1-индуцированных клетках U87. По данным RT-qPCR, 48-часовое воздействие TGF-β1 увеличивало экспрессию *FN1*, *CDH2*, *SNAI2* и *PLAUR* в 2,8, 14,4, 1,9 и 2,2 раза соответственно по сравнению с контролем. Предынкубация клеток с SP600125 сохраняла экспрессию данных генов на уровне, близком к нестимулированному контролю (Рис. 40А). Интересно, что, несмотря на усиление экспрессии гена *CDH2* (Рис. 40А), TGF-β1 не влиял на уровень кодируемого им белка N-кадгерина (CDH2) через 48 ч (Рис. 40Б). Это несоответствие может объясняться изначальным смещением фенотипа клеток U87 в сторону мезенхимального состояния в отсутствие стимулов ПМП, как было показано ранее [361]. Тем не менее SP600125 снижал уровень N-кадгерина (CDH2) в TGF-β1-индуцированных клетках U87 ниже контрольного (Рис. 40Б, S8Б). Конфокальная микроскопия показала значительное увеличение уровня виментина (VIM) в клетках U87 под действием TGF-β1, а SP600125 эффективно подавлял данный эффект (Рис. 40В).

Таким образом, способность SP600125 снижать экспрессию мезенхимальных маркеров (Рис. 40А – В) согласуется с данными функциональных тестов (Рис. 39), демонстрируя выраженный анти-ПМП эффект исследуемого соединения.

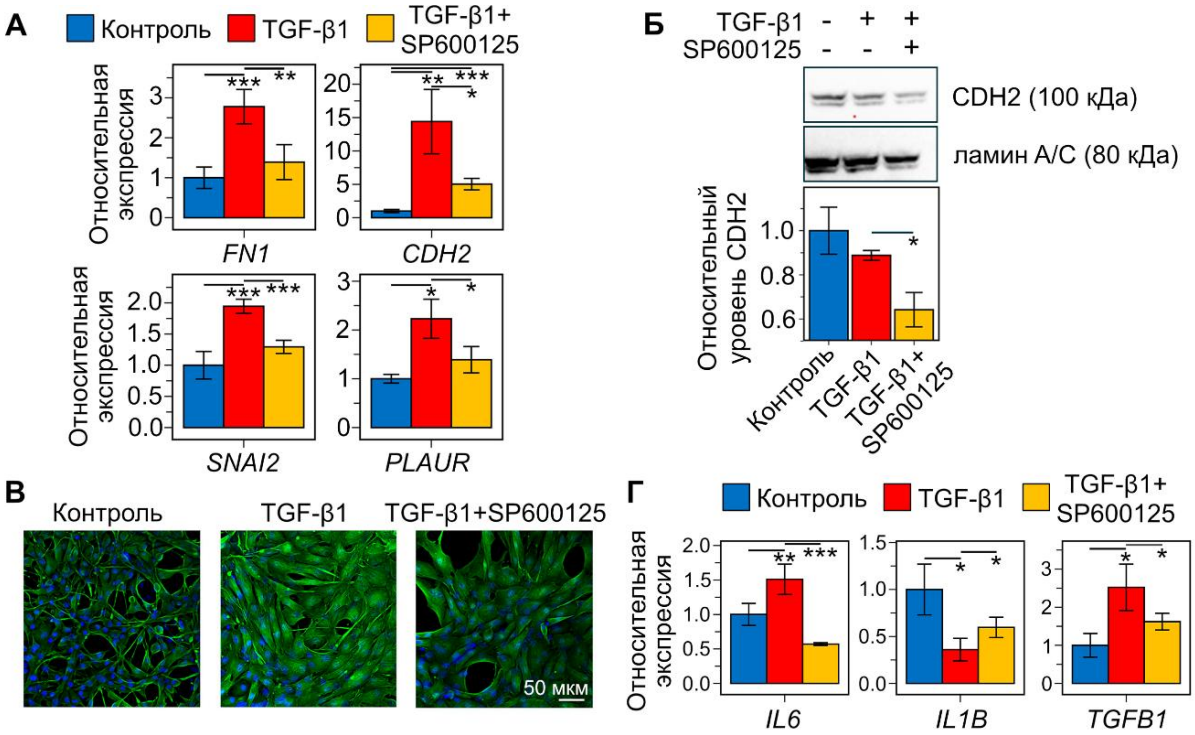

Рисунок 40. Анализ молекулярных маркеров ПМП в клетках U87 после 30 мин предынкубации с SP600125 (20 мкМ) и 48 ч стимуляции TGF-β1 (50 нг/мл). (**А**) Относительная экспрессия мезенхимальных генов, измеренная методом RT-qPCR и нормализованная по гену домашнего хозяйства *HPRT*. (**Б**) Относительный уровень белка CDH2, оцененный с помощью Вестерн-блоттинга и нормализованный по контролю загрузки ламину A/C. Оригиналы блотов приведены на Рис. S8Б. (**В**) Уровень VIM, оцененный с помощью ИФ-окрашивания. (**Г**) Относительная экспрессия ассоциированных с воспалением генов, измеренная методом RT-qPCR и нормализованная по гену домашнего хозяйства *HPRT*. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Учитывая выявленную выше связь экспрессии ПМП-ассоциированных хаб-генов с индукцией воспаления в опухолях ГБ (Рис. 34А), а также способность клеток ГБ формировать свое микроокружение, секретируя IL-6, IL-1β и TGF-β1 [372], было дополнительно проанализировано, влияет ли SP600125 на иммунорегуляторную активность клеток U87 на фоне ПМП. Как показано на Рис. 40Г, TGF-β1 увеличил экспрессию *IL6* в 1,5 раза и *TGFB1* в 2,5 раза, снизив при этом экспрессию *IL1B* в 2,8 раза по сравнению с контролем. Интересно, что предынкубация клеток с SP600125 подавляла все TGF-β1-индуцированные эффекты: уровни экспрессии *IL6* и *TGFB1* снизились на 62,7% и 35,6% соответственно, в то время как экспрессия

IL1B повысилась на 66,7% по сравнению с TGF-β1-индуцированными клетками (Рис. 40Г). Эти данные свидетельствуют о способности SP600125 снижать иммуномодулирующую активность клеток ГБ, усиленную под влиянием ПМП.

Поскольку гипоксия является одним из ключевых факторов опухолевого микроокружения, индуцирующих ПМП (Рис. 32В), в финальном блоке работы была проанализирована способность SP600125 ингибировать ПМП в гипоксических условиях. Для этого была использована модель химической гипоксии, вызванной хлоридом кобальта ($CoCl_2$), который стабилизирует фактор гипоксии HIF-1α, что позволяет моделировать ассоциированные с гипоксией процессы *in vitro* [373].

Как показано на Рис. 41А, 48-часовая индукция клеток U87 $CoCl_2$ в концентрации 400 мкМ вызывала значительные изменения в их морфологии, включая увеличение AR и площади клеток на 54,8% и 33,9% соответственно. Предынкубация с SP600125 снижала эффект $CoCl_2$ на вытянутость клеток, уменьшая AR на 20,2%, однако площадь клеток достоверно не изменялась при этом воздействии (Рис. 41А). RT-qPCR показал, что $CoCl_2$ достоверно повышает экспрессию мезенхимальных генов *CDH2, SNAI2* и *PLAUR* (Рис. 41Б), однако его эффект оказался менее выраженным по сравнению с TGF-β1 (Рис. 40А). SP600125 снижал $CoCl_2$-индуцированную up-регуляцию *CDH2* и *PLAUR*, не влияя при этом на экспрессию *SNAI2* (Рис. 41Б).

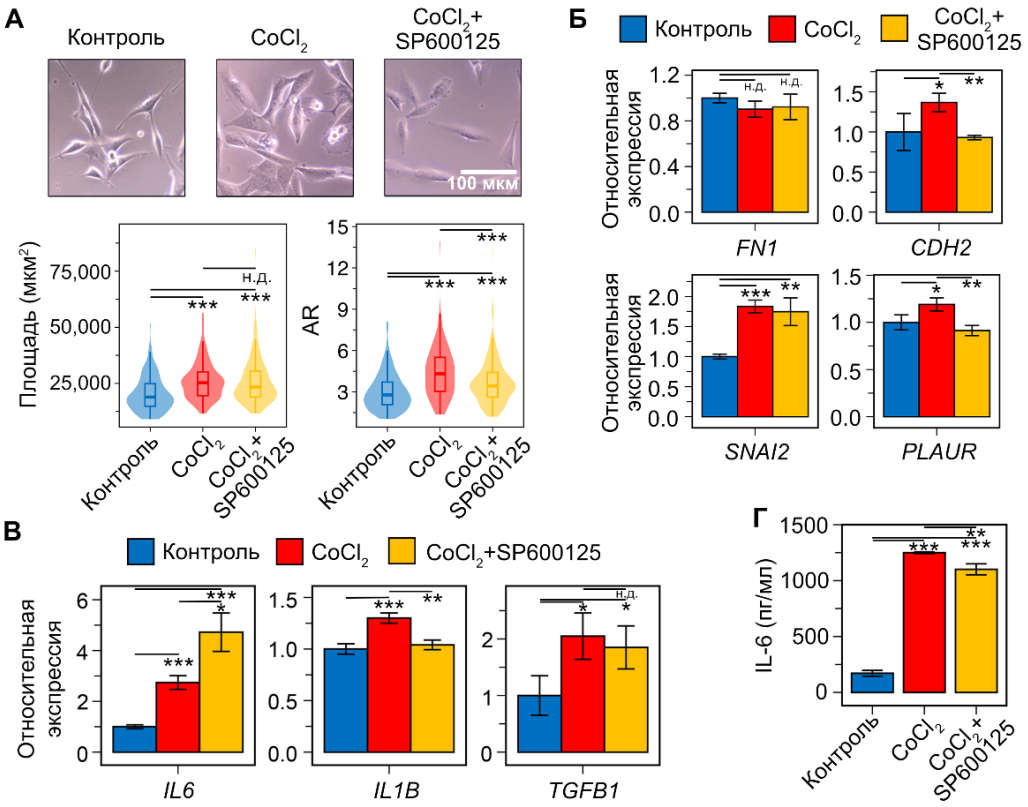

Рисунок 41. Влияние SP600125 на гипоксия-индуцированный ПМП клеток ГБ U87 *in vitro*. (**А**) Морфология клеток U87 после 30 мин индукции SP600125 (20 мкМ) и последующей 48-часовой

стимуляции $CoCl_2$ (400 мкМ). На графиках в левой и правой панелях показано распределение клеток по площади и вытянутости (AR) соответственно. (**Б**) Относительные уровни экспрессии мезенхимальных генов в клетках U87 после обработки SP600125 и $CoCl_2$, измеренные методом RT-qPCR и нормализованные по гену домашнего хозяйства *HPRT*. (**В**) Относительные уровни экспрессии генов *IL6, IL1B* и *TGFB1* в клетках U87, обработанных SP600125 и $CoCl_2$, оцененные методом RT-qPCR. (**Г**) Уровни IL-6 в культуральной среде клеток U87, стимулированных SP600125 и $CoCl_2$, оцененные с помощью ИФА. Данные представлены как среднее значение ± SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, н.д. – статистически недостоверно.

Как и в случае с TGF-β1, индукция ПМП в условиях химической гипоксии сопровождалась изменением экспрессии иммуномодулирующих генов. В частности, обработка клеток $CoCl_2$ приводила к увеличению экспрессии *IL6, IL1B* и *TGFB1* в 2,7, 1,3 и 2,1 раза соответственно (Рис. 41В). Следует отметить, что SP600125 оказывал дифференцированное влияние на экспрессию указанных генов, полностью блокируя $CoCl_2$-индуцированную гиперэкспрессию *IL1B*, одновременно стимулируя экспрессию *IL6* в 1,7 раза. При этом уровень экспрессии *TGFB1* под действием SP600125 не претерпевал статистически значимых изменений (Рис. 41В).

Для более детального изучения стимулирующего эффекта SP600125 на экспрессию *IL6* было оценено его влияние на секрецию IL-6 в $CoCl_2$-индуцированных клетках с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). В соответствии с данными RT-qPCR, обработка $CoCl_2$ вызывала увеличение секреции IL-6 в 7,3 раза в клетках U87 по сравнению с контролем. Интересно, что SP600125 оказывал не стимулирующее, а, наоборот, ингибирующее действие на секрецию IL-6 $CoCl_2$-индуцированными клетками (Рис. 41Г).

Таким образом, несмотря на определенные расхождения между результатами RT-qPCR и ИФА, было показано, что гипоксия-ассоциированный ПМП связан с повышением экспрессии *IL6* и *IL1B*, а SP600125 частично подавляет данный эффект. Интерлейкины IL6 и IL-1β, кодируемые указанными генами, играют важную роль в формировании микроокружения, поддерживающего прогрессирование ГБ. Ранее было установлено, что индукция гипоксии в клетках ГБ приводит к HIF-1α-зависимому увеличению уровня ТФ ZNF395, активирующего экспрессию *IL6* и *IL1B* [374]. IL-6 индуцирует аутофагию посредством активации STAT3, что приводит к снижению апоптотической гибели клеток ГБ и повышению их устойчивости к TMZ [375]. IL-1β увеличивает уровни молекул межклеточной адгезии ICAM1 и VCAM1 через активацию сигнальных путей p38 и NF-κB в клетках ГБ, что приводит к усилению их адгезивных взаимодействий с макрофагами в условиях ко-культивирования [376]. Изучение модуляции эффектов IL-6 и IL-1β в клетках ГБ с помощью SP600125 является перспективным направлением для дальнейших исследований. В целом, SP600125 смягчает, хотя и не полностью, последствия гипоксии для клеток ГБ (Рис. 41),

подтверждая свой анти-ПМП эффект, продемонстрированный в модели индукции TGF-β1 (Рис. 39, 40).

Таким образом, эксперименты *in vitro* подтвердили, что SP600125 эффективно ингибирует ПМП, что согласуется с результатами проведенного анализа *in silico*. Были отмечены незначительные различия в индукции ПМП под действием TGF-β1 и $CoCl_2$, однако SP600125 значительно предотвращал приобретение клетками ГБ ключевых признаков мезенхимального фенотипа в обеих моделях, включая изменение морфологии, усиление миграции и повышение экспрессии мезенхимальных генов.

Подводя итог, используя перепрофилирование, основанное на методе connectivity map, было выявлено пять лекарственных препаратов, обладающих высоким потенциалом для ингибирования ПМП: SP600125, вемурафениб, FG-7142, дибензоилметан и фенсуксимид. Их отрицательная связь с генной сигнатурой ПМП и способность проникать через ГЭБ, предсказанные *in silico*, указывают на перспективность исследования их биологической активности в условиях *in vitro* и *in vivo*. В частности, впервые показано, что SP600125 эффективно подавляет ПМП клеток ГБ, индуцированный TGF-β и гипоксией. Полученные результаты не только расширяют понимание механизма противоопухолевого действия SP600125, но и подтверждают применимость метода connectivity map к перепрофилированию биологически активных соединений для поиска новых средств терапии ГБ.

Заключение

Проведенное диссертационное исследование позволило идентифицировать новые молекулярные мишени и соединения для ингибирования мезенхимального перехода в опухолевых клетках, которые могут быть применены в терапии онкологических заболеваний.

Во-первых, с применением фенотип-ориентированного подхода было продемонстрировано, что цианоенон-несущие пентациклические тритерпеноиды обладают выраженным ингибирующим потенциалом в отношении мезенхимальной пластичности опухолевых клеток. В частности, выявлена способность СМ подавлять TGF-β-индуцированный ЭМП клеток АЛ, что позволяет использовать данное соединение в качестве структурной платформы для разработки корректоров ЭМП-подобных процессов в опухолях различного гистогенеза. Отсутствие влияния СМ на лептин-индуцированную миграцию клеток нейробластомы Neuro2a, по-видимому, указывает на избирательный характер его действия, ограниченный сигнальными путями, ассоциированными с TGF-β. В соответствии с этим, пара-метиланилид солоксолона (пМАС) эффективно ингибирует TGF-β-стимулированный ПМП клеток ГБ, подавляя сигнальную ось TGF-β/SMAD2/3 и тем самым предотвращая активацию мезенхимальных генов и усиление инвазивного потенциала опухолевых клеток. Кроме того, пМАС синергически усиливает

цитотоксический эффект TMZ в клетках ГБ за счет повышения продукции внутриклеточных АФК, а также подавления стволовых свойств клеток, в том числе их способности к самообновлению и внутриклеточной активности ALDH. Противоопухолевый потенциал СМ и пМАС был подтвержден в экспериментах *in vivo*: СМ подавляет метастазирование в модели мышиной меланомы B16, а пМАС ингибирует рост ГБ U87 и улучшает ее чувствительность к TMZ в ксенографтной модели на мышах.

Во-вторых, в ходе мишень-ориентированного поиска протеаза ADAMTS6 была идентифицирована в качестве новой молекулярной мишени для анти-ЭМП терапии АЛ. Биоинформатический анализ продемонстрировал ключевую роль гена *ADAMTS6* в регуляции ЭМП в клетках АЛ. В соответствии с этим нокаут гена *ADAMTS6* в клетках АЛ приводил к достоверному снижению миграционной и инвазивной активности, экспрессии мезенхимальных генов, а также устойчивости к DOX за счет подавления сигнального пути NF-κB. На основании полученных результатов можно заключить, что ингибирование ADAMTS6 представляет собой перспективную стратегию для подавления процесса ЭМП, что обосновывает целесообразность разработки селективных ингибиторов данной протеазы для терапии АЛ.

В-третьих, в рамках перепрофилирования лекарственных препаратов *in silico* была показана принципиальная возможность использования метода connectivity map для поиска новых ингибиторов ПМП. В ходе работы был выявлен анти-ПМП потенциал у SP600125, FG-7142, дибензоилметана, вемурафениба и фенсуксимида. С помощью экспериментов *in vitro* подтверждена корректность *in silico* предсказания: SP600125, обладающий наиболее тесной связью с генной сигнатурой ПМП, эффективно ингибировал ПМП в клетках U87, индуцированный TGF-β и гипоксией.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют новые стратегии подавления ЭМП злокачественных клеток. Они формируют основу для разработки новых противоопухолевых средств, направленных на подавление метастатического потенциала и лекарственной устойчивости опухолевых клеток.

4. Выводы

1. Полусинтетические тритерпеноиды солоксолон метил и пара-метиланилид солоксолона являются перспективными противоопухолевыми агентами, модулирующими фенотипическую пластичность опухолевых клеток:
   1.1. Солоксолон метил ингибирует TGF-β1-индуцированный эпителиально-мезенхимальный переход клеток A549 аденокарциномы легкого человека *in vitro* и метастазирование B16 меланомы мыши *in vivo*.
   1.2. Солоксолон метил ослабляет прометастатический эффект лептина в клетках Neuro2a нейробластомы мыши: восстанавливает адгезивные свойства клеток и подавляет сигнальный путь ERK1/2 *in vitro*, не влияя при этом на лептин-индуцированную клеточную подвижность.
   1.3. Пара-метиланилид солоксолона блокирует пронейрально-мезенхимальный переход клеток U87 глиобластомы человека, индуцированный TGF-β1, снижает их стволовые свойства и устойчивость к темозоломиду *in vitro*, а также подавляет рост подкожных ксенографтов U87 *in vivo*.
2. Протеаза ADAMTS6 является перспективной мишенью для разработки ингибиторов эпителиально-мезенхимального перехода. Ген *ADAMTS6* участвует в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода клеток A549 аденокарциномы легкого человека: его нокаут снижает метастатический потенциал клеток и их устойчивость к доксорубицину *in vitro*, что ассоциировано с подавлением сигнального пути NF-κB.
3. Анализ транскриптомных данных с использованием метода connectivity map позволяет идентифицировать низкомолекулярные ингибиторы пронейрально-мезенхимального перехода. Применение данного подхода к библиотеке известных лекарственных агентов с последующей верификацией *in vitro* выявило антрапиразолон SP600125, эффективно подавляющий пронейрально-мезенхимальный переход клеток U87 глиобластомы человека, индуцированный TGF-β1 и хлоридом кобальта.

5. Список литературы

1. Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Soerjomataram I., Jemal A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA: A Cancer Journal for Clinicians. American Cancer Society. – 2024. – Vol. 74. – № 3. – P. 229–263.

2. Самсонов Ю.В., Костин А.А. Онкологическая помощь и смертность от рака: региональный анализ в контексте России // Сибирский онкологический журнал. – 2025. – Vol. 24. – № 2. – P. 16–25.

