

На правах рукописи



ОДАРЕНКО КИРИЛЛ

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО
ИНГИБИРОВАНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО
ПЕРЕХОДА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет».

Научный руководитель:

Марков Андрей Владимирович, к.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, с.н.с.

Официальные оппоненты:

Кулигина Елена Владимировна, к.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, с.н.с.

Пахарукова Мария Юрьевна, д.б.н.,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», зав. лабораторией, в.н.с.

Хвостов Михаил Владимирович, д.б.н., доцент,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, зав. лабораторией

Защита диссертации состоится «4» декабря 2026 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИХБФМ СО РАН и на сайте ИАС www.niboch.nsc.ru.

Автореферат разослан «30» октября 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук



Пестряков П. Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – обратимый процесс, в ходе которого клетки приобретают мезенхимально-подобный фенотип, характеризующийся повышенной инвазивностью и стволовыми свойствами. ЭМП ассоциирован с метастазированием и развитием лекарственной устойчивости в опухолях различного гистогенеза. В опухолях нервной системы, в частности при глиобластоме (ГБ) и нейробластоме (НБ), описаны специфические варианты ЭМП: пронеурально-мезенхимальный переход (ПМП) и норадренергическо-мезенхимальный переход (НМП) соответственно.

Разработка ингибиторов ЭМП и его опухолеспецифических вариантов представляет особую актуальность, поскольку клинически одобренные препараты, направленные на подавление этих переходов, отсутствуют. На основе ранее опубликованных данных можно выделить три перспективных направления разработки анти-ЭМП терапии:

1) Введение цианоенонового мотива в структуру природных пентациклических тритерпеноидов позволило получить соединения с противоопухолевой активностью, некоторые из которых способны подавлять фенотипическую пластичность опухолевых клеток. Так, производное олеаноловой кислоты CDDO-Ме ингибировало ЭМП клеток плоскоклеточной карциномы и ПМП клеток ГБ. Однако молекулярные механизмы его анти-ЭМП/ПМП активности остаются недостаточно изученными, а ограниченное проникновение через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) может затруднять его применение при опухолях центральной нервной системы. В НИОХ СО РАН ранее были синтезированы структурный аналог CDDO-Ме солоксолон метил (СМ) и его амидные производные, способные проникать через ГЭБ. Изучение влияния СМ и амидов солоксолонна на ЭМП/ПМП позволит расширить представления о фармакологическом профиле цианоенон-содержащих тритерпеноидов и оценить их потенциал в качестве ингибиторов этих переходов.

2) Регуляторные белки, вовлеченные в контроль ЭМП и его опухолеспецифических форм, представляют собой перспективные терапевтические мишени, однако многие из них остаются недостаточно изученными. К числу таких потенциальных регуляторов относятся адипокин лептин и внеклеточная протеаза ADAMTS6. Способность лептина индуцировать ЭМП показана на моделях эпителиальных опухолей, однако его влияние на клетки опухолей неэпителиального происхождения практически не изучено. Участие ADAMTS6 в индукции ЭМП показано лишь в клетках