3. Dagenais G.R., Leong D.P., Rangarajan S., Lanas F., Lopez-Jaramillo P., Gupta R., Diaz R., Avezum A., Oliveira G.B.F., Wielgosz A., Parambath S.R., Mony P., Alhabib K.F., Temizhan A., Ismail N., Chifamba J., Yeates K., Khatib R., et al. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study // Lancet. – 2020. – Vol. 395. – № 10226. – P. 785–794.

4. Gerstberger S., Jiang Q., Ganesh K. Metastasis // Cell. – 2023. – Vol. 186. – № 8. – P. 1564–1579.

5. Vollmann-Zwerenz A., Leidgens V., Feliciello G., Klein C.A., Hau P. Tumor Cell Invasion in Glioblastoma // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21. – № 6. – P. 1932.

6. Yang L., Shi P., Zhao G., Xu J., Peng W., Zhang J., Zhang G., Wang X., Dong Z., Chen F., Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy // Signal Transduct Target Ther. – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. 8.

7. Sun Y., Ma L. A milestone in epithelial–mesenchymal transition // Nature Cell Biology. Nature Publishing Group. – 2024. – Vol. 26. – № 1. – P. 29–30.

8. Thompson E.W., Redfern A.D., Brabletz S., Berx G., Agarwal V., Ganesh K., Huang R.Y., Ishay-Ronen D., Savagner P., Sheng G., Stemmler M.P., Brabletz T. EMT and cancer: what clinicians should know // Nat Rev Clin Oncol. – 2025. – Vol. 22. – № 10. – P. 711–733.

9. Lai Y., Lu X., Liao Y., Ouyang P., Wang H., Zhang X., Huang G., Qi S., Li Y. Crosstalk between glioblastoma and tumor microenvironment drives proneural–mesenchymal transition through ligand-receptor interactions // Genes & Diseases. – 2024. – Vol. 11. – № 2. – P. 874–889.

10. Thirant C., Peltier A., Durand S., Kramdi A., Louis-Brennetot C., Pierre-Eugène C., Gautier M., Costa A., Grelier A., Zaïdi S., Gruel N., Jimenez I., Lapouble E., Pierron G., Sitbon D., Brisse H.J., Gauthier A., Fréneaux P., et al. Reversible transitions between noradrenergic and mesenchymal tumor identities define cell plasticity in neuroblastoma // Nat Commun. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 2575.

11. Zhao N., Powell R.T., Yuan X., Bae G., Roarty K.P., Stossi F., Strempfl M., Toneff M.J., Johnson H.L., Mani S.A., Jones P., Stephan C.C., Rosen J.M. Morphological screening of mesenchymal

mammary tumor organoids to identify drugs that reverse epithelial-mesenchymal transition // Nat Commun. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 4262.

12. Xu M., Cui Q., Su W., Zhang D., Pan J., Liu X., Pang Z., Zhu Q. High-content screening of active components of Traditional Chinese Medicine inhibiting TGF-β-induced cell EMT // Heliyon. – 2022. – Vol. 8. – № 8. – P. e10238.

13. Ye Z., Sheu W.C., Qu H., Peng B., Liu J., Zhang L., Yuan F., Wei Y., Zhou J., Chen Q., Xiao X., Zhang S. Autocatalytic, Brain Tumor-Targeting Delivery of Bardoxolone Methyl Self-Assembled Nanoparticles for Glioblastoma Treatment // Small Sci. – 2024. – Vol. 4. – № 8. – P. 2400081.

14. Wang Y.-Y., Yang Y.-X., Zhao R., Pan S.-T., Zhe H., He Z.-X., Duan W., Zhang X., Yang T., Qiu J.-X., Zhou S.-F. Bardoxolone methyl induces apoptosis and autophagy and inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and stemness in esophageal squamous cancer cells // Drug Des Devel Ther. – 2015. – Vol. 9. – P. 993–1026.

15. Markov A.V., Sen'kova A.V., Zenkova M.A., Logashenko E.B. Novel Glycyrrhetinic Acid Derivative Soloxolone Methyl Inhibits the Inflammatory Response and Tumor Growth in vivo // Molecular Biology. – 2018. – Vol. 52. – № 2. – P. 262–268.

16. Logashenko E.B., Salomatina O.V., Markov A.V., Korchagina D.V., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Synthesis and Pro-Apoptotic Activity of Novel Glycyrrhetinic Acid Derivatives // Chembiochem. – 2011. – Vol. 12. – № 5. – P. 784–794.

17. Markov A.V., Ilyina A.A., Salomatina O.V., Sen'kova A.V., Okhina A.A., Rogachev A.D., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A. Novel Soloxolone Amides as Potent Anti-Glioblastoma Candidates: Design, Synthesis, In Silico Analysis and Biological Activities In Vitro and In Vivo // Pharmaceuticals (Basel). – 2022. – Vol. 15. – № 5. – P. 603.

18. Jeschke J., Collignon E., Al Wardi C., Krayem M., Bizet M., Jia Y., Garaud S., Wimana Z., Calonne E., Hassabi B., Morandini R., Deplus R., Putmans P., Dube G., Singh N.K., Koch A., Shostak K., Rizzotto L., et al. Downregulation of the FTO m6A RNA demethylase promotes EMT-mediated progression of epithelial tumors and sensitivity to Wnt inhibitors // Nat Cancer. Nature Publishing Group. – 2021. – Vol. 2. – № 6. – P. 611–628.

19. Seo J., Kim J. Integrin-targeting cyclic peptides suppress TGF-β1-driven EMT and invasion in third-generation EGFR-TKI-resistant NSCLC // Chem Biol Interact. – 2026. – Vol. 434. – P. 112117.

20. Dd L., Ch Z., Hw D., Q W., Ts R., J W., Cq C., Qc Z. A novel inhibitor of ADAM17 sensitizes colorectal cancer cells to 5-Fluorouracil by reversing Notch and epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo // Cell proliferation. Cell Prolif. – 2018. – Vol. 51. – № 5.

21. Akrida I., Papadaki H. Adipokines and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer // Mol Cell Biochem. – 2023. – Vol. 478. – № 11. – P. 2419–2433.

22. Philp L.K., Rockstroh A., Sadowski M.C., Taherian Fard A., Lehman M., Tevz G., Libério M.S., Bidgood C.L., Gunter J.H., McPherson S., Bartonicek N., Wade J.D., Otvos L., Nelson C.C. Leptin antagonism inhibits prostate cancer xenograft growth and progression // Endocr Relat Cancer. – 2021. – Vol. 28. – № 5. – P. 353–375.

23. Kim J.-W., Mahiddine F.Y., Kim G.A. Leptin Modulates the Metastasis of Canine Inflammatory Mammary Adenocarcinoma Cells Through Downregulation of Lysosomal Protective Protein Cathepsin A (CTSA) // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21. – № 23. – P. 8963.

24. Li M., Li D., Wang H.-Y., Zhang W., Zhuo Z., Guo H., Liu J., Zhuo Y., Tang J., He J., Miao L. Leptin decreases Th17/Treg ratio to facilitate neuroblastoma via inhibiting long-chain fatty acid catabolism in tumor cells // Oncoimmunology. – 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 2460281.

25. Hu X., Jiang C., Hu N., Hong S. ADAMTS1 induces epithelial-mesenchymal transition pathway in non-small cell lung cancer by regulating TGF-β // Aging. – 2023. – Vol. 15. – № 6. – P. 2097–2114.

26. Zhai W., Yang W., Ge J., Xiao X., Wu K., She K., Zhou Y., Kong Y., Wu L., Luo S., Pu X. ADAMTS4 exacerbates lung cancer progression via regulating c-Myc protein stability and activating MAPK signaling pathway // Biology Direct. – 2024. – Vol. 19. – № 1. – P. 94.

27. Xiao L., Li Q., Chen S., Huang Y., Ma L., Wang Y., Chen J., Zhang J., Liu A., Yuan X., Liu Y., Liu B. ADAMTS16 drives epithelial-mesenchymal transition and metastasis through a feedback loop upon TGF-β1 activation in lung adenocarcinoma // Cell Death & Disease. – 2024. – Vol. 15. – № 11. – P. 837.

28. Lachat C., Bruyère D., Etcheverry A., Aubry M., Mosser J., Warda W., Herfs M., Hendrick E., Ferrand C., Borg C., Delage-Mourroux R., Feugeas J.-P., Guittaut M., Hervouet E., Peixoto P. EZH2 and KDM6B Expressions Are Associated with Specific Epigenetic Signatures during EMT in Non Small Cell Lung Carcinomas // Cancers. – 2020. – Vol. 12. – № 12. – P. 3649.

29. Jan Y.-H., Lai T.-C., Yang C.-J., Lin Y.-F., Huang M.-S., Hsiao M. Adenylate kinase 4 modulates oxidative stress and stabilizes HIF-1α to drive lung adenocarcinoma metastasis // J Hematol Oncol. – 2019. – Vol. 12. – P. 12.

30. Reka A.K., Kuick R., Kurapati H., Standiford T.J., Omenn G.S., Keshamouni V.G. Identifying Inhibitors of Epithelial-Mesenchymal Transition by Connectivity-Map Based Systems Approach // J Thorac Oncol. – 2011. – Vol. 6. – № 11. – P. 1784–1792.

31. Yang J., Antin P., Berx G., Blanpain C., Brabletz T., Bronner M., Campbell K., Cano A., Casanova J., Christofori G., Dedhar S., Derynck R., Ford H.L., Fuxe J., García de Herreros A., Goodall G.J., Hadjantonakis A.-K., Huang R.Y.J., et al. Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition // Nat Rev Mol Cell Biol. Nature Publishing Group. – 2020. – Vol. 21. – № 6. – P. 341–352.

32. Greenburg G., Hay E.D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells // J Cell Biol. – 1982. – Vol. 95. – № 1. – P. 333–339.
33. Gredler M.L., Zallen J.A. Multicellular rosettes link mesenchymal-epithelial transition to radial intercalation in the mouse axial mesoderm // Dev Cell. – 2023. – Vol. 58. – № 11. – P. 933-950.e5.
34. GRHL2 regulates keratinocyte EMT-MET dynamics and scar formation during cutaneous wound healing | Cell Death & Disease.
35. Horny K., Sproll C., Peiffer L., Furtmann F., Gerhardt P., Gravemeyer J., Stoecklein N.H., Spassova I., Becker J.C. Mesenchymal–epithelial transition in lymph node metastases of oral squamous cell carcinoma is accompanied by ZEB1 expression // Journal of Translational Medicine. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 267.
36. Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis // Cell. – 2004. – Vol. 117. – № 7. – P. 927–939.
37. Addison J.B., Voronkova M.A., Fugett J.H., Lin C.-C., Linville N.C., Trinh B., Livengood R.H., Smolkin M.B., Schaller M.D., Ruppert J.M., Pugacheva E.N., Creighton C.J., Ivanov A.V. Functional Hierarchy and Cooperation of EMT Master Transcription Factors in Breast Cancer Metastasis // Mol Cancer Res. – 2021. – Vol. 19. – № 5. – P. 784–798.
38. Batlle E., Sancho E., Francí C., Domínguez D., Monfar M., Baulida J., García de Herreros A. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells // Nat Cell Biol. Nature Publishing Group. – 2000. – Vol. 2. – № 2. – P. 84–89.
39. Comijn J., Berx G., Vermassen P., Verschueren K., van Grunsven L., Bruyneel E., Mareel M., Huylebroeck D., van Roy F. The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion // Molecular Cell. – 2001. – Vol. 7. – № 6. – P. 1267–1278.
40. Eger A., Aigner K., Sonderegger S., Dampier B., Oehler S., Schreiber M., Berx G., Cano A., Beug H., Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells // Oncogene. – 2005. – Vol. 24. – № 14. – P. 2375–2385.
41. Bolós V., Peinado H., Pérez-Moreno M.A., Fraga M.F., Esteller M., Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors // J Cell Sci. – 2003. – Vol. 116. – № Pt 3. – P. 499–511.
42. Tong X., Wang S., Lei Z., Li C., Zhang C., Su Z., Liu X., Zhao J., Zhang H.-T. MYOCD and SMAD3/SMAD4 form a positive feedback loop and drive TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer // Oncogene. – 2020. – Vol. 39. – № 14. – P. 2890–2904.
43. Chen Z.-X., Mu M.-Y., Yang G., Qi H., Fu X.-B., Wang G.-S., Jiang W.-W., Huang B.-J., Gao F. Hypoxia-induced DTL promotes the proliferation, metastasis, and sorafenib resistance of

hepatocellular carcinoma through ubiquitin-mediated degradation of SLTM and subsequent Notch pathway activation // Cell Death Dis. – 2024. – Vol. 15. – № 10. – P. 734.

44. Qi L., Chen J., Zhou B., Xu K., Wang K., Fang Z., Shao Y., Yuan Y., Zheng S., Hu W. HomeoboxC6 promotes metastasis by orchestrating the DKK1/Wnt/β-catenin axis in right-sided colon cancer // Cell Death Dis. – 2021. – Vol. 12. – № 4. – P. 337.

45. Morelli A.P., Tortelli T.C., Mancini M.C.S., Pavan I.C.B., Silva L.G.S., Severino M.B., Granato D.C., Pestana N.F., Ponte L.G.S., Peruca G.F., Pauletti B.A., dos Santos D.F.G., de Moura L.P., Bezerra R.M.N., Leme A.F.P., Chammas R., Simabuco F.M. STAT3 contributes to cisplatin resistance, modulating EMT markers, and the mTOR signaling in lung adenocarcinoma // Neoplasia. – 2021. – Vol. 23. – № 10. – P. 1048–1058.

46. Lee K.K., Rajagopalan D., Bhatia S.S., Tirado-Magallanes R., Chng W.J., Jha S. The oncogenic E3 ligase TRIP12 suppresses epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal traits through ZEB1/2 // Cell Death Discov. – 2021. – Vol. 7. – № 1. – P. 95.

47. Kim W.K., Kwon Y., Jang M., Park M., Kim J., Cho S., Jang D.G., Lee W.-B., Jung S.H., Choi H.J., Min B.S., Il Kim T., Hong S.P., Paik Y.-K., Kim H. β-catenin activation down-regulates cell-cell junction-related genes and induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancers // Sci Rep. Nature Publishing Group. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 18440.

48. Lin X., Shang X., Manorek G., Howell S.B. Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4 // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – № 6. – P. e67496.

49. Tang Q., Chen J., Di Z., Yuan W., Zhou Z., Liu Z., Han S., Liu Y., Ying G., Shu X., Di M. TM4SF1 promotes EMT and cancer stemness via the Wnt/β-catenin/SOX2 pathway in colorectal cancer // J Exp Clin Cancer Res. – 2020. – Vol. 39. – № 1. – P. 232.

50. Yu X., He T., Tong Z., Liao L., Huang S., Fakhouri W.D., Edwards D.P., Xu J. Molecular mechanisms of TWIST1-regulated transcription in EMT and cancer metastasis // EMBO Rep. – 2023. – Vol. 24. – № 11. – P. e56902.

51. Zhou F., Sun J., Ye L., Jiang T., Li W., Su C., Ren S., Wu F., Zhou C., Gao G. Fibronectin promotes tumor angiogenesis and progression of non-small-cell lung cancer by elevating WISP3 expression via FAK/MAPK/ HIF-1α axis and activating wnt signaling pathway // Exp Hematol Oncol. – 2023. – Vol. 12. – № 1. – P. 61.

52. Lehmann W., Mossmann D., Kleemann J., Mock K., Meisinger C., Brummer T., Herr R., Brabletz S., Stemmler M.P., Brabletz T. ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types // Nat Commun. – 2016. – Vol. 7. – P. 10498.

53. Liu M., Zhang Y., Yang J., Zhan H., Zhou Z., Jiang Y., Shi X., Fan X., Zhang J., Luo W., Fung K.-M.A., Xu C., Bronze M.S., Houchen C.W., Li M. Zinc Dependent Regulation of ZEB1 and YAP1

Co-activation Promotes EMT Plasticity and Metastasis in Pancreatic Cancer // Gastroenterology. – 2021. – Vol. 160. – № 5. – P. 1771-1783.e1.

54. Li Z., Wang P., Cui W., Yong H., Wang D., Zhao T., Wang W., Shi M., Zheng J., Bai J. Tumour-associated macrophages enhance breast cancer malignancy via inducing ZEB1-mediated DNMT1 transcriptional activation // Cell Biosci. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 176.

55. Sheng W., Tang J., Cao R., Shi X., Ma Y., Dong M. Numb-PRRL promotes TGF-β1- and EGF-induced epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer // Cell Death Dis. – 2022. – Vol. 13. – № 2. – P. 173.

56. Chhabra G., Singh C.K., Ndiaye M.A., Su S., Shirley C.A., Ahmad N. Role of PLK1/NUMB/NOTCH in epithelial-mesenchymal transition in human melanoma // NPJ Precis Oncol. – 2024. – Vol. 8. – № 1. – P. 6.

57. Debaugnies M., Rodríguez-Acebes S., Blondeau J., Parent M.-A., Zocco M., Song Y., de Maertelaer V., Moers V., Latil M., Dubois C., Coulonval K., Impens F., Van Haver D., Dufour S., Uemura A., Sotiropoulou P.A., Méndez J., Blanpain C. RHOJ controls EMT-associated resistance to chemotherapy // Nature. – 2023. – Vol. 616. – № 7955. – P. 168–175.

58. Zhang K., Zhao H., Ji Z., Zhang C., Zhou P., Wang L., Chen Q., Wang J., Zhang P., Chen Z., Zhu H.H., Gao W.-Q. Shp2 promotes metastasis of prostate cancer by attenuating the PAR3/PAR6/aPKC polarity protein complex and enhancing epithelial-to-mesenchymal transition // Oncogene. – 2016. – Vol. 35. – № 10. – P. 1271–1282.

59. Karp C.M., Tan T.T., Mathew R., Nelson D., Mukherjee C., Degenhardt K., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of the Polarity Determinant Crumbs in Suppressing Mammalian Epithelial Tumor Progression // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68. – № 11. – P. 4105–4115.

60. Jung H.-Y., Fattet L., Tsai J.H., Kajimoto T., Chang Q., Newton A.C., Yang J. Apical–basal polarity inhibits epithelial–mesenchymal transition and tumour metastasis by PAR-complex-mediated SNAI1 degradation // Nature Cell Biology. – 2019. – Vol. 21. – № 3. – P. 359–371.

61. Viji Babu P.K., Mirastschijski U., Belge G., Radmacher M. Homophilic and heterophilic cadherin bond rupture forces in homo- or hetero-cellular systems measured by AFM-based single-cell force spectroscopy // Eur Biophys J. – 2021. – Vol. 50. – № 3–4. – P. 543–559.

62. Vu V., Sullivan B., Hebner E., Rahil Z., Zou Y., Leckband D. Cadherins and growth factor receptors – ligand-selective mechano-switches at cadherin junctions // J Cell Sci. – 2025. – Vol. 138. – № 3. – P. JCS262279.

63. Nurmagambetova A., Mustyatsa V., Saidova A., Vorobjev I. Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT // Sci Rep. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 22164.

64. Chen L., Long X., Duan S., Liu X., Chen J., Lan J., Liu X., Huang W., Geng J., Zhou J. CSRP2 suppresses colorectal cancer progression via p130Cas/Rac1 axis-meditated ERK, PAK, and HIPPO signaling pathways // Theranostics. – 2020. – Vol. 10. – № 24. – P. 11063–11079.
65. Hao W., Dong X., Wang Z., Wen T., Liu L., Gu T., Ma H. CRABP2 promotes peritoneal metastasis in CRC through TGF-β/Smad-mediated EMT signaling and invadopodia formation // Cell Signal. – 2025. – Vol. 134. – P. 111927.
66. Mr C., J K., Vm L., J I. The role and regulation of integrins in cell migration and invasion // Nature reviews. Molecular cell biology. Nat Rev Mol Cell Biol. – 2025. – Vol. 26. – № 2.
67. Liu C.-Y., Lin H.-H., Tang M.-J., Wang Y.-K. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6. – № 18. – P. 15966–15983.
68. Celentano A., Yap T., Paolini R., Yiannis C., Mirams M., Koo K., McCullough M., Cirillo N. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 modulates malignant behaviour of oral squamous cell carcinoma cells // J Oral Pathol Med. – 2021. – Vol. 50. – № 3. – P. 323–332.
69. Mehner C., Hockla A., Miller E., Ran S., Radisky D.C., Radisky E.S. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5. – № 9. – P. 2736–2749.
70. Moirangthem A., Bondhopadhyay B., Mukherjee M., Bandyopadhyay A., Mukherjee N., Konar K., Bhattacharya S., Basu A. Simultaneous knockdown of uPA and MMP9 can reduce breast cancer progression by increasing cell-cell adhesion and modulating EMT genes // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 21903.
71. Dong H., Diao H., Zhao Y., Xu H., Pei S., Gao J., Wang J., Hussain T., Zhao D., Zhou X., Lin D. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cell lines remarkably increases the cell malignancy largely via activation of transforming growth factor beta/SMAD signalling // Cell Prolif. – 2019. – Vol. 52. – № 5. – P. e12633.
72. Bai X., Li Y.-Y., Zhang H.-Y., Wang F., He H.-L., Yao J.-C., Liu L., Li S.-S. Role of matrix metalloproteinase-9 in transforming growth factor-β1-induced epithelial-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma // Onco Targets Ther. – 2017. – Vol. 10. – P. 2837–2847.
73. Lin C.-Y., Tsai P.-H., Kandaswami C.C., Lee P.-P., Huang C.-J., Hwang J.-J., Lee M.-T. Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition // Cancer Sci. – 2011. – Vol. 102. – № 4. – P. 815–827.
74. Deng Z., Fan T., Xiao C., Tian H., Zheng Y., Li C., He J. TGF-β signaling in health, disease, and therapeutics // Signal Transduct Target Ther. – 2024. – Vol. 9. – № 1. – P. 61.

75. Wang M., Zhao D., Spinetti G., Zhang J., Jiang L.-Q., Pintus G., Monticone R., Lakatta E.G. Matrix Metalloproteinase 2 Activation of Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) and TGF-β1–Type II Receptor Signaling Within the Aged Arterial Wall // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. American Heart Association. – 2006. – Vol. 26. – № 7. – P. 1503–1509.

76. Ge G., Greenspan D.S. BMP1 controls TGFβ1 activation via cleavage of latent TGFβ-binding protein // J Cell Biol. – 2006. – Vol. 175. – № 1. – P. 111–120.

77. Yuan H., Liu F., Ma T., Zeng Z., Zhang N. miR-338-3p inhibits cell growth, invasion, and EMT process in neuroblastoma through targeting MMP-2 // Open Life Sci. – 2021. – Vol. 16. – № 1. – P. 198–209.

78. Wang H., Li J., He J., Liu Y., Feng W., Zhou H., Zhou M., Wei H., Lu Y., Peng W., Du F., Gong A., Xu M. Methyl-CpG-binding protein 2 drives the Furin/TGF-β1/Smad axis to promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells // Oncogenesis. – 2020. – Vol. 9. – № 8. – P. 76.

79. Wang S., Tong X., Li C., Jin E., Su Z., Sun Z., Zhang W., Lei Z., Zhang H. Quaking 5 suppresses TGF-β-induced EMT and cell invasion in lung adenocarcinoma // EMBO reports. John Wiley & Sons, Ltd. – 2021. – Vol. 22. – № 6. – P. e52079.

80. Wang Z., Chen J., Wang S., Sun Z., Lei Z., Zhang H.-T., Huang J. RGS6 suppresses TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancers via a novel mechanism dependent on its interaction with SMAD4 // Cell Death Dis. – 2022. – Vol. 13. – № 7. – P. 656.

81. Li L., Liu J., Xue H., Li C., Liu Q., Zhou Y., Wang T., Wang H., Qian H., Wen T. A TGF-β-MTA1-SOX4-EZH2 signaling axis drives epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis // Oncogene. – 2020. – Vol. 39. – № 10. – P. 2125–2139.

82. Chatterjee B., Majumder P., Chen C.-C., Wang J.-P., Su P.-H., Lai H.-C., Liu C.-C., Lin H.-N., Yu C.-H.A., Yuan H.S., Shen C.-K.J. Hypoxia-induced genome-wide DNA demethylation by DNMT3A and EMT of cancer cells // Cell Mol Biol Lett. – 2025. – Vol. 30. – № 1. – P. 95.

83. Xia X., Wang S., Ni B., Xing S., Cao H., Zhang Z., Yu F., Zhao E., Zhao G. Hypoxic gastric cancer-derived exosomes promote progression and metastasis via MiR-301a-3p/PHD3/HIF-1α positive feedback loop // Oncogene. – 2020. – Vol. 39. – № 39. – P. 6231–6244.

84. Gao A., Zhang M., Zhu S. qi, Zou S., Chen H., Li X., He C., Zhou L., Mei Y., Ding W., Zhou J., Zhou Y., Cao Y. DNA polymerase iota promotes EMT and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by interacting with USP7 to stabilize HIF-1α // Cell Death Dis. – 2024. – Vol. 15. – № 2. – P. 171.

85. Yang L., Li J., Zang G., Song S., Sun Z., Li X., Li Y., Xie Z., Zhang G., Gui N., Zhu S., Chen T., Cai Y., Zhao Y. Pin1/YAP pathway mediates matrix stiffness-induced epithelial–mesenchymal

transition driving cervical cancer metastasis via a non-Hippo mechanism // Bioengineering & Translational Medicine. John Wiley & Sons, Ltd. – 2023. – Vol. 8. – № 1. – P. e10375.

86. Chen Z., Wu J., Wang L., Zhao H., He J. Tumor-associated macrophages of the M1/M2 phenotype are involved in the regulation of malignant biological behavior of breast cancer cells through the EMT pathway // Med Oncol. Northwood, London, England. – 2022. – Vol. 39. – № 5. – P. 83.

87. Hu Z., Sui Q., Jin X., Shan G., Huang Y., Yi Y., Zeng D., Zhao M., Zhan C., Wang Q., Lin Z., Lu T., Chen Z. IL6-STAT3-C/EBPβ-IL6 positive feedback loop in tumor-associated macrophages promotes the EMT and metastasis of lung adenocarcinoma // J Exp Clin Cancer Res. – 2024. – Vol. 43. – № 1. – P. 63.

88. Zhong Q., Fang Y., Lai Q., Wang S., He C., Li A., Liu S., Yan Q. CPEB3 inhibits epithelial-mesenchymal transition by disrupting the crosstalk between colorectal cancer cells and tumor-associated macrophages via IL-6R/STAT3 signaling // J Exp Clin Cancer Res. – 2020. – Vol. 39. – № 1. – P. 132.

89. Seoane J., Gomis R.R. TGF-β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2017. – Vol. 9. – № 12. – P. a022277.

90. Li S., Zhang J., Qian S., Wu X., Sun L., Ling T., Jin Y., Li W., Sun L., Lai M., Xu F. S100A8 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis under TGF-β/USF2 axis in colorectal cancer // Cancer Commun (Lond). – 2021. – Vol. 41. – № 2. – P. 154–170.

91. Wanna-Udom S., Terashima M., Suphakhong K., Ishimura A., Takino T., Suzuki T. KDM2B is involved in the epigenetic regulation of TGF-β-induced epithelial–mesenchymal transition in lung and pancreatic cancer cell lines // J Biol Chem. – 2020. – Vol. 296. – P. 100213.

92. Sun L., Xing J., Zhou X., Song X., Gao S. Wnt/β-catenin signalling, epithelial-mesenchymal transition and crosslink signalling in colorectal cancer cells // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2024. – Vol. 175. – P. 116685.

93. Li Y., Liu C., Zhang X., Huang X., Liang S., Xing F., Tian H. CCT5 induces epithelial-mesenchymal transition to promote gastric cancer lymph node metastasis by activating the Wnt/β-catenin signalling pathway // Br J Cancer. – 2022. – Vol. 126. – № 12. – P. 1684–1694.

94. Yao H., Ren D., Wang Y., Wu L., Wu Y., Wang W., Li Q., Liu L. KCTD9 inhibits the Wnt/β-catenin pathway by decreasing the level of β-catenin in colorectal cancer // Cell Death Dis. Nature Publishing Group. – 2022. – Vol. 13. – № 9. – P. 761.

95. Sánchez-Tilló E., de Barrios O., Siles L., Cuatrecasas M., Castells A., Postigo A. β-catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. – Vol. 108. – № 48. – P. 19204–19209.

96. Gnemmi V., Bouillez A., Gaudelot K., Hémon B., Ringot B., Pottier N., Glowacki F., Villers A., Vindrieux D., Cauffiez C., Van Seuningen I., Bernard D., Leroy X., Aubert S., Perrais M. MUC1 drives

epithelial-mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/β-catenin pathway and interaction with SNAIL promoter // Cancer Lett. – 2014. – Vol. 346. – № 2. – P. 225–236.

97. Moon J.H., Lee S.H., Lim Y.C. Wnt/β-catenin/Slug pathway contributes to tumor invasion and lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma // Clin Exp Metastasis. – 2021. – Vol. 38. – № 2. – P. 163–174.

98. Yi H., Li G., Long Y., Liang W., Cui H., Zhang B., Tan Y., Li Y., Shen L., Deng D., Tang Y., Mao C., Tian S., Cai Y., Zhu Q., Hu Y., Chen W., Fang L. Integrative multi-omics analysis of a colon cancer cell line with heterogeneous Wnt activity revealed RUNX2 as an epigenetic regulator of EMT // Oncogene. – 2020. – Vol. 39. – № 28. – P. 5152–5164.

99. Bhattacharya R., Brown J.S., Gatenby R.A., Ibrahim-Hashim A. A gene for all seasons: The evolutionary consequences of HIF-1 in carcinogenesis, tumor growth and metastasis // Semin Cancer Biol. – 2024. – Vol. 102–103. – P. 17–24.

100. Li H., Xu Y., Zheng Y., Xue Z., Li Q., Jia X., Weng L., Jiang L., Ruan X., Zhang R., Yin Y., Zhou L., Li F., Huang H., Li J., Tan M., Fan J., Cai J., et al. CBX4 acetoacetylation as an inhibitory mechanism of HIF-1α activity // Cell Chem Biol. – 2025. – Vol. 32. – № 10. – P. 1249-1259.e9.

101. Wei Z., Li J., Zhong L., Yang D., Li W., Chen W., Zhou H., He Y., Song W., Wang B., Zeng L. DDR1 Drives Malignant Progression of Gastric Cancer by Suppressing HIF-1α Ubiquitination and Degradation // Adv Sci (Weinh). – 2024. – Vol. 11. – № 35. – P. e2308395.

102. Tang K., Toyozumi T., Murakami K., Sakata H., Kano M., Endo S., Matsumoto Y., Suito H., Takahashi M., Sekino N., Otsuka R., Kinoshita K., Hirasawa S., Hu J., Uesato M., Hayano K., Matsubara H. HIF-1α stimulates the progression of oesophageal squamous cell carcinoma by activating the Wnt/β-catenin signalling pathway // Br J Cancer. – 2022. – Vol. 127. – № 3. – P. 474–487.

103. Harvey K.F., Tang T.T. Targeting the Hippo pathway in cancer // Nat Rev Drug Discov. – 2025. – Vol. 24. – № 11. – P. 852–869.

104. Yu M., Chen Y., Li X., Yang R., Zhang L., Huangfu L., Zheng N., Zhao X., Lv L., Hong Y., Liang H., Shan H. YAP1 contributes to NSCLC invasion and migration by promoting Slug transcription via the transcription co-factor TEAD // Cell Death Dis. – 2018. – Vol. 9. – № 5. – P. 464.

105. Fu M., Hu Y., Lan T., Guan K.-L., Luo T., Luo M. The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases // Signal Transduct Target Ther. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 376.

106. Zhang M., Zhang B. Extracellular matrix stiffness: mechanisms in tumor progression and therapeutic potential in cancer // Exp Hematol Oncol. – 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 54.

107. Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., Cordenonsi M., Zanconato F., Le Digabel J., Forcato M., Bicciato S., Elvassore N., Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction // Nature. – 2011. – Vol. 474. – № 7350. – P. 179–183.

108. Pu J., Huang Y., Fang Q., Wang J., Li W., Xu Z., Wu X., Lu Y., Wei H. Hypoxia-induced Fascin-1 upregulation is regulated by Akt/Rac1 axis and enhances malignant properties of liver cancer cells via mediating actin cytoskeleton rearrangement and Hippo/YAP activation // Cell Death Discov. – 2021. – Vol. 7. – № 1. – P. 385.

109. Zhou B., Lin W., Long Y., Yang Y., Zhang H., Wu K., Chu Q. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics // Signal Transduct Target Ther. – 2022. – Vol. 7. – № 1. – P. 95.

110. Li L.-J., Chang P.M.-H., Li C.-H., Chang Y.-C., Lai T.-C., Su C.-Y., Chen C.-L., Chang W.-M., Hsiao M., Feng S.-W. FAS receptor regulates NOTCH activity through ERK-JAG1 axis activation and controls oral cancer stemness ability and pulmonary metastasis // Cell Death Discov. – 2022. – Vol. 8. – № 1. – P. 101.

111. Liu L., Tao T., Liu S., Yang X., Chen X., Liang J., Hong R., Wang W., Yang Y., Li X., Zhang Y., Li Q., Liang S., Yu H., Wu Y., Guo X., Lai Y., Ding X., et al. An RFC4/Notch1 signaling feedback loop promotes NSCLC metastasis and stemness // Nat Commun. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 2693.

112. Karthikeyan S., Casey P.J., Wang M. RAB4A is a master regulator of cancer cell stemness upstream of NUMB-NOTCH signaling // Cell Death Dis. – 2024. – Vol. 15. – № 10. – P. 778.

113. Huang C.-C., Cheng S.-H., Wu C.-H., Li W.-Y., Wang J.-S., Kung M.-L., Chu T.-H., Huang S.-T., Feng C.-T., Huang S.-C., Tai M.-H. Delta-like 1 homologue promotes tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition of ovarian high-grade serous carcinoma through activation of Notch signaling // Oncogene. – 2019. – Vol. 38. – № 17. – P. 3201–3215.

114. Zhang X., Liu X., Luo J., Xiao W., Ye X., Chen M., Li Y., Zhang G.-J. Notch3 inhibits epithelial-mesenchymal transition by activating Kibra-mediated Hippo/YAP signaling in breast cancer epithelial cells // Oncogenesis. – 2016. – Vol. 5. – № 11. – P. e269.

115. Liu L., Chen X., Wang Y., Qu Z., Lu Q., Zhao J., Yan X., Zhang H., Zhou Y. Notch3 is important for TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer bone metastasis by regulating ZEB-1 // Cancer Gene Ther. – 2014. – Vol. 21. – № 9. – P. 364–372.

116. Chang Z., Gao Y., Chen P., Gao W., Zhao W., Wu D., Liang W., Chen Z., Chen L., Xi H. THBS2 promotes gastric cancer progression and stemness via the Notch signaling pathway // Am J Cancer Res. – 2024. – Vol. 14. – № 7. – P. 3433–3450.

117. Natsuizaka M., Whelan K.A., Kagawa S., Tanaka K., Giroux V., Chandramouleeswaran P.M., Long A., Sahu V., Darling D.S., Que J., Yang Y., Katz J.P., Wileyto E.P., Basu D., Kita Y., Natsugoe

S., Naganuma S., Klein-Szanto A.J., et al. Interplay between Notch1 and Notch3 promotes EMT and tumor initiation in squamous cell carcinoma // Nat Commun. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 1758.

118. Chen S., Cai K., Zheng D., Liu Y., Li L., He Z., Sun C., Yu C. RHBDL2 promotes the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer by stabilizing the N1ICD via the OTUD7B and activating the Notch signaling pathway // Cell Death Dis. – 2022. – Vol. 13. – № 11. – P. 945.

119. Ning J., Ye Y., Bu D., Zhao G., Song T., Liu P., Yu W., Wang H., Li H., Ren X., Ying G., Zhao Y., Yu J. Imbalance of TGF-β1/BMP-7 pathways induced by M2-polarized macrophages promotes hepatocellular carcinoma aggressiveness // Mol Ther. – 2021. – Vol. 29. – № 6. – P. 2067–2087.

120. Sumitomo R., Menju T., Shimazu Y., Toyazaki T., Chiba N., Miyamoto H., Hirayama Y., Nishikawa S., Tanaka S., Yutaka Y., Yamada Y., Nakajima D., Ohsumi A., Hamaji M., Sato A., Yoshizawa A., Huang C.-L., Haga H., et al. M2-like tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition through the transforming growth factor β/Smad/zinc finger e-box binding homeobox pathway with increased metastatic potential and tumor cell proliferation in lung squamous cell carcinoma // Cancer Sci. – 2023. – Vol. 114. – № 12. – P. 4521–4534.

121. Chen Y., Guo Y., Li S., Xu J., Zhao C., Wang J., Yang J., Ning W., Qu Y., Zhang M., Wang S., Zhang H. Tumor-derived IL-6 promotes chordoma invasion by stimulating tumor-associated macrophages M2 polarization and TNFα secretion // Int Immunopharmacol. – 2024. – Vol. 143. – № Pt 1. – P. 113315.

122. Khan F., Liu Y., Whitfield D., Pang L., Ali H., Huang Y., Zhou F., Hagan R.S., Frenis K., Rowe R.G., Chen P. Macrophage TBK1 signaling drives the development and outgrowth of breast cancer brain metastasis // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2025. – Vol. 122. – № 34. – P. e2420793122.

123. Chen X., Yang M., Yin J., Li P., Zeng S., Zheng G., He Z., Liu H., Wang Q., Zhang F., Chen D. Tumor-associated macrophages promote epithelial–mesenchymal transition and the cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer through CCL2/AKT/β-catenin signaling // Cell Communication and Signaling. – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 92.

124. Chen J., Zhao D., Zhang L., Zhang J., Xiao Y., Wu Q., Wang Y., Zhan Q. Tumor-associated macrophage (TAM)-derived CCL22 induces FAK addiction in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) // Cell Mol Immunol. – 2022. – Vol. 19. – № 9. – P. 1054–1066.

125. Odarenko K.V., Zenkova M.A., Markov A.V. The Nexus of Inflammation-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Lung Cancer Progression: A Roadmap to Pentacyclic Triterpenoid-Based Therapies // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 24. – P. 17325.

126. Karacosta L.G., Anchang B., Ignatiadis N., Kimmey S.C., Benson J.A., Shrager J.B., Tibshirani R., Bendall S.C., Plevritis S.K. Mapping lung cancer epithelial-mesenchymal transition states and trajectories with single-cell resolution // Nat Commun. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 5587.

127. Cheng Y.-C., Zhang Y., Tripathi S., Harshavardhan B.V., Jolly M.K., Schiebinger G., Levine H., McDonald T.O., Michor F. Reconstruction of single-cell lineage trajectories and identification of diversity in fates during the epithelial-to-mesenchymal transition // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2024. – Vol. 121. – № 32. – P. e2406842121.

128. Lüönd F., Sugiyama N., Bill R., Bornes L., Hager C., Tang F., Santacroce N., Beisel C., Ivanek R., Bürglin T., Tiede S., van Rheenen J., Christofori G. Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy // Developmental Cell. – 2021. – Vol. 56. – № 23. – P. 3203-3221.e11.

129. Bocci F., Tripathi S.C., Vilchez Mercedes S.A., George J.T., Casabar J.P., Wong P.K., Hanash S.M., Levine H., Onuchic J.N., Jolly M.K. NRF2 activates a partial epithelial-mesenchymal transition and is maximally present in a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype // Integr Biol (Camb). – 2019. – Vol. 11. – № 6. – P. 251–263.

130. Malagoli Tagliazucchi G., Wiecek A.J., Withnell E., Secrier M. Genomic and microenvironmental heterogeneity shaping epithelial-to-mesenchymal trajectories in cancer // Nat Commun. – 2023. – Vol. 14. – № 1. – P. 789.

131. Perelli L., Zhang L., Mangiameli S., Giannese F., Mahadevan K.K., Peng F., Citron F., Khan H., Le C., Gurreri E., Carbone F., Russell A.J.C., Soeung M., Lam T.N.A., Lundgren S., Marisetty S., Zhu C., Catania D., et al. Evolutionary fingerprints of epithelial-to-mesenchymal transition // Nature. – 2025. – Vol. 640. – № 8060. – P. 1083–1092.

132. Miao K., Lei J.H., Valecha M.V., Zhang A., Xu J., Wang L., Lyu X., Chen S., Miao Z., Zhang X., Su S.M., Shao F., Rajendran B.K., Bao J., Zeng J., Sun H., Chen P., Tan K., et al. NOTCH1 activation compensates BRCA1 deficiency and promotes triple-negative breast cancer formation // Nat Commun. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 3256.

133. Chanrion M., Kuperstein I., Barrière C., El Marjou F., Cohen D., Vignjevic D., Stimmer L., Paul-Gilloteaux P., Bièche I., Tavares S.D.R., Boccia G.-F., Cacheux W., Meseure D., Fre S., Martignetti L., Legoix-Né P., Girard E., Fetler L., et al. Concomitant Notch activation and p53 deletion trigger epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in mouse gut // Nat Commun. – 2014. – Vol. 5. – P. 5005.

134. Fischer K.R., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong S., Choi H., El Rayes T., Ryu S., Troeger J., Schwabe R.F., Vahdat L.T., Altorki N.K., Mittal V., Gao D. EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance // Nature. – 2015. – Vol. 527. – № 7579. – P. 472–476.

135. Lourenco A.R., Ban Y., Crowley M.J., Lee S.B., Ramchandani D., Du W., Elemento O., George J.T., Jolly M.K., Levine H., Sheng J., Wong S.T., Altorki N.K., Gao D. Differential Contributions of Pre- and Post-EMT Tumor Cells in Breast Cancer Metastasis // Cancer Res. – 2020. – Vol. 80. – № 2. – P. 163–169.

136. Bornes L., Scheppingen R.H. van, Beerling E., Schelfhorst T., Ellenbroek S.I.J., Seinstra D., Rheenen J. van. Fsp1-Mediated Lineage Tracing Fails to Detect the Majority of Disseminating Cells Undergoing EMT // Cell Reports. – 2019. – Vol. 29. – № 9. – P. 2565.

137. Li Y., Lv Z., Zhang S., Wang Z., He L., Tang M., Pu W., Zhao H., Zhang Z., Shi Q., Cai D., Wu M., Hu G., Lui K.O., Feng J., Nieto M.A., Zhou B. Genetic Fate Mapping of Transient Cell Fate Reveals N-Cadherin Activity and Function in Tumor Metastasis // Dev Cell. – 2020. – Vol. 54. – № 5. – P. 593-607.e5.

138. Simeonov K.P., Byrns C.N., Clark M.L., Norgard R.J., Martin B., Stanger B.Z., Shendure J., McKenna A., Lengner C.J. Single-cell lineage tracing of metastatic cancer reveals selection of hybrid EMT states // Cancer Cell. – 2021. – Vol. 39. – № 8. – P. 1150-1162.e9.

139. Esposito M., Mondal N., Greco T.M., Wei Y., Spadazzi C., Lin S.-C., Zheng H., Cheung C., Magnani J.L., Lin S.-H., Cristea I.M., Sackstein R., Kang Y. Bone Vascular Niche E-selectin Induces Mesenchymal-Epithelial Transition and Wnt Activation in Cancer Cells to Promote Bone Metastasis // Nat Cell Biol. – 2019. – Vol. 21. – № 5. – P. 627–639.

140. Gallardo A., Molina A., Asenjo H.G., Lopez-Onieva L., Martorell-Marugán J., Espinosa-Martinez M., Griñan-Lison C., Alvarez-Perez J.C., Cara F.E., Navarro-Marchal S.A., Carmona-Sáez P., Medina P.P., Marchal J.A., Granados-Principal S., Sánchez-Pozo A., Landeira D. EZH2 endorses cell plasticity to non-small cell lung cancer cells facilitating mesenchymal to epithelial transition and tumour colonization // Oncogene. – 2022. – Vol. 41. – № 28. – P. 3611–3624.

141. De Las Rivas J., Brozovic A., Izraely S., Casas-Pais A., Witz I.P., Figueroa A. Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies // Arch Toxicol. – 2021. – Vol. 95. – № 7. – P. 2279–2297.

142. Li Y., Wang Z., Ajani J.A., Song S. Drug resistance and Cancer stem cells // Cell Commun Signal. – 2021. – Vol. 19. – № 1. – P. 19.

143. Del Vecchio V., La Noce M., Tirino V. ALDH Activity Assay: A Method for Cancer Stem Cell (CSC) Identification and Isolation // Methods Mol Biol. Clifton, N.J. – 2024. – Vol. 2777. – P. 83–89.

144. Khales S.A., Mozaffari-Jovin S., Geerts D., Abbaszadegan M.R. TWIST1 activates cancer stem cell marker genes to promote epithelial-mesenchymal transition and tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma // BMC Cancer. – 2022. – Vol. 22. – № 1. – P. 1272.

145. Nakano M., Kikushige Y., Miyawaki K., Kunisaki Y., Mizuno S., Takenaka K., Tamura S., Okumura Y., Ito M., Ariyama H., Kusaba H., Nakamura M., Maeda T., Baba E., Akashi K. Dedifferentiation process driven by TGF-beta signaling enhances stem cell properties in human colorectal cancer // Oncogene. – 2019. – Vol. 38. – № 6. – P. 780–793.

146. Liu K., Tian F., Chen X., Liu B., Tian S., Hou Y., Wang L., Han M., Peng S., Tan Y., Pan Y., Chu Z., Li J., Che L., Chen D., Wen L., Qin Z., Li X., et al. Stabilization of TGF-β Receptor 1 by a Receptor-Associated Adaptor Dictates Feedback Activation of the TGF-β Signaling Pathway to Maintain Liver Cancer Stemness and Drug Resistance // Adv Sci (Weinh). Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany. – 2024. – Vol. 11. – № 34. – P. e2402327.

147. Li Z., Yang Z., Liu W., Zhu W., Yin L., Han Z., Xian Y., Wen J., Tang H., Lin X., Yang Y., Wang J., Zhang K. Disheveled3 enhanced EMT and cancer stem-like cells properties via Wnt/β-catenin/c-Myc/SOX2 pathway in colorectal cancer // J Transl Med. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 302.

148. Zhang Z., Xu Y. FZD7 accelerates hepatic metastases in pancreatic cancer by strengthening EMT and stemness associated with TGF-β/SMAD3 signaling // Mol Med. Cambridge, Mass. – 2022. – Vol. 28. – № 1. – P. 82.

149. Wang Y., Liao R., Chen X., Ying X., Chen G., Li M., Dong C. Twist-mediated PAR1 induction is required for breast cancer progression and metastasis by inhibiting Hippo pathway // Cell Death Dis. – 2020. – Vol. 11. – № 7. – P. 520.

150. Kumar S., Srivastav R.K., Wilkes D.W., Ross T., Kim S., Kowalski J., Chatla S., Zhang Q., Nayak A., Guha M., Fuchs S.Y., Thomas C., Chakrabarti R. Estrogen-dependent DLL1-mediated Notch signaling promotes luminal breast cancer // Oncogene. – 2019. – Vol. 38. – № 12. – P. 2092–2107.

151. Saha S.K., Choi H.Y., Kim B.W., Dayem A.A., Yang G.-M., Kim K.S., Yin Y.F., Cho S.-G. KRT19 directly interacts with β-catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties // Oncogene. – 2017. – Vol. 36. – № 3. – P. 332–349.

152. Leng Z., Li Y., Zhou G., Lv X., Ai W., Li J., Hou L. Krüppel-like factor 4 regulates stemness and mesenchymal properties of colorectal cancer stem cells through the TGF-β1/Smad/snail pathway // J Cell Mol Med. – 2020. – Vol. 24. – № 2. – P. 1866–1877.

153. Liu L., Zhu H., Liao Y., Wu W., Liu L., Liu L., Wu Y., Sun F., Lin H.-W. Inhibition of Wnt/β-catenin pathway reverses multi-drug resistance and EMT in Oct4+/Nanog+ NSCLC cells // Biomed Pharmacother. – 2020. – Vol. 127. – P. 110225.

154. Liu Y., Song Y., Cao M., Fan W., Cui Y., Cui Y., Zhan Y., Gu R., Tian F., Zhang S., Cai L., Xing Y. A novel EHD1/CD44/Hippo/SP1 positive feedback loop potentiates stemness and metastasis in lung adenocarcinoma // Clin Transl Med. – 2022. – Vol. 12. – № 4. – P. e836.

155. Fernando W., Cruickshank B.M., Arun R.P., MacLean M.R., Cahill H.F., Morales-Quintanilla F., Dean C.A., Wasson M.-C.D., Dahn M.L., Coyle K.M., Walker O.L., Power Coombs M.R., Marcato P. ALDH1A3 is the switch that determines the balance of ALDH+ and CD24-CD44+ cancer stem cells, EMT-MET, and glucose metabolism in breast cancer // Oncogene. – 2024. – Vol. 43. – № 43. – P. 3151–3169.

156. Duan J.-J., Wang D., Cai J., Chen J.-J., Zheng X.-X., Chen T.-Q., Wang J., Zhang X., Yang Q.-K., Yu S.-C. An aldehyde dehydrogenase 1A3 inhibitor attenuates the metastasis of human colorectal cancer // Cancer Lett. – 2022. – Vol. 536. – P. 215662.

157. Verdugo E., Puerto I., Medina M.Á. An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment // Cancer Commun (Lond). – 2022. – Vol. 42. – № 11. – P. 1083–1111.

158. Obrador E., Moreno-Murciano P., Oriol-Caballo M., López-Blanch R., Pineda B., Gutiérrez-Arroyo J.L., Loras A., Gonzalez-Bonet L.G., Martinez-Cadenas C., Estrela J.M., Marqués-Torrejón M.Á. Glioblastoma Therapy: Past, Present and Future // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – № 5. – P. 2529.

159. Poon M.T.C., Sudlow C.L.M., Figueroa J.D., Brennan P.M. Longer-term (≥ 2 years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-analysis // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10. – P. 11622.

160. Yang H., Villani R.M., Wang H., Simpson M.J., Roberts M.S., Tang M., Liang X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy // J Exp Clin Cancer Res. – 2018. – Vol. 37. – P. 266.

161. Butler M., Pongor L., Su Y.-T., Xi L., Raffeld M., Quezado M., Trepel J., Aldape K., Pommier Y., Wu J. MGMT status as a clinical biomarker in glioblastoma // Trends Cancer. – 2020. – Vol. 6. – № 5. – P. 380–391.

162. Chen X., Zhang M., Gan H., Wang H., Lee J.-H., Fang D., Kitange G.J., He L., Hu Z., Parney I.F., Meyer F.B., Giannini C., Sarkaria J.N., Zhang Z. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 2949.

163. Chang K.-Y., Hsu T.-I., Hsu C.-C., Tsai S.-Y., Liu J.-J., Chou S.-W., Liu M.-S., Liou J.-P., Ko C.-Y., Chen K.-Y., Hung J.-J., Chang W.-C., Chuang C.-K., Kao T.-J., Chuang J.-Y. Specificity protein 1-modulated superoxide dismutase 2 enhances temozolomide resistance in glioblastoma, which is independent of O6-methylguanine-DNA methyltransferase // Redox Biol. – 2017. – Vol. 13. – P. 655–664.

164. Oliva C.R., Moellering D.R., Gillespie G.Y., Griguer C.E. Acquisition of Chemoresistance in Gliomas Is Associated with Increased Mitochondrial Coupling and Decreased ROS Production // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – № 9. – P. e24665.

165. Rachamala H.R., Lourembam S.D., Mukhopadhyay D., Angom R.S. Targeting Glioblastoma Stem Cells: Therapeutic Strategies and Clinical Perspectives // Cancers (Basel). – 2026. – Vol. 18. – № 9. – P. 1353.

166. Wang Q., Hu B., Hu X., Kim H., Squatrito M., Scarpace L., deCarvalho A.C., Lyu S., Li P., Li Y., Barthel F., Cho H.J., Lin Y.-H., Satani N., Martinez-Ledesma E., Zheng S., Chang E., Sauvé C.-E.G., et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment // Cancer Cell. Elsevier. – 2017. – Vol. 32. – № 1. – P. 42-56.e6.

167. Verhaak R.G.W., Hoadley K.A., Purdom E., Wang V., Qi Y., Wilkerson M.D., Miller C.R., Ding L., Golub T., Mesirov J.P., Alexe G., Lawrence M., O'Kelly M., Tamayo P., Weir B.A., Gabriel S., Winckler W., Gupta S., et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1 // Cancer Cell. Elsevier. – 2010. – Vol. 17. – № 1. – P. 98–110.

168. Shamsan G.A., Liu C.J., Braman B.C., Li R., Rathe S.K., Sarver A.L., Ghaderi N., McMahon M., Klank R.L., Tschida B.R., McFarren S.Joseph., Rosato P.C., Masopust D., Sarkaria J.N., Clark H.Brent., Rosenfeld S., Largaespada D.A., Odde D.J. Glioblastoma subtypes exhibit distinct migration mechanics and immune responses // Cancer Research Communications. – 2026.

169. Keller M., Blom M., Conze L.L., Guo M., Hägerstrand D., Aspenström P. Altered cytoskeletal status in the transition from proneural to mesenchymal glioblastoma subtypes // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 9838.

170. Qiu W., Xiao Z., Yang Y., Jiang L., Song S., Qi X., Chen Y., Yang H., Liu J., Chu L. USP10 deubiquitinates RUNX1 and promotes proneural-to-mesenchymal transition in glioblastoma // Cell Death Dis. – 2023. – Vol. 14. – № 3. – P. 207.

171. Yu W., Gui S., Peng L., Luo H., Xie J., Xiao J., Yilamu Y., Sun Y., Cai S., Cheng Z., Tao Z. STAT3-controlled CHI3L1/SPP1 positive feedback loop demonstrates the spatial heterogeneity and immune characteristics of glioblastoma // Dev Cell. – 2025. – Vol. 60. – № 12. – P. 1751-1767.e9.

172. Chen M., Ren R., Lin W., Xiang L., Zhao Z., Shao B. Exploring the oncostatin M (OSM) feed-forward signaling of glioblastoma via STAT3 in pan-cancer analysis // Cancer Cell Int. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 565.

173. Hara T., Chanoch-Myers R., Mathewson N.D., Myskiw C., Atta L., Bussema L., Eichhorn S.W., Greenwald A.C., Kinker G.S., Rodman C., Castro L.N.G., Wakimoto H., Rozenblatt-Rosen O., Zhuang X., Fan J., Hunter T., Verma I.M., Wucherpfennig K.W., et al. Interactions between cancer cells and immune cells drive transitions to mesenchymal-like states in glioblastoma // Cancer Cell. – 2021. – Vol. 39. – № 6. – P. 779-792.e11.

174. Zhang X., Chen L., Dang W.-Q., Cao M.-F., Xiao J.-F., Lv S.-Q., Jiang W.-J., Yao X.-H., Lu H.-M., Miao J.-Y., Wang Y., Yu S.-C., Ping Y.-F., Liu X.-D., Cui Y.-H., Zhang X., Bian X.-W. CCL8

secreted by tumor-associated macrophages promotes invasion and stemness of glioblastoma cells via ERK1/2 signaling // Lab Invest. – 2020. – Vol. 100. – № 4. – P. 619–629.

175. Joseph J.V., Conroy S., Tomar T., Eggens-Meijer E., Bhat K., Copray S., Walenkamp A.M.E., Boddeke E., Balasubramanyian V., Wagemakers M., den Dunnen W.F.A., Kruyt F.A.E. TGF-β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion // Cell Death & Disease. – 2014. – Vol. 5. – № 10. – P. e1443–e1443.

176. Joseph J.V., Conroy S., Pavlov K., Sontakke P., Tomar T., Eggens-Meijer E., Balasubramaniyan V., Wagemakers M., den Dunnen W.F.A., Kruyt F.A.E. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1α-ZEB1 axis // Cancer Lett. – 2015. – Vol. 359. – № 1. – P. 107–116.

177. Barnes J.M., Kaushik S., Bainer R.O., Sa J.K., Woods E.C., Kai F., Przybyla L., Lee M., Lee H.W., Tung J.C., Maller O., Barrett A.S., Lu K.V., Lakins J.N., Hansen K.C., Obernier K., Alvarez-Buylla A., Bergers G., et al. A tension-mediated glycocalyx-integrin feedback loop promotes mesenchymal-like glioblastoma // Nat Cell Biol. – 2018. – Vol. 20. – № 10. – P. 1203–1214.

178. Zhang G., Tao X., Ji B., Gong J. Hypoxia-Driven M2-Polarized Macrophages Facilitate Cancer Aggressiveness and Temozolomide Resistance in Glioblastoma // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2022. – Vol. 2022. – № 1. – P. 1614336.

179. Bhat K.P.L., Salazar K.L., Balasubramaniyan V., Wani K., Heathcock L., Hollingsworth F., James J.D., Gumin J., Diefes K.L., Kim S.H., Turski A., Azodi Y., Yang Y., Doucette T., Colman H., Sulman E.P., Lang F.F., Rao G., et al. The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma // Genes Dev. – 2011. – Vol. 25. – № 24. – P. 2594–2609.

180. Carro M.S., Lim W.K., Alvarez M.J., Bollo R.J., Zhao X., Snyder E.Y., Sulman E.P., Anne S.L., Doetsch F., Colman H., Lasorella A., Aldape K., Califano A., Iavarone A. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumors // Nature. – 2010. – Vol. 463. – № 7279. – P. 318–325.

181. Xu X., Hou Y., Long N., Jiang L., Yan Z., Xu Y., Lv Y., Xiang X., Yang H., Liu J., Qi X., Chu L. TPPP3 promote epithelial-mesenchymal transition via Snail1 in glioblastoma // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 17960.

182. Zhao C., Guo R., Guan F., Ma S., Li M., Wu J., Liu X., Li H., Yang B. MicroRNA-128-3p Enhances the Chemosensitivity of Temozolomide in Glioblastoma by Targeting c-Met and EMT // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 9471.

183. Liu R.-Z., Choi W.-S., Jain S., Xu X., Elsherbiny M.E., Glubrecht D.D., Tessier A.G., Easaw J.C., Fallone B.G., Godbout R. Stationary-to-migratory transition in glioblastoma stem-like cells driven by a fatty acid-binding protein 7-RXRα neurogenic pathway // Neuro Oncol. – 2023. – Vol. 25. – № 12. – P. 2177–2190.

184. Cai X., Feng S., Zhang J., Qiu W., Qian M., Wang Y. USP18 deubiquitinates and stabilizes Twist1 to promote epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma cells // Am J Cancer Res. – 2020. – Vol. 10. – № 4. – P. 1156–1169.

185. Bourmeau G., Anezo O., Raymond J., Ballestín A., Pichol-Thievend C., Reveilles J., Thomas A., Wang L., Miranda M., Moutaux E., Liva S., Ribecco V., Besse L., Dingli F., Loew D., Vallot C., Gargiulo G., Ravi V.M., et al. Proneural–mesenchymal hybrid glioblastoma cells are resistant to therapy and dependent on nuclear import // Neuro Oncol. – 2025. – Vol. 27. – № 11. – P. 2876–2893.

186. Cheng H.S., Chong Y.K., Lim E.K.Y., Lee X.Y., Pang Q.Y., Novera W., Marvalim C., Lee J.X.T., Ang B.T., Tang C., Tan N.S. Dual p38MAPK and MEK inhibition disrupts adaptive chemoresistance in mesenchymal glioblastoma to temozolomide // Neuro Oncol. – 2024. – Vol. 26. – № 7. – P. 1247–1261.

187. Liang W., Liu M., Su Y., Wen Y., Wang L., Shan J., Zhao J., Xie K., Wang J. Spinster homolog 2 reduces malignancies of glioblastoma via PTEN/PI3K/AKT pathway // IUBMB Life. – 2024. – Vol. 76. – № 3. – P. 140–160.

188. Chen Z., Wang S., Li H.-L., Luo H., Wu X., Lu J., Wang H.-W., Chen Y., Chen D., Wu W.-T., Zhang S., He Q., Lu D., Liu N., You Y., Wu W., Wang H. FOSL1 promotes proneural-to-mesenchymal transition of glioblastoma stem cells via UBC9/CYLD/NF-κB axis // Mol Ther. – 2022. – Vol. 30. – № 7. – P. 2568–2583.

189. Qiu B., Matthay K.K. Advancing therapy for neuroblastoma // Nat Rev Clin Oncol. – 2022. – Vol. 19. – № 8. – P. 515–533.

190. van Groningen T., Koster J., Valentijn L.J., Zwijnenburg D.A., Akogul N., Hasselt N.E., Broekmans M., Haneveld F., Nowakowska N.E., Bras J., van Noesel C.J.M., Jongejan A., van Kampen A.H., Koster L., Baas F., van Dijk-Kerkhoven L., Huizer-Smit M., Lecca M.C., et al. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states // Nature Genetics. – 2017. – Vol. 49. – № 8. – P. 1261–1266.

191. Boeva V., Louis-Brennetot C., Peltier A., Durand S., Pierre-Eugène C., Raynal V., Etchevers H.C., Thomas S., Lermine A., Daudigeos-Dubus E., Geoerger B., Orth M.F., Grünewald T.G.P., Diaz E., Ducos B., Surdez D., Carcaboso A.M., Medvedeva I., et al. Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries // Nat Genet. – 2017. – Vol. 49. – № 9. – P. 1408–1413.

192. Tian X., Zhou D., Chen L., Tian Y., Zhong B., Cao Y., Dong Q., Zhou M., Yan J., Wang Y., Qiu Y., Zhang L., Li Z., Wang H., Wang D., Ying G., Zhao Q. Polo-like kinase 4 mediates epithelial–mesenchymal transition in neuroblastoma via PI3K/Akt signaling pathway // Cell Death & Disease. – 2018. – Vol. 9. – № 2. – P. 54.

193. Gartlgruber M., Sharma A.K., Quintero A., Dreidax D., Jansky S., Park Y.-G., Kreth S., Meder J., Doncevic D., Saary P., Toprak U.H., Ishaque N., Afanasyeva E., Wecht E., Koster J., Versteeg R., Grünewald T.G.P., Jones D.T.W., et al. Super enhancers define regulatory subtypes and cell identity in neuroblastoma // Nat Cancer. – 2021. – Vol. 2. – № 1. – P. 114–128.

194. van Groningen T., Akogul N., Westerhout E.M., Chan A., Hasselt N.E., Zwijnenburg D.A., Broekmans M., Stroeken P., Haneveld F., Hooijer G.K.J., Savci-Heijink C.D., Lakeman A., Volckmann R., van Sluis P., Valentijn L.J., Koster J., Versteeg R., van Nes J. A NOTCH feed-forward loop drives reprogramming from adrenergic to mesenchymal state in neuroblastoma // Nat Commun. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1530.

195. Shi H., Tao T., Abraham B.J., Durbin A.D., Zimmerman M.W., Kadoch C., Look A.T. ARID1A loss in neuroblastoma promotes the adrenergic-to-mesenchymal transition by regulating enhancer-mediated gene expression // Sci Adv. – 2020. – Vol. 6. – № 29. – P. eaaz3440.

196. Jia Y., Guo Y., Jin Q., Qu H., Qi D., Song P., Zhang X., Wang X., Xu W., Dong Y., Liang Y., Quan C. A SUMOylation-dependent HIF-1α/CLDN6 negative feedback mitigates hypoxia-induced breast cancer metastasis // J Exp Clin Cancer Res. – 2020. – Vol. 39. – № 1. – P. 42.

197. Kim Y., Seo Y., Kim J. Novel cilengitide derivatives suppress migration and invasion of temozolomide-resistant glioblastoma cells via MAPK/Akt pathway inhibition // Journal of Neuro-Oncology. – 2026. – Vol. 177. – № 2. – P. 77.

198. Teixeira A.F., ten Dijke P., Zhu H.-J. On-Target Anti-TGF-β Therapies Are Not Succeeding in Clinical Cancer Treatments: What Are Remaining Challenges? // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – Vol. Volume 8-2020.

199. Park S.J., Choi Y.S., Lee S., Lee Y.J., Hong S., Han S., Kim B.-C. BIX02189 inhibits TGF-β1-induced lung cancer cell metastasis by directly targeting TGF-β type I receptor // Cancer Lett. – 2016. – Vol. 381. – № 2. – P. 314–322.

200. Yingling J.M., McMillen W.T., Yan L., Huang H., Sawyer J.S., Graff J., Clawson D.K., Britt K.S., Anderson B.D., Beight D.W., Desaiah D., Lahn M.M., Benhadji K.A., Lallena M.J., Holmgaard R.B., Xu X., Zhang F., Manro J.R., et al. Preclinical assessment of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a first-in-class transforming growth factor-β receptor type I inhibitor // Oncotarget. – 2017. – Vol. 9. – № 6. – P. 6659–6677.

201. Brandes A.A., Carpentier A.F., Kesari S., Sepulveda-Sanchez J.M., Wheeler H.R., Chinot O., Cher L., Steinbach J.P., Capper D., Specenier P., Rodon J., Cleverly A., Smith C., Gueorguieva I., Miles C., Guba S.C., Desaiah D., Lahn M.M., et al. A Phase II randomized study of galunisertib monotherapy or galunisertib plus lomustine compared with lomustine monotherapy in patients with recurrent glioblastoma // Neuro Oncol. – 2016. – Vol. 18. – № 8. – P. 1146–1156.

202. Faivre S., Santoro A., Kelley R.K., Gane E., Costentin C.E., Gueorguieva I., Smith C., Cleverly A., Lahn M.M., Raymond E., Benhadji K.A., Giannelli G. Novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor galunisertib (LY2157299) in advanced hepatocellular carcinoma // Liver Int. – 2019. – Vol. 39. – № 8. – P. 1468–1477.

203. He T.-Y., Wu D.-W., Lin P.-L., Wang L., Huang C.-C., Chou M.-C., Lee H. DDX3 promotes tumor invasion in colorectal cancer via the CK1ε/Dvl2 axis // Sci Rep. Nature Publishing Group. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 21483.

204. Shi R., Liu L., Wang F., He Y., Niu Y., Wang C., Zhang X., Zhang X., Zhang H., Chen M., Wang Y. Downregulation of cytokeratin 18 induces cellular partial EMT and stemness through increasing EpCAM expression in breast cancer // Cell Signal. – 2020. – Vol. 76. – P. 109810.

205. Reed E.R., Jankowski S.A., Spinella A.J., Noonan V., Haddad R., Nomoto K., Matsui J., Bais M.V., Varelas X., Kukuruzinska M.A., Monti S. β-catenin/CBP activation of mTORC1 signaling promotes partial epithelial-mesenchymal states in head and neck cancer // Transl Res. – 2023. – Vol. 260. – P. 46–60.

206. Mesropian A., Gris-Oliver A., Balaseviciute U., Potdar A.A., Kimura T., Shen J., Torres-Marcén M., Abril-Fornaguera J., Piqué-Gili M., Camell-Raventos D., Peix J., Fernández-Martínez E., Huguet-Pradell J., Hernández de Sande A., Keraite I., Esteban-Fabró R., Bárcena-Varela M., Lindblad K.E., et al. E7386 Enhances Lenvatinib's Antitumor Activity in Preclinical Models and Human Hepatocellular Carcinoma // Clin Cancer Res. – 2025. – Vol. 31. – № 23. – P. 5037–5050.

207. Kondo S., Yamamoto N., Katsuya Y., Sato J., Mishima S., Kawazoe A., Oki E., Yamazaki K., Itoh S., Yokota T., Nagao S., Kimura T., Yamamuro S., Hayata N., Tamai T., Shitara K. E7386 in patients with advanced solid tumors: results from the dose-escalation part and an expansion part of a phase I study // ESMO Open. – 2025. – Vol. 10. – № 12. – P. 105893.

208. Wang H., Zhang H., Sun Z., Chen W., Miao C. GABAB receptor inhibits tumor progression and epithelial-mesenchymal transition via the regulation of Hippo/YAP1 pathway in colorectal cancer // Int J Biol Sci. – 2021. – Vol. 17. – № 8. – P. 1953–1962.

209. Yu H., Hu X., Zhang Y., Wang J., Ni Z., Wang Y., Zhu H. GLDC promotes colorectal cancer metastasis through epithelial-mesenchymal transition mediated by Hippo signaling pathway // Med Oncol. – 2023. – Vol. 40. – № 10. – P. 293.

210. Barrette A.M., Ronk H., Joshi T., Mussa Z., Mehrotra M., Bouras A., Nudelman G., Jesu Raj J.G., Bozec D., Lam W., Houldsworth J., Yong R., Zaslavsky E., Hadjipanayis C.G., Birtwistle M.R., Tsankova N.M. Anti-invasive efficacy and survival benefit of the YAP-TEAD inhibitor verteporfin in preclinical glioblastoma models // Neuro Oncol. – 2022. – Vol. 24. – № 5. – P. 694–707.

211. Yap T.A., Kwiatkowski D.J., Dagogo-Jack I., Offin M., Zauderer M.G., Kratzke R., Desai J., Body A., Millward M., Tolcher A.W., Raghav K.P.S., Thurston A., Post L., Dorr F.A., Tang T.T., Li Y., Sharma N., Kindler H.L. YAP/TEAD inhibitor VT3989 in solid tumors: a phase 1/2 trial // Nature Medicine. – 2025. – Vol. 31. – № 12. – P. 4281–4290.

212. Ma R., Ec H., M A., A G., A S., T S. Loss of Notch1 Activity Inhibits Prostate Cancer Growth and Metastasis and Sensitizes Prostate Cancer Cells to Antiandrogen Therapies // Molecular cancer therapeutics. Mol Cancer Ther. – 2019. – Vol. 18. – № 7.

213. Zhao Z.-L., Zhang L., Huang C.-F., Ma S.-R., Bu L.-L., Liu J.-F., Yu G.-T., Liu B., Gutkind J.S., Kulkarni A.B., Zhang W.-F., Sun Z.-J. NOTCH1 inhibition enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic agents by targeting head neck cancer stem cell // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 24704.

214. Shi Q., Xue C., Zeng Y., Yuan X., Chu Q., Jiang S., Wang J., Zhang Y., Zhu D., Li L. Notch signaling pathway in cancer: from mechanistic insights to targeted therapies // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2024. – Vol. 9. – № 1. – P. 128.

215. Li K., Xue W., Lu Z., Wang S., Zheng J., Lu K., Li M., Zong Y., Xu F., Dai J., Yang Y., Sun J. Tumor-derived exosomal ADAM17 promotes pre-metastatic niche formation by enhancing vascular permeability in colorectal cancer // J Exp Clin Cancer Res. – 2024. – Vol. 43. – № 1. – P. 59.

216. Wang W., Sun R., Zeng L., Chen Y., Zhang N., Cao S., Deng S., Meng X., Yang S. GALNT2 promotes cell proliferation, migration, and invasion by activating the Notch/Hes1-PTEN-PI3K/Akt signaling pathway in lung adenocarcinoma // Life Sciences. – 2021. – Vol. 276. – P. 119439.

217. Vigolo M., Urech C., Lamy S., Monticone G., Zabaleta J., Hossain F., Wyczechowska D., Del Valle L., O'Regan R.M., Miele L., Lehal R., Majumder S. The Efficacy of CB-103, a First-in-Class Transcriptional Notch Inhibitor, in Preclinical Models of Breast Cancer // Cancers (Basel). – 2023. – Vol. 15. – № 15. – P. 3957.

218. Astudillo L., Da Silva T.G., Wang Z., Han X., Jin K., VanWye J., Zhu X., Weaver K., Oashi T., Lopes P.E.M., Orton D., Neitzel L.R., Lee E., Landgraf R., Robbins D.J., MacKerell A.D., Capobianco A.J. The small molecule IMR-1 inhibits the Notch transcriptional activation complex to suppress tumorigenesis // Cancer Res. – 2016. – Vol. 76. – № 12. – P. 3593–3603.

219. Solomonov I., Kollet O., Sagi I. Extracellular matrix and proteolysis: mechanisms driving irreversible changes and shaping cell behavior // FEBS J. – 2025.

220. Shoari A., Coban M.A., Radisky E.S. Therapeutic potential of inhibitors of gelatinases MMP-2 and MMP-9 for the treatment of breast cancer // FEBS J. – 2025.

221. Xu G., Ou L., Liu Y., Wang X., Liu K., Li J., Li J., Wang S., Huang D., Zheng K., Wang S. Upregulated expression of MMP family genes is associated with poor survival in patients with

esophageal squamous cell carcinoma via regulation of proliferation and epithelial-mesenchymal transition // Oncol Rep. – 2020. – Vol. 44. – № 1. – P. 29–42.

222. Wang J., Huang P., Pan X., Xia C., Zhang H., Zhao H., Yuan Z., Liu J., Meng C., Liu F. Resveratrol reverses TGF-β1-mediated invasion and metastasis of breast cancer cells via the SIRT3/AMPK/autophagy signal axis // Phytother Res. – 2023. – Vol. 37. – № 1. – P. 211–230.

223. Xiong L., Lu H., Hu Y., Wang W., Liu R., Wan X., Fu J. In vitro anti-motile effects of Rhoifolin, a flavonoid extracted from Callicarpa nudiflora on breast cancer cells via downregulating Podocalyxin-Ezrin interaction during Epithelial Mesenchymal Transition // Phytomedicine. – 2021. – Vol. 93. – P. 153486.

224. Park G.B., Kim D. TLR4-mediated galectin-1 production triggers epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells through ADAM10- and ADAM17-associated lactate production // Mol Cell Biochem. – 2017. – Vol. 425. – № 1–2. – P. 191–202.

225. Lyu Y., Xiao Q., Yin L., Yang L., He W. Potent delivery of an MMP inhibitor to the tumor microenvironment with thermosensitive liposomes for the suppression of metastasis and angiogenesis // Signal Transduct Target Ther. – 2019. – Vol. 4. – P. 26.

226. Agraval H., Yadav U.C.S. MMP-2 and MMP-9 mediate cigarette smoke extract-induced epithelial-mesenchymal transition in airway epithelial cells via EGFR/Akt/GSK3β/β-catenin pathway: Amelioration by fisetin // Chem Biol Interact. – 2019. – Vol. 314. – P. 108846.

227. Ye Y., Kuang X., Xie Z., Liang L., Zhang Z., Zhang Y., Ma F., Gao Q., Chang R., Lee H.-H., Zhao S., Su J., Li H., Peng J., Chen H., Yin M., Peng C., Yang N., et al. Small-molecule MMP2/MMP9 inhibitor SB-3CT modulates tumor immune surveillance by regulating PD-L1 // Genome Med. – 2020. – Vol. 12. – № 1. – P. 83.

228. Bacchetti R., Yuan S., Rainero E. ADAMTS Proteases: Their Multifaceted Role in the Regulation of Cancer Metastasis // Diseases & Research. – 2024. – Vol. 4. – № 1. – P. 40–52.

229. Chien M.-H., Yang Y.-C., Ho K.-H., Ding Y.-F., Chen L.-H., Chiu W.-K., Chen J.-Q., Tung M.-C., Hsiao M., Lee W.-J. Cyclic increase in the ADAMTS1-L1CAM-EGFR axis promotes the EMT and cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma // Cell Death Dis. – 2024. – Vol. 15. – № 1. – P. 82.

230. Lee H.-C., Chang C.-Y., Huang Y.-C., Wu K.-L., Chiang H.-H., Chang Y.-Y., Liu L.-X., Hung J.-Y., Hsu Y.-L., Wu Y.-Y., Tsai Y.-M. Downregulated ADAMTS1 Incorporating A2M Contributes to Tumorigenesis and Alters Tumor Immune Microenvironment in Lung Adenocarcinoma // Biology. – 2022. – Vol. 11. – № 5. – P. 760.

231. Tian Y., Li J., Dong R., Guan Y., Wang Y., Yan L., Zhang J., Kang S. ADAMTS2 mediates epithelial–mesenchymal transition and inflammation in high-grade serous ovarian cancer: a study based on bioinformatic analyses and experiments // BMC Cancer. – 2025. – Vol. 25. – P. 1376.

232. Wang Y.P., Zhao Y.J., Kong X.L. A metalloproteinase of the disintegrin and metalloproteinases and the thrombospondin motifs 6 as a novel marker for colon cancer: Functional experiments // Genetics and Molecular Biology. – 2020. – Vol. 43. – № 4. – P. e20190266.

233. Cain S.A., Woods S., Singh M., Kimber S.J., Baldock C. ADAMTS6 cleaves the large latent TGFβ complex and increases the mechanotension of cells to activate TGFβ // Matrix Biology. – 2022. – Vol. 114. – P. 18–34.

234. He R.-Z., Zheng J.-H., Yao H.-F., Xu D.-P., Yang M.-W., Liu D.-J., Sun Y.-W., Huo Y.-M. ADAMTS12 promotes migration and epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis for pancreatic cancer // Hepatobiliary Pancreat Dis Int. – 2023. – Vol. 22. – № 2. – P. 169–178.

235. Xu H., Xiao Q., Fan Y., Xiang T., Li C., Li C., Li S., Hui T., Zhang L., Li H., Li L., Ren G. Epigenetic silencing of ADAMTS18 promotes cell migration and invasion of breast cancer through AKT and NF-κB signaling // Cancer Med. – 2017. – Vol. 6. – № 6. – P. 1399–1408.

236. Skerrett D.L., Stapledon C.J.M., Ahuja M., Navuru D.R., Duiker M.J., Krishnan R., Schnitzer T.J., Peat R.A., Bloom P.D. Effects of pentosan polysulfate sodium on synovial fluid biomarkers in moderate to severe knee osteoarthritis: an exploratory, phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial // Arthritis Res Ther. – 2026. – Vol. 28. – № 1. – P. 73.

237. Zhang Y., Chen M., Fang X., Han Y., Li Y. Progression and Metastasis of Lung Cancer: Clinical Features, Molecular Mechanisms, and Clinical Managements // MedComm (2020). – 2025. – Vol. 6. – № 12. – P. e70477.

238. Solsona-Vilarrasa E., Vousden K.H. Obesity, white adipose tissue and cancer // FEBS J. – 2025. – Vol. 292. – № 9. – P. 2189–2207.

239. Lauby-Secretan B., Scoccianti C., Loomis D., Grosse Y., Bianchini F., Straif K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group // N Engl J Med. – 2016. – Vol. 375. – № 8. – P. 794–798.

240. GBD 2021 Adult BMI Collaborators. Global, regional, and national prevalence of adult overweight and obesity, 1990-2021, with forecasts to 2050: a forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021 // Lancet. London, England. – 2025. – Vol. 405. – № 10481. – P. 813–838.

241. Brown K.A., Scherer P.E. Update on Adipose Tissue and Cancer // Endocr Rev. – 2023. – Vol. 44. – № 6. – P. 961–974.

242. Strong A.L., Ohlstein J.F., Biagas B.A., Rhodes L.V., Pei D.T., Tucker H.A., Llamas C., Bowles A.C., Dutreil M.F., Zhang S., Gimble J.M., Burow M.E., Bunnell B.A. Leptin produced by obese adipose

stromal/stem cells enhances proliferation and metastasis of estrogen receptor positive breast cancers // Breast Cancer Res. – 2015. – Vol. 17. – № 1. – P. 112.

243. Sabol R.A., Bowles A.C., Côté A., Wise R., O'Donnell B., Matossian M.D., Hossain F.M., Burks H.E., Del Valle L., Miele L., Collins-Burow B.M., Burow M.E., Bunnell B.A. Leptin produced by obesity-altered adipose stem cells promotes metastasis but not tumorigenesis of triple-negative breast cancer in orthotopic xenograft and patient-derived xenograft models // Breast Cancer Res. – 2019. – Vol. 21. – № 1. – P. 67.

244. Shen L., Zhang C., Cui K., Liang X., Zhu G., Hong L. Leptin secreted by adipocytes promotes EMT transition and endometrial cancer progression via the JAK2/STAT3 signalling pathway // Adipocyte. – 2024. – Vol. 13. – № 1. – P. 2293273.

245. Luo S.-D., Tsai H.-T., Hwang C.-F., Chiu T.-J., Li S.-H., Hsu Y.-L., Hsiao C.-C., Chen C.-H. Aberrant miR-874-3p/leptin/EGFR/c-Myc signaling contributes to nasopharyngeal carcinoma pathogenesis // J Exp Clin Cancer Res. – 2022. – Vol. 41. – № 1. – P. 215.

246. Yan D., Avtanski D., Saxena N.K., Sharma D. Leptin-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells requires β-catenin activation via Akt/GSK3- and MTA1/Wnt1 protein-dependent pathways // J Biol Chem. – 2012. – Vol. 287. – № 11. – P. 8598–8612.

247. Wang L., Tang C., Cao H., Li K., Pang X., Zhong L., Dang W., Tang H., Huang Y., Wei L., Su M., Chen T. Activation of IL-8 via PI3K/Akt-dependent pathway is involved in leptin-mediated epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells // Cancer Biol Ther. – 2015. – Vol. 16. – № 8. – P. 1220–1230.

248. Mishra A.K., Parish C.R., Wong M.-L., Licinio J., Blackburn A.C. Leptin signals via TGFB1 to promote metastatic potential and stemness in breast cancer // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – № 5. – P. e0178454.

249. Chang C.-C., Wu M.-J., Yang J.-Y., Camarillo I.G., Chang C.-J. Leptin-STAT3-G9a Signaling Promotes Obesity-Mediated Breast Cancer Progression // Cancer Res. – 2015. – Vol. 75. – № 11. – P. 2375–2386.

250. Wei L., Li K., Pang X., Guo B., Su M., Huang Y., Wang N., Ji F., Zhong C., Yang J., Zhang Z., Jiang Y., Liu Y., Chen T. Leptin promotes epithelial-mesenchymal transition of breast cancer via the upregulation of pyruvate kinase M2 // J Exp Clin Cancer Res. – 2016. – Vol. 35. – № 1. – P. 166.

251. Kato S., Abarzua-Catalan L., Trigo C., Delpiano A., Sanhueza C., García K., Ibañez C., Hormazábal K., Diaz D., Brañes J., Castellón E., Bravo E., Owen G., Cuello M. Leptin stimulates migration and invasion and maintains cancer stem-like properties in ovarian cancer cells: an explanation for poor outcomes in obese women // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6. – № 25. – P. 21100.

252. Liu W., Zeng Y., Hao X., Wang X., Liu J., Gao T., Wang M., Zhang J., Huo M., Hu T., Ma T., Zhang D., Teng X., Yu H., Zhang M., Yuan B., Huang W., Yang Y., et al. JARID2 coordinates with the NuRD complex to facilitate breast tumorigenesis through response to adipocyte-derived leptin // Cancer Commun (Lond). London, England. – 2023. – Vol. 43. – № 10. – P. 1117–1142.

253. Xiao J., Cao S., Wang J., Li P., Cheng Q., Zhou X., Dong J., Li Y., Zhao X., Xu Z., Yang L. Leptin-mediated suppression of lipoprotein lipase cleavage enhances lipid uptake and facilitates lymph node metastasis in gastric cancer // Cancer Commun (Lond). London, England. – 2024. – Vol. 44. – № 8. – P. 855–878.

254. Rios-Colon L., Chijioke J., Niture S., Afzal Z., Qi Q., Srivastava A., Ramalinga M., Kedir H., Cagle P., Arthur E., Sharma M., Moore J., Deep G., Suy S., Collins S.P., Kumar D. Leptin modulated microRNA-628-5p targets Jagged-1 and inhibits prostate cancer hallmarks // Sci Rep. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 10073.

255. Ahn J., Kim J., Shin C., Ahn S. Anthropometrics, cancer risks, and survival outcomes in adult patients with glioma - a systematic review and meta-analysis // Acta Neurochir (Wien). – 2025. – Vol. 167. – № 1. – P. 188.

256. Riolfi M., Ferla R., Valle L.D., Piña-Oviedo S., Scolaro L., Micciolo R., Guidi M., Terrasi M., Cetto G.L., Surmacz E. Leptin and Its Receptor are Overexpressed in Brain Tumors and Correlate with the Degree of Malignancy // Brain Pathol. – 2009. – Vol. 20. – № 2. – P. 481–489.

257. Han G., Li Y., Cao Y., Yue Z., Zhang Y., Wang L., Liu J. Overexpression of leptin receptor in human glioblastoma: Correlation with vasculogenic mimicry and poor prognosis // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – № 35. – P. 58163–58171.

258. Martín R., Cordova C., Gutiérrez B., Hernández M., Nieto M.L. A dangerous liaison: Leptin and sPLA2-IIA join forces to induce proliferation and migration of astrocytoma cells // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – № 3. – P. e0170675.

259. Ferla R., Haspinger E., Surmacz E. Metformin inhibits leptin-induced growth and migration of glioblastoma cells // Oncol Lett. – 2012. – Vol. 4. – № 5. – P. 1077–1081.

260. Panza S., Russo U., Giordano F., Leggio A., Barone I., Bonofiglio D., Gelsomino L., Malivindi R., Conforti F.L., Naimo G.D., Giordano C., Catalano S., Andò S. Leptin and Notch Signaling Cooperate in Sustaining Glioblastoma Multiforme Progression // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10. – № 6. – P. 886.

261. Han G., Wang L., Zhao R., Yue Z., Zhou X., Hu X., Cao Y., Dai D., Liu J. Leptin promotes human glioblastoma growth through activating Signal Transducers and Activators of Transcription 3 signaling // Brain Res Bull. – 2012. – Vol. 87. – № 2–3. – P. 274–279.

262. Ferla R., Bonomi M., Otvos L., Surmacz E. Glioblastoma-derived Leptin Induces Tube Formation and Growth of Endothelial Cells: Comparison with VEGF Effects // BMC Cancer. – 2011. – Vol. 11. – P. 303.

263. Han G., Wang L., Zhao W., Yue Z., Zhao R., Li Y., Zhou X., Hu X., Liu J. High expression of leptin receptor leads to temozolomide resistance with exhibiting stem/progenitor cell features in gliobalastoma // Cell Cycle. – 2013. – Vol. 12. – № 24. – P. 3833–3840.

264. Johnsen J.I., Dyberg C., Fransson S., Wickström M. Molecular mechanisms and therapeutic targets in neuroblastoma // Pharmacol Res. – 2018. – Vol. 131. – P. 164–176.

265. IJpma I., Lequin M.H., Nievelstein R.A.J., Fiocco M., Tissing W.J.E. Body composition of patients with neuroblastoma using computed tomography // Pediatr Blood Cancer. – 2021. – Vol. 68. – № 12. – P. e29337.

266. Russo V.C., Metaxas S., Kobayashi K., Harris M., Werther G.A. Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells // Endocrinology. – 2004. – Vol. 145. – № 9. – P. 4103–4112.

267. Wang R., Swick A.G. Identification and characterization of a leptin-responsive neuroblastoma cell line // Biochem Biophys Res Commun. – 2009. – Vol. 379. – № 4. – P. 835–839.

268. M T., T H., M Y., K O. Leptin induced GRP78 expression through the PI3K-mTOR pathway in neuronal cells // Scientific reports. Sci Rep. – 2014. – Vol. 4.

269. Otvos L., Kovalszky I., Riolfi M., Ferla R., Olah J., Sztodola A., Nama K., Molino A., Piubello Q., Wade J.D., Surmacz E. Efficacy of a leptin receptor antagonist peptide in a mouse model of triple-negative breast cancer // Eur J Cancer. Oxford, England : 1990. – 2011. – Vol. 47. – № 10. – P. 1578–1584.

270. Catalano S., Leggio A., Barone I., De Marco R., Gelsomino L., Campana A., Malivindi R., Panza S., Giordano C., Liguori A., Bonofiglio D., Liguori A., Andò S. A novel leptin antagonist peptide inhibits breast cancer growth in vitro and in vivo // J Cell Mol Med. – 2015. – Vol. 19. – № 5. – P. 1122–1132.

271. Rene Gonzalez R., Watters A., Xu Y., Singh U.P., Mann D.R., Rueda B.R., Penichet M.L. Leptin-signaling inhibition results in efficient anti-tumor activity in estrogen receptor positive or negative breast cancer // Breast Cancer Res. – 2009. – Vol. 11. – № 3. – P. R36.

272. Harmon T., Harbuzariu A., Lanier V., Lipsey C.C., Kirlin W., Yang L., Gonzalez-Perez R.R. Nanoparticle-linked antagonist for leptin signaling inhibition in breast cancer // World J Clin Oncol. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 54–66.

273. Harbuzariu A., Rampoldi A., Daley-Brown D.S., Candelaria P., Harmon T.L., Lipsey C.C., Beech D.J., Quarshie A., Ilies G.O., Gonzalez-Perez R.R. Leptin-Notch signaling axis is involved in pancreatic cancer progression // Oncotarget. – 2016. – Vol. 8. – № 5. – P. 7740–7752.

274. Otvos L., Kovalszky I., Scolaro L., Sztodola A., Olah J., Cassone M., Knappe D., Hoffmann R., Lovas S., Hatfield M.P.D., Beko G., Zhang S., Wade J.D., Surmacz E. Peptide-based leptin receptor antagonists for cancer treatment and appetite regulation // Biopolymers. – 2011. – Vol. 96. – № 2. – P. 117–125.

275. Esquer H., Zhou Q., Nemkov T., Abraham A.D., Rinaldetti S., Chen Y.-C., Zhang X., Orman M.V., D'Alessandro A., Ferrer M., Messersmith W.A., LaBarbera D.V. Isolating and targeting the real-time plasticity and malignant properties of epithelial-mesenchymal transition in cancer // Oncogene. – 2021. – Vol. 40. – № 16. – P. 2884–2897.

276. Ang H.L., Mohan C.D., Shanmugam M.K., Leong H.C., Makvandi P., Rangappa K.S., Bishayee A., Kumar A.P., Sethi G. Mechanism of epithelial-mesenchymal transition in cancer and its regulation by natural compounds // Med Res Rev. – 2023. – Vol. 43. – № 4. – P. 1141–1200.

277. Deng S., Liu Y., Liu X., Yu J., Chen Y., Huo J. Inhibition of colorectal cancer aggressiveness by Oleanolic acid through Nur77 degradation // Phytomedicine. – 2024. – Vol. 135. – P. 156192.

278. Hei B., Liu R., Li M. Ursolic acid inhibits glioblastoma through suppressing TGFβ-mediated epithelial-mesenchymal transition (EMT) and angiogenesis // Heliyon. – 2024. – Vol. 10. – № 6. – P. e27722.

279. Chen Y., Wu X., Liu C., Zhou Y. Betulinic acid triggers apoptosis and inhibits migration and invasion of gastric cancer cells by impairing EMT progress // Cell Biochem Funct. – 2020. – Vol. 38. – № 6. – P. 702–709.

280. Zhang J.-F., Li Y.-H., Wang Z.-Z., Jia S.-M., Yang P., Wang R.-N., Zhao J.-N., Yuan L., Nan Y. 18β-Glycyrrhetinic acid inhibits the proliferation and metastasis of gastric cancer by inhibiting the TCTP/AKT/P53 signaling pathway // Sci Rep. – 2025. – Vol. 15. – P. 33429.

281. Honda T., Rounds B.V., Gribble G.W., Suh N., Wang Y., Sporn M.B. Design and synthesis of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid, a novel and highly active inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophages // Bioorg Med Chem Lett. – 1998. – Vol. 8. – № 19. – P. 2711–2714.

282. Liby K., Royce D.B., Williams C.R., Risingsong R., Yore M.M., Honda T., Gribble G.W., Dmitrovsky E., Sporn T.A., Sporn M.B. The synthetic triterpenoids CDDO-methyl ester and CDDO-ethyl amide prevent lung cancer induced by vinyl carbamate in A/J mice // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67. – № 6. – P. 2414–2419.

283. Jeong S.A., Kim I.Y., Lee A.R., Yoon M.J., Cho H., Lee J.-S., Choi K.S. Ca2+ influx-mediated dilation of the endoplasmic reticulum and c-FLIPL downregulation trigger CDDO-Me–induced apoptosis in breast cancer cells // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6. – № 25. – P. 21173–21192.

284. Jutooru I., Chadalapaka G., Abdelrahim M., Basha M.R., Samudio I., Konopleva M., Andreeff M., Safe S. Methyl 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oate decreases specificity protein

transcription factors and inhibits pancreatic tumor growth: role of microRNA-27a // Mol Pharmacol. – 2010. – Vol. 78. – № 2. – P. 226–236.

285. Gao X., Deeb D., Jiang H., Liu Y., Dulchavsky S.A., Gautam S.C. Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF-kappaB and Notch1 signaling // J Neurooncol. – 2007. – Vol. 84. – № 2. – P. 147–157.

286. Hong D.S., Kurzrock R., Supko J.G., He X., Naing A., Wheler J., Lawrence D., Eder J.P., Meyer C.J., Ferguson D.A., Mier J., Konopleva M., Konoplev S., Andreeff M., Kufe D., Lazarus H., Shapiro G.I., Dezube B.J. A phase I first-in-human trial of bardoxolone methyl in patients with advanced solid tumors and lymphomas // Clin Cancer Res. – 2012. – Vol. 18. – № 12. – P. 3396–3406.

287. Sporn M.B., Liby K.T., Yore M.M., Fu L., Lopchuk J.M., Gribble G.W. New Synthetic Triterpenoids: Potent Agents for Prevention and Treatment of Tissue Injury Caused by Inflammatory and Oxidative Stress // J Nat Prod. – 2011. – Vol. 74. – № 3. – P. 537–545.

288. Schiavoni V., Di Crescenzo T., Membrino V., Alia S., Fantone S., Salvolini E., Vignini A. Bardoxolone Methyl: A Comprehensive Review of Its Role as a Nrf2 Activator in Anticancer Therapeutic Applications // Pharmaceuticals (Basel). – 2025. – Vol. 18. – № 7. – P. 966.

289. Wang Y.-Y., Yang Y.-X., Zhe H., He Z.-X., Zhou S.-F. Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties // Drug Des Devel Ther. – 2014. – Vol. 8. – P. 2075–2088.

290. Wang Y., Liang Q., Liang S., Shan Y., Shi S., Zhou X., Wang Z., Xu Z., Pei D., Zhang M., Lou Z., Xu B., Ye S. Bardoxolone methyl blocks the efflux of Zn2+ by targeting hZnT1 to inhibit the proliferation and metastasis of cervical cancer // Protein Cell. – 2025. – Vol. 16. – № 11. – P. 991–996.

291. Kim S.-H., Song S.E., Baik H., Hur D.Y., Kang M.S., Bae K.B. 15-Prostaglandin Dehydrogenase Inhibition Enhances Colon Cancer Metastasis by Up-regulation of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Genes // Anticancer Res. – 2022. – Vol. 42. – № 11. – P. 5385–5396.

292. Ling X., Konopleva M., Zeng Z., Ruvolo V., Stephens L.C., Schober W., McQueen T., Dietrich M., Madden T.L., Andreeff M. The novel triterpenoid C-28 methyl ester of 2-cyano-3, 12-dioxoolen-1, 9-dien-28-oic acid inhibits metastatic murine breast tumor growth through inactivation of STAT3 signaling // Cancer Res. – 2007. – Vol. 67. – № 9. – P. 4210–4218.

293. Yang L., Calingasan N.Y., Thomas B., Chaturvedi R.K., Kiaei M., Wille E.J., Liby K.T., Williams C., Royce D., Risingsong R., Musiek E.S., Morrow J.D., Sporn M., Beal M.F. Neuroprotective effects of the triterpenoid, CDDO methyl amide, a potent inducer of Nrf2-mediated transcription // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – № 6. – P. e5757.

294. Stack C., Ho D., Wille E., Calingasan N.Y., Williams C., Liby K., Sporn M., Dumont M., Beal M.F. Triterpenoids CDDO-ethyl amide and CDDO-trifluoroethyl amide improve the behavioral phenotype and brain pathology in a transgenic mouse model of Huntington's disease // Free Radic Biol Med. – 2010. – Vol. 49. – № 2. – P. 147–158.

295. Salomatina O.V., Sen'kova A.V., Moralev A.D., Savin I.A., Komarova N.I., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A., Markov A.V. Novel Epoxides of Soloxolone Methyl: An Effect of the Formation of Oxirane Ring and Stereoisomerism on Cytotoxic Profile, Anti-Metastatic and Anti-Inflammatory Activities In Vitro and In Vivo // Int J Mol Sci. – 2022. – Vol. 23. – № 11. – P. 6214.

296. Markov A.V., Kel A.E., Salomatina O.V., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A., Logashenko E.B. Deep insights into the response of human cervical carcinoma cells to a new cyano enone-bearing triterpenoid soloxolone methyl: a transcriptome analysis // Oncotarget. – 2019. – Vol. 10. – № 51. – P. 5267–5297.

297. Akodad S., Niu X., Secades B., Stevens H. Impact of drug repurposing between 1985 and 2024 on pharmaceutical innovation // Commun Med (Lond). – 2026. – Vol. 6. – № 1. – P. 84.

298. Ren B.-X., Li Y., Li H.-M., Lu T., Wu Z.-Q., Fu R. The antibiotic drug trimethoprim suppresses tumour growth and metastasis via targeting Snail // Br J Pharmacol. – 2022. – Vol. 179. – № 11. – P. 2659–2677.

299. Nandi S., Banerjee S., Manna D., Awasthi A., Biswas A., Das A., Mukherjee B., Mitra P., Mandal M. Targeting of HSP27 and MMP-2/9 Crosstalk by High-Throughput Drug Repurposing Strategies Identifies Paroxetine as a Potential Candidate in Glioblastoma // J Med Chem. – 2026. – Vol. 69. – № 4. – P. 4659–4676.

300. Jonckheere S., Taminau J., Adams J., Haerinck J., De Coninck J., Verstappe J., De Clercq K., Peeters E., Gheldof A., De Smedt E., Goossens V., Audenaert D., Candi A., Versele M., De Groote D., Verschuere H., Stemmler M., Brabletz T., et al. Development and validation of a high-throughput screening pipeline of compound libraries to target EMT // Cell Death Differ. – 2025. – Vol. 32. – № 11. – P. 2078–2092.

301. Subramanian A., Narayan R., Corsello S.M., Peck D.D., Natoli T.E., Lu X., Gould J., Davis J.F., Tubelli A.A., Asiedu J.K., Lahr D.L., Hirschman J.E., Liu Z., Donahue M., Julian B., Khan M., Wadden D., Smith I.C., et al. A Next Generation Connectivity Map: L1000 Platform and the First 1,000,000 Profiles // Cell. – 2017. – Vol. 171. – № 6. – P. 1437-1452.e17.

302. Bhatia S., Blick T., Pinto C., Waltham M., Monkman J., Ivanova E., Pollock P.M., Nagaraj S.H., Wiegmans A.P., Haviv I., Simpson K.J., Thompson E.W. Identifying Therapies to Combat Epithelial Mesenchymal Plasticity-Associated Chemoresistance to Conventional Breast Cancer Therapies Using An shRNA Library Screen // Cancers (Basel). – 2020. – Vol. 12. – № 5. – P. 1123.

303. Yang Y., Liu Z., Wei Y., He S., Gu A., Li Z., Li J., Xu Z., Cen B. Single-cell multi-omics analysis reveals candidate therapeutic drugs and key transcription factor specifically for the mesenchymal subtype of glioblastoma // Cell Biosci. – 2024. – Vol. 14. – № 1. – P. 151.

304. Liang M.-L., Chen C.-H., Lin Y.-C., Lin Y.-C., Liu Y.-R., Ding Y.-H., Chu C.-Y., Hsieh T.-H. Abemaciclib impairs glioblastoma sphere formation by targeting the GSK3β-mediated transcriptional regulation of CD44 and TCF7L2 // Cancer Gene Ther. – 2025. – Vol. 32. – № 10. – P. 1120–1132.

305. Kim E.H., Lee J.-H., Oh Y., Koh I., Shim J.-K., Park J., Choi J., Yun M., Jeon J.Y., Huh Y.M., Chang J.H., Kim S.H., Kim K.-S., Cheong J.-H., Kim P., Kang S.-G. Inhibition of glioblastoma tumorspheres by combined treatment with 2-deoxyglucose and metformin // Neuro Oncol. – 2017. – Vol. 19. – № 2. – P. 197–207.

306. Song Y., Chen Y., Li Y., Lyu X., Cui J., Cheng Y., Zhao L., Zhao G. Metformin inhibits TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal transition-like process and stem-like properties in GBM via AKT/mTOR/ZEB1 pathway // Oncotarget. – 2017. – Vol. 9. – № 6. – P. 7023–7035.

307. Riva G., Cilibrasi C., Bazzoni R., Cadamuro M., Negroni C., Butta V., Strazzabosco M., Dalprà L., Lavitrano M., Bentivegna A. Valproic Acid Inhibits Proliferation and Reduces Invasiveness in Glioma Stem Cells Through Wnt/β Catenin Signalling Activation // Genes (Basel). – 2018. – Vol. 9. – № 11. – P. 522.

308. Giordano F., Forestiero M., Leonetti A.E., Naimo G.D., Marrone A., De Amicis F., Marsico S., Mauro L., Panno M.L. Valproic Acid Reduces Invasiveness and Cellular Growth in 2D and 3D Glioblastoma Cell Lines // Int J Mol Sci. – 2025. – Vol. 26. – № 14. – P. 6600.

309. Quan C., Liu Y., Gao Y., Zhou H., Quan H., Han A., Lu X., Lin Z. β-Lapachone sensitizes glioblastoma to Temozolomide by inhibiting NF-κB signaling // Funct Integr Genomics. – 2025. – Vol. 25. – № 1. – P. 261.

310. Cilibrasi C., Riva G., Romano G., Cadamuro M., Bazzoni R., Butta V., Paoletta L., Dalprà L., Strazzabosco M., Lavitrano M., Giovannoni R., Bentivegna A. Resveratrol Impairs Glioma Stem Cells Proliferation and Motility by Modulating the Wnt Signaling Pathway // PLoS One. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. e0169854.

311. Kim H., Chong K., Ryu B.-K., Park K.-J., Yu M.O., Lee J., Chung S., Choi S., Park M.-J., Chung Y.-G., Kang S.-H. Repurposing Penfluridol in Combination with Temozolomide for the Treatment of Glioblastoma // Cancers (Basel). – 2019. – Vol. 11. – № 9. – P. 1310.

312. Song Y., Chen Y., Li Y., Lyu X., Cui J., Cheng Y., Zheng T., Zhao L., Zhao G. Resveratrol Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in GBM by Regulating Smad-Dependent Signaling // Biomed Res Int. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1321973.

313. Ghosalkar J., Sonawane V., Pisal T., Achrekar S., Pujari R., Chugh A., Shastry P., Joshi K. Prostate Apoptosis Response-4 (Par-4): A Novel Target in Pyronaridine-Induced Apoptosis in Glioblastoma (GBM) Cells // Cancers (Basel). – 2022. – Vol. 14. – № 13. – P. 3198.

314. Oh H.-C., Shim J.-K., Park J., Lee J.-H., Choi R.J., Kim N.H., Kim H.S., Moon J.H., Kim E.H., Chang J.H., Yook J.I., Kang S.-G. Combined effects of niclosamide and temozolomide against human glioblastoma tumorspheres // J Cancer Res Clin Oncol. – 2020. – Vol. 146. – № 11. – P. 2817–2828.

315. Galvao J., Davis B., Tilley M., Normando E., Duchen M.R., Cordeiro M.F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO // FASEB J. – 2014. – Vol. 28. – № 3. – P. 1317–1330.

316. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method // Methods. – 2001. – Vol. 25. – № 4. – P. 402–408.

317. Malyutina A., Majumder M.M., Wang W., Pessia A., Heckman C.A., Tang J. Drug combination sensitivity scoring facilitates the discovery of synergistic and efficacious drug combinations in cancer // PLoS Comput Biol. – 2019. – Vol. 15. – № 5. – P. e1006752.

318. Liang Q., Guan G., Li X., Wei C., Wu J., Cheng P., Wu A., Cheng W. Profiling pro-neural to mesenchymal transition identifies a lncRNA signature in glioma // Journal of Translational Medicine. – 2020. – Vol. 18. – № 1. – P. 378.

319. Chin C.-H., Chen S.-H., Wu H.-H., Ho C.-W., Ko M.-T., Lin C.-Y. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome // BMC Syst Biol. – 2014. – Vol. 8. – № Suppl 4. – P. S11.

320. Cook D.P., Vanderhyden B.C. Context specificity of the EMT transcriptional response // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 2142.

321. Dréan A., Goldwirt L., Verreault M., Canney M., Schmitt C., Guehennec J., Delattre J.-Y., Carpentier A., Idbaih A. Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma // Expert Review of Neurotherapeutics. Taylor & Francis. – 2016. – Vol. 16. – № 11. – P. 1285–1300.

322. Markov A.V., Sen'kova A.V., Salomatina O.V., Logashenko E.B., Korchagina D.V., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A. Trioxolone Methyl, a Novel Cyano Enone-Bearing 18βH-Glycyrrhetinic Acid Derivative, Ameliorates Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis in Mice // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 10. – P. 2406.

323. Liby K.T., Sporn M.B. Synthetic Oleanane Triterpenoids: Multifunctional Drugs with a Broad Range of Applications for Prevention and Treatment of Chronic Disease // Pharmacological Reviews. – 2012. – Vol. 64. – № 4. – P. 972–1003.

324. Gautier M., Thirant C., Delattre O., Janoueix-Lerosey I. Plasticity in Neuroblastoma Cell Identity Defines a Noradrenergic-to-Mesenchymal Transition (NMT) // Cancers (Basel). – 2021. – Vol. 13. – № 12. – P. 2904.

325. Ara T., DeClerck Y.A. Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma // Cancer Metastasis Rev. – 2006. – Vol. 25. – № 4. – P. 645–657.

326. Ostrowska-Podhorodecka Z., McCulloch C.A. Vimentin regulates the assembly and function of matrix adhesions // Wound Repair Regen. – 2021. – Vol. 29. – № 4. – P. 602–612.

327. Burns M.C., Sun Q., Daniels R.N., Camper D., Kennedy J.P., Phan J., Olejniczak E.T., Lee T., Waterson A.G., Rossanese O.W., Fesik S.W. Approach for targeting Ras with small molecules that activate SOS-mediated nucleotide exchange // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – Vol. 111. – № 9. – P. 3401–3406.

328. Roskoski R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation // Biochem Biophys Res Commun. – 2012. – Vol. 417. – № 1. – P. 5–10.

329. Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation // Pharmacol Res. – 2012. – Vol. 66. – № 2. – P. 105–143.

330. Pan X., Pei J., Wang A., Shuai W., Feng L., Bu F., Zhu Y., Zhang L., Wang G., Ouyang L. Development of small molecule extracellular signal-regulated kinases (ERKs) inhibitors for cancer therapy // Acta Pharm Sin B. – 2022. – Vol. 12. – № 5. – P. 2171–2192.

331. Jin X.-Y., Chen H., Li D.-D., Li A.-L., Wang W.-Y., Gu W. Design, synthesis, and anticancer evaluation of novel quinoline derivatives of ursolic acid with hydrazide, oxadiazole, and thiadiazole moieties as potent MEK inhibitors // J Enzyme Inhib Med Chem. – 2019. – Vol. 34. – № 1. – P. 955–972.

332. Sun W., Liu C., Zhang Y., Qiu X., Zhang L., Zhao H., Rong Y., Sun Y. Ilexgenin A, a novel pentacyclic triterpenoid extracted from Aquifoliaceae shows reduction of LPS-induced peritonitis in mice // Eur J Pharmacol. – 2017. – Vol. 797. – P. 94–105.

333. Ramaswamy P., Nanjaiah N.D., Borkotokey M. Role of MEK-ERK signaling mediated adhesion of glioma cells to extra-cellular matrix: Possible implication on migration and proliferation // Ann Neurosci. – 2019. – Vol. 26. – № 2. – P. 52–56.

334. Chaikuad A., Bullock A.N. Structural Basis of Intracellular TGF-β Signaling: Receptors and Smads // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2016. – Vol. 8. – № 11. – P. a022111.

335. Verdura S., Encinar J.A., Teixidor E., Segura-Carretero A., Micol V., Cuyàs E., Bosch-Barrera J., Menendez J.A. Silibinin Overcomes EMT-Driven Lung Cancer Resistance to New-Generation ALK Inhibitors // Cancers (Basel). – 2022. – Vol. 14. – № 24. – P. 6101.

336. Ye G., Jiao Y., Deng L., Cheng M., Wang S., Zhang J., Ouyang J., Li Y., He Y., Tu Z., Wang Z., Song X., Wang C., Qi Q., Zhang D., Wang L., Huang M., Ye W., et al. Beauvericin suppresses the proliferation and pulmonary metastasis of osteosarcoma by selectively inhibiting TGFBR2 pathway // Int J Biol Sci. – 2023. – Vol. 19. – № 14. – P. 4376–4392.

337. Suh N., Roberts A.B., Birkey Reffey S., Miyazono K., Itoh S., ten Dijke P., Heiss E.H., Place A.E., Risingsong R., Williams C.R., Honda T., Gribble G.W., Sporn M.B. Synthetic triterpenoids enhance transforming growth factor beta/Smad signaling // Cancer Res. – 2003. – Vol. 63. – № 6. – P. 1371–1376.

338. Choi S.H., Kim B.-G., Robinson J., Fink S., Yan M., Sporn M.B., Markowitz S.D., Letterio J.J. Synthetic triterpenoid induces 15-PGDH expression and suppresses inflammation-driven colon carcinogenesis // J Clin Invest. – 2014. – Vol. 124. – № 6. – P. 2472–2482.

339. Ferguson H.E., Kulkarni A., Lehmann G.M., Garcia-Bates T.M., Thatcher T.H., Huxlin K.R., Phipps R.P., Sime P.J. Electrophilic Peroxisome Proliferator–Activated Receptor-γ Ligands Have Potent Antifibrotic Effects in Human Lung Fibroblasts // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2009. – Vol. 41. – № 6. – P. 722–730.

340. Pedre B., Barayeu U., Ezeriņa D., Dick T.P. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H2S and sulfane sulfur species // Pharmacology & Therapeutics. – 2021. – Vol. 228. – P. 107916.

341. Gao X., Deeb D., Liu P., Liu Y., Arbab-Ali S., Dulchavsky S.A., Gautam S.C. Role of reactive oxygen species (ROS) in CDDO-Me-mediated growth inhibition and apoptosis in colorectal cancer cells // J Exp Ther Oncol. – 2011. – Vol. 9. – № 2. – P. 119–127.

342. Beaver C.M., Ahmed A., Masters J.R. Clonogenicity: Holoclones and Meroclones Contain Stem Cells // PLOS ONE. Public Library of Science. – 2014. – Vol. 9. – № 2. – P. e89834.

343. Wu W., Wu Y., Mayer K., von Rosenstiel C., Schecker J., Baur S., Würstle S., Liesche-Starnecker F., Gempt J., Schlegel J. Lipid Peroxidation Plays an Important Role in Chemotherapeutic Effects of Temozolomide and the Development of Therapy Resistance in Human Glioblastoma // Translational Oncology. – 2020. – Vol. 13. – № 3. – P. 100748.

344. Xia M., Tong S., Gao L. Identification of MDK as a Hypoxia- and Epithelial–Mesenchymal Transition-Related Gene Biomarker of Glioblastoma Based on a Novel Risk Model and In Vitro Experiments // Biomedicines. – 2024. – Vol. 12. – № 1. – P. 92.

345. Li Y., Zhang Y., Shi H., Liu X., Li Z., Zhang J., Wang X., Wang W., Tong X. CRTC2 activates the epithelial–mesenchymal transition of diabetic kidney disease through the CREB-Smad2/3 pathway // Molecular Medicine. – 2023. – Vol. 29. – № 1. – P. 146.

346. Nitschkowski D., Vierbuchen T., Heine H., Behrends J., Reiling N., Reck M., Rabe K.F., Kugler C., Ammerpohl O., Drömann D., Muley T., Kriegsmann M., Stathopoulos G.T., Arendt K.A.M., Goldmann T., Marwitz S. SMAD2 linker phosphorylation impacts overall survival, proliferation, TGFβ1-dependent gene expression and pluripotency-related proteins in NSCLC // British Journal of Cancer. – 2025. – Vol. 133. – № 1. – P. 52–65.

347. Lyu J., Pirooznia M., Li Y., Xiong J. The short-chain fatty acid acetate modulates epithelial-to-mesenchymal transition // Molecular Biology of the Cell. American Society for Cell Biology (mboc). – 2022. – Vol. 33. – № 8. – P. br13.

348. Ware K.E., Hinz T.K., Kleczko E., Singleton K.R., Marek L.A., Helfrich B.A., Cummings C.T., Graham D.K., Astling D., Tan A.-C., Heasley L.E. A mechanism of resistance to gefitinib mediated by cellular reprogramming and the acquisition of an FGF2-FGFR1 autocrine growth loop // Oncogenesis. – 2013. – Vol. 2. – № 3. – P. e39–e39.

349. Wedler A., Bley N., Glaß M., Müller S., Rausch A., Lederer M., Urbainski J., Schian L., Obika K.-B., Simon T., Peters L.M., Misiak C., Fuchs T., Köhn M., Jacob R., Gutschner T., Ihling C., Sinz A., et al. RAVER1 hinders lethal EMT and modulates miR/RISC activity by the control of alternative splicing // Nucleic Acids Research. – 2024. – Vol. 52. – № 7. – P. 3971–3988.

350. Liu Y., Mayo M.W., Xiao A., Hall E.H., Amin E.B., Kadota K., Adusumilli P.S., Jones D.R. Loss of BRMS1 Promotes a Mesenchymal Phenotype through NF-κB-Dependent Regulation of Twist1 // Molecular and Cellular Biology. Taylor & Francis. – 2015. – Vol. 35. – № 1. – P. 303–317.

351. Kurppa K.J., Liu Y., To C., Zhang T., Fan M., Vajdi A., Knelson E.H., Xie Y., Lim K., Cejas P., Portell A., Lizotte P.H., Ficarro S.B., Li S., Chen T., Haikala H.M., Wang H., Bahcall M., et al. Treatment-Induced Tumor Dormancy through YAP-Mediated Transcriptional Reprogramming of the Apoptotic Pathway // Cancer Cell. Elsevier. – 2020. – Vol. 37. – № 1. – P. 104–122.

352. Lykke-Andersen S., Jensen T.H. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2015. – Vol. 16. – № 11. – P. 665–677.

353. Xu X., Li N., Wang Y., Yu J., Mi J. Calcium channel TRPV6 promotes breast cancer metastasis by NFATC2IP // Cancer Lett. – 2021. – Vol. 519. – P. 150–160.

354. Anguiano M., Morales X., Castilla C., Pena A.R., Ederra C., Martínez M., Ariz M., Esparza M., Amaveda H., Mora M., Movilla N., Aznar J.M.G., Cortés-Domínguez I., Ortiz-de-Solorzano C. The use of mixed collagen-Matrigel matrices of increasing complexity recapitulates the biphasic role of cell adhesion in cancer cell migration: ECM sensing, remodeling and forces at the leading edge of cancer invasion // PLOS ONE. Public Library of Science. – 2020. – Vol. 15. – № 1. – P. e0220019.

355. Cain S.A., Mularczyk E.J., Singh M., Massam-Wu T., Kielty C.M. ADAMTS-10 and -6 differentially regulate cell-cell junctions and focal adhesions // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 35956.

356. Zhang X., Wang J., Liu N., Wu W., Li H., Chen J., Guo X. Molecular mechanism of CD163+ tumor-associated macrophage (TAM)-derived exosome-induced cisplatin resistance in ovarian cancer ascites // Annals of Translational Medicine. – 2022. – Vol. 10. – № 18. – P. 1014.

357. Bv H., Jolly M.K. Proneural-mesenchymal antagonism dominates the patterns of phenotypic heterogeneity in glioblastoma // iScience. – 2024. – Vol. 27. – № 3. – P. 109184.
358. Langfelder P., Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis // BMC Bioinformatics. – 2008. – Vol. 9. – № 1. – P. 559.
359. Zhao Z., Zhang K.-N., Wang Q., Li G., Zeng F., Zhang Y., Wu F., Chai R., Wang Z., Zhang C., Zhang W., Bao Z., Jiang T. Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA): A Comprehensive Resource with Functional Genomic Data from Chinese Glioma Patients // Genomics, Proteomics & Bioinformatics. – 2021. – Vol. 19. – № 1. – P. 1–12.
360. Gravendeel L.A.M., Kouwenhoven M.C.M., Gevaert O., de Rooi J.J., Stubbs A.P., Duijm J.E., Daemen A., Bleeker F.E., Bralten L.B.C., Kloosterhof N.K., De Moor B., Eilers P.H.C., van der Spek P.J., Kros J.M., Sillevis Smitt P.A.E., van den Bent M.J., French P.J. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69. – № 23. – P. 9065–9072.
361. Gilder A.S., Natali L., Van Dyk D.M., Zalfa C., Banki M.A., Pizzo D.P., Wang H., Klemke R.L., Mantuano E., Gonias S.L. The Urokinase Receptor Induces a Mesenchymal Gene Expression Signature in Glioblastoma Cells and Promotes Tumor Cell Survival in Neurospheres // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 2982.
362. Cao H., Zhang J., Liu H., Wan L., Zhang H., Huang Q., Xu E., Lai M. IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – № 38. – P. 61183–61198.
363. Joiakim A., Mathieu P.A., Palermo C., Gasiewicz T.A., Reiners J.J. The Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 is a ligand and antagonist of the aryl hydrocarbon receptor // Drug Metabolism and Disposition. – 2003. – Vol. 31. – № 11. – P. 1279–1282.
364. Kim J.A., Lee J., Margolis R.L., Fotedar R. SP600125 suppresses Cdk1 and induces endoreplication directly from G2 phase, independent of JNK inhibition // Oncogene. – 2010. – Vol. 29. – № 11. – P. 1702–1716.
365. Colombo R., Caldarelli M., Mennecozzi M., Giorgini M.L., Sola F., Cappella P., Perrera C., Depaolini S.R., Rusconi L., Cucchi U., Avanzi N., Bertrand J.A., Bossi R.T., Pesenti E., Galvani A., Isacchi A., Colotta F., Donati D., et al. Targeting the Mitotic Checkpoint for Cancer Therapy with NMS-P715, an Inhibitor of MPS1 Kinase // Cancer Research. – 2010. – Vol. 70. – № 24. – P. 10255–10264.
366. Andrae N., Kirches E., Hartig R., Haase D., Keilhoff G., Kalinski T., Mawrin C. Sunitinib targets PDGF-receptor and Flt3 and reduces survival and migration of human meningioma cells // Eur J Cancer. Oxford, England : 1990. – 2012. – Vol. 48. – № 12. – P. 1831–1841.

367. Liu X., Zhao J., Wu Q., Wang L., Lu W., Feng Y. ANKRD22 promotes glioma proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition by upregulating E2F1-mediated MELK expression // J Neuropathol Exp Neurol. – 2023. – Vol. 82. – № 7. – P. 631–640.

368. Yan H., He L., Lv D., Yang J., Yuan Z. The Role of the Dysregulated JNK Signaling Pathway in the Pathogenesis of Human Diseases and Its Potential Therapeutic Strategies: A Comprehensive Review // Biomolecules. – 2024. – Vol. 14. – № 2. – P. 243.

369. Wang J., Zhao K., Chen Y., Qiu Y., Zhu J., Li B., Wang Z., Chen J. NKCC1 promotes proliferation, invasion and migration in human gastric cancer cells via activation of the MAPK-JNK/EMT signaling pathway // Journal of Cancer. Ivyspring International Publisher. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 253–263.

370. Al-Mutairi M.S., Habashy H.O. DUSP4 Silencing Enhances the Sensitivity of Breast Cancer Cells to Doxorubicin through the Activation of the JNK/c-Jun Signalling Pathway // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – № 19. – P. 6146.

371. Lin L., Li Y., Liu M., Li Q., Liu Q., Li R. The Interleukin-33/ST2 axis promotes glioma mesenchymal transition, stemness and TMZ resistance via JNK activation // Aging. – 2020. – Vol. 12. – № 2. – P. 1685–1703.

372. Yao Y., Ye H., Qi Z., Mo L., Yue Q., Baral A., Hoon D.S.B., Vera J.C., Heiss J.D., Chen C.C., Hua W., Zhang J., Jin K., Wang Y., Zang X., Mao Y., Zhou L. B7-H4(B7x)–Mediated Cross-talk between Glioma-Initiating Cells and Macrophages via the IL6/JAK/STAT3 Pathway Lead to Poor Prognosis in Glioma Patients // Clinical Cancer Research. – 2016. – Vol. 22. – № 11. – P. 2778–2790.

373. Lu Y., Wang B., Shi Q., Wang X., Wang D., Zhu L. Brusatol inhibits HIF-1 signaling pathway and suppresses glucose uptake under hypoxic conditions in HCT116 cells // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 39123.

374. Herwartz C., Castillo-Juárez P., Schröder L., Barron B.L., Steger G. The Transcription Factor ZNF395 Is Required for the Maximal Hypoxic Induction of Proinflammatory Cytokines in U87-MG Cells // Mediators Inflamm. – 2015. – Vol. 2015. – P. 804264.

375. Xue H., Yuan G., Guo X., Liu Q., Zhang J., Gao X., Guo X., Xu S., Li T., Shao Q., Yan S., Li G. A novel tumor-promoting mechanism of IL6 and the therapeutic efficacy of tocilizumab: Hypoxia-induced IL6 is a potent autophagy initiator in glioblastoma via the p-STAT3-MIR155-3p-CREBRF pathway // Autophagy. – 2016. – Vol. 12. – № 7. – P. 1129–1152.

376. Shen C.-K., Huang B.-R., Yeh W.-L., Chen C.-W., Liu Y.-S., Lai S.-W., Tseng W.-P., Lu D.-Y., Tsai C.-F. Regulatory effects of IL-1β in the interaction of GBM and tumor-associated monocyte through VCAM-1 and ICAM-1 // Eur J Pharmacol. – 2021. – Vol. 905. – P. 174216.

Приложение

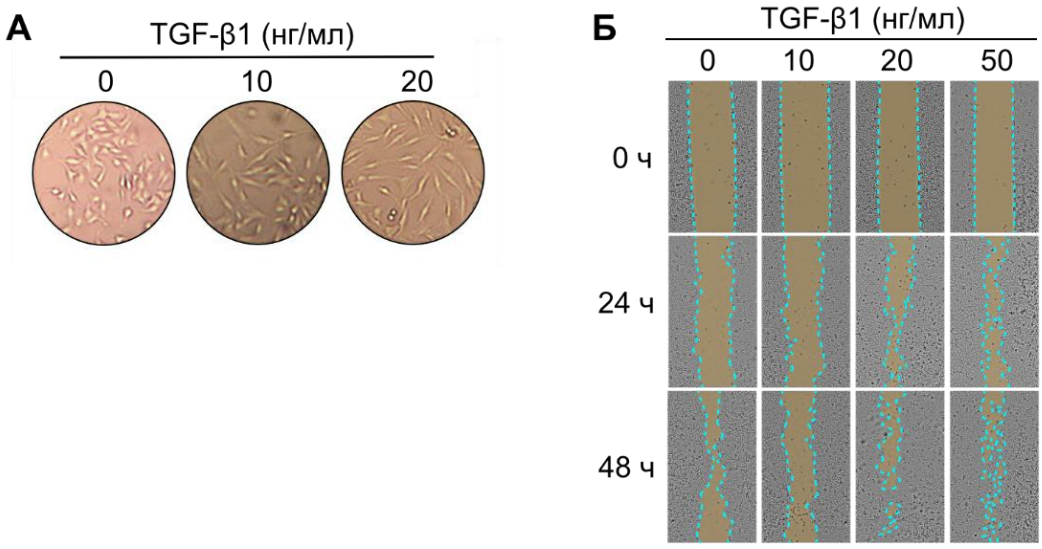

Рисунок S1. Влияние TGF-β1 на морфологию и миграцию клеток A549. (**А**) Изображение клеток A549, индуцированных TGF-β1 (0 – 20 нг/мл) в течение 48 ч, на увеличении ×400. (**Б**) Зарастание царапины на монослое A549 спустя 24 и 48 ч инкубации с TGF-β1 (0 – 50 нг/мл). Увеличение ×40.

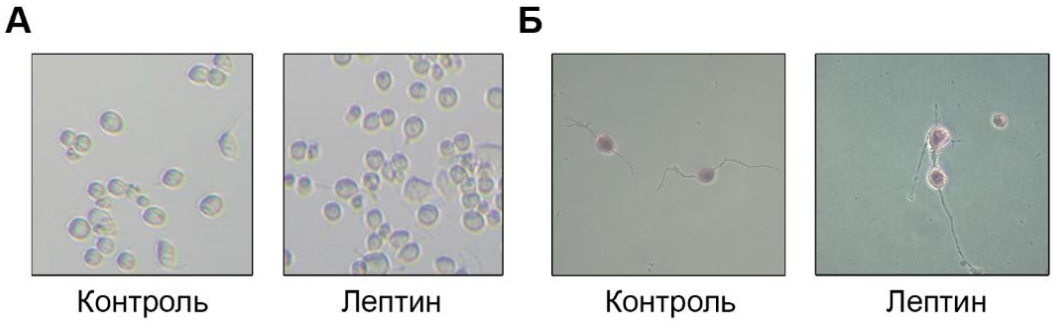

Рисунок S2. Оценка морфологии клеток Neuro2a после 48 ч инкубации с лептином (400 нг/мл). (**А**) Размер клеток оценивали при увеличении ×100. (**Б**) Нейритогенез визуализировали после окрашивания кристаллическим фиолетовым. Увеличение ×100.

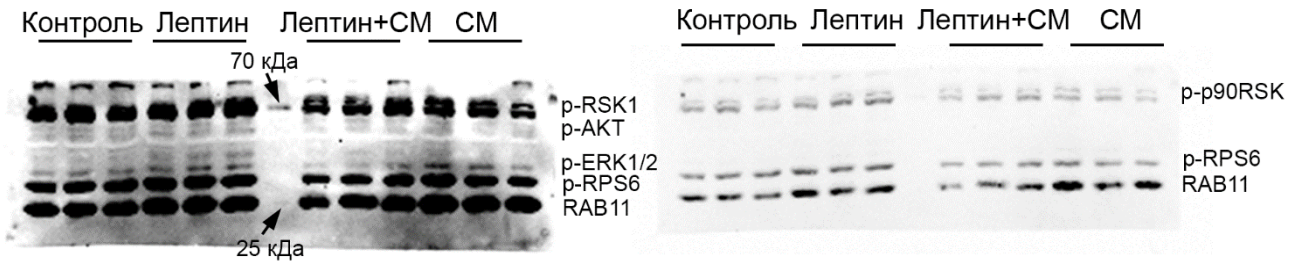

Рисунок S3. Уровни фосфорилированного ERK1/2 и RSK1 и в клетках Neuro2a, индуцированных лептином и СМ. Клетки Neuro2a стимулировали СМ (0,1 мкМ) в течение 1 ч, а затем лептином

(400 нг/мл) в течение 30 мин. Левое и правое изображения представляют один и тот же блот, но при более длительном и более коротком времени экспозиции.

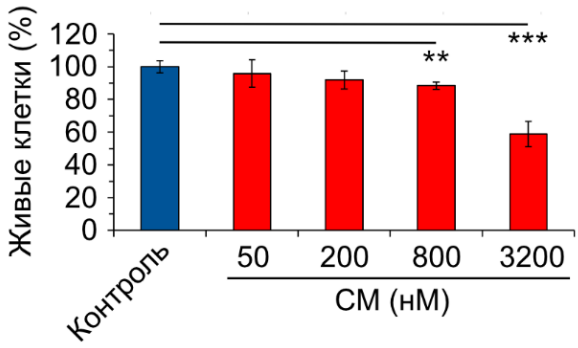

Рисунок S4. Цитотоксичность пМАС в отношении нетрансформированных фибробластов человека hFF3, оцененная с помощью МТТ-теста через 48 ч. Данные представлены как среднее значение ± SD. ** p < 0,01, *** p < 0,001.

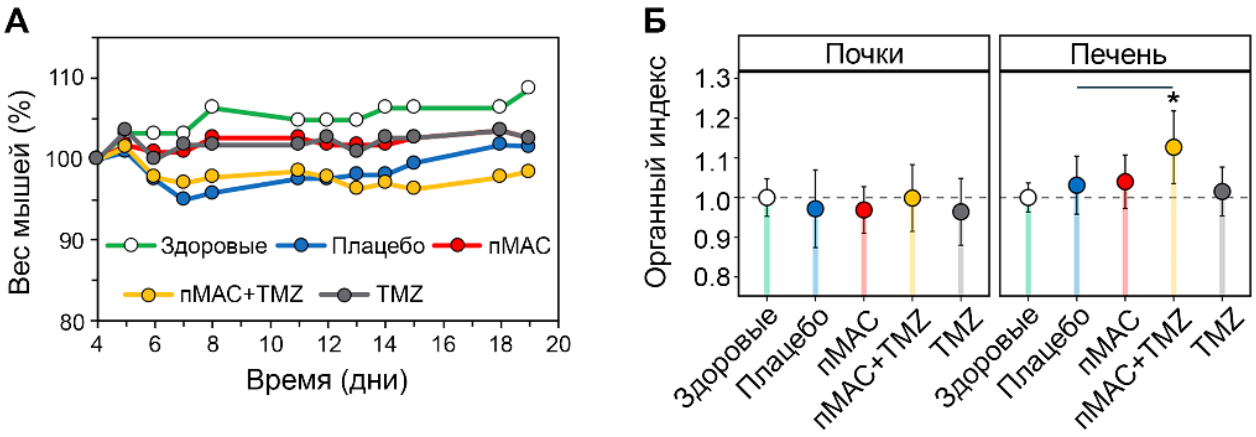

Рисунок S5. Оценка системной токсичности пМАС. (**А, Б**) Вес (**А**) и органные индексы (**Б**) мышей Nude, оцененные в конечной точке эксперимента *in vivo* (19-й день). В здоровых мышах не индуцировался опухолевый рост, и они не получали никакого лечения; всем остальным группам была проведена подкожная ксенотрансплантация клеток U87, и они получали лечение носителем (10% Твин-80, в/б), пМАС (20 мг/кг, в/б), TMZ (10 мг/кг, в/б) или комбинацией пМАС и TMZ. Данные представлены как среднее значение ± SD. * p < 0,05.

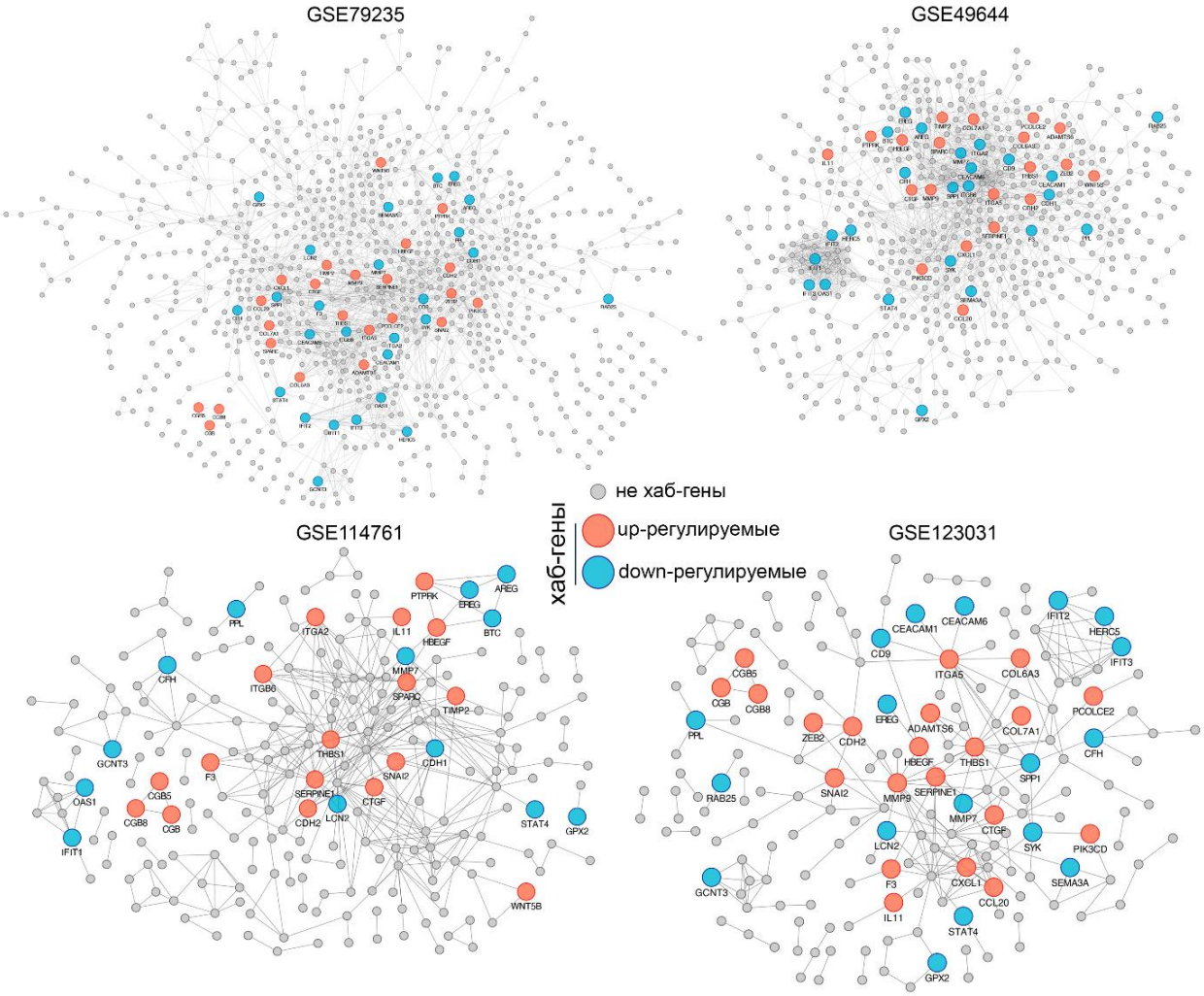

Рисунок S6. Генные сети ЭМП. Четыре генные сети построены на основе списков ДЭГ, полученных из четырех наборов данных РНК-микрочипов TGF-β1-индуцированных клеток АЛ, с использованием базы данных STRING и программы Cytoscape. В каждой сети были идентифицированы хаб-гены с помощью плагина CytoHubba, который оценивает 12 топологических критериев. Эти хабы представлены в виде больших кругов, цвета которых указывают направление изменения экспрессии при индукции TGF-β1 (up-регуляция – красный, down-регуляция – синий).

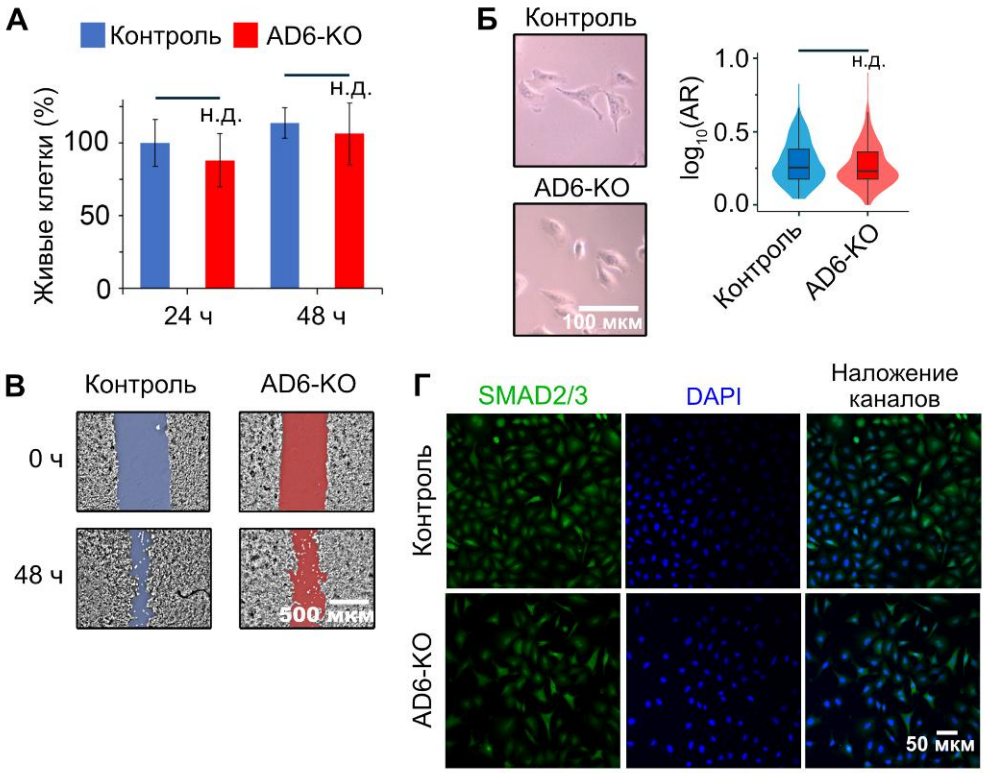

Рисунок S7. Влияние нокаута *ADAMTS6* на клеточные функции, связанные с ЭМП. Контроль – родительские клетки A549; AD6-KO – клетки A549 с нокаутом *ADAMTS6*. (**А**) Жизнеспособность клеток после 24 и 48 часов инкубации, оцененная с помощью МТТ-теста. (**Б**) Морфология клеток. Количественный анализ выполнен в программе ImageJ: AR – оценка вытянутости, соотношение большой и малой осей клеток. (**В**) Зарастание царапины на монослое A549 и монослое AD6-KO спустя 48 ч. (**Г**) ИФ-окрашивание SMAD2/3 (зеленый) и окрашивание ядер DAPI (синий). Данные представлены как среднее значение ± SD. Н.д. – статистически недостоверно ($p > 0,05$).

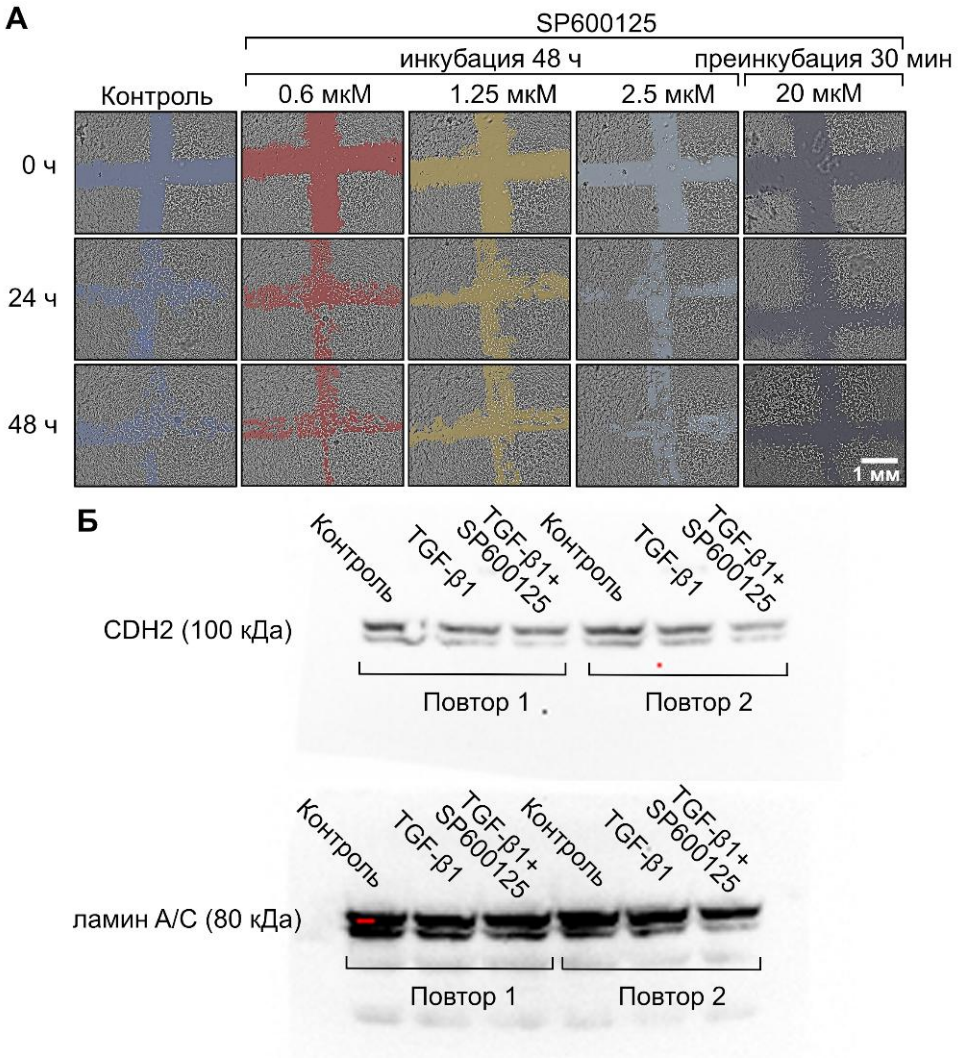

Рисунок S8. Влияние SP600125 на основные фенотипические проявления ПМП в клетках ГБ. (**А**) Зарастание царапины на монослое U87 после коинкубации с SP600125 (0,6 – 2,5 мкМ) в течение 48 ч, либо после предынкубации с SP600125 (20 мкМ) в течение 30 мин и последующей инкубации без соединения. (**Б**) Уровни мезенхимального белка CDH2 и ламина A/C, использованного в качестве контроля загрузки, в клетках U87, обработанных SP600125 и TGF-β1. Показаны два репрезентативных повтора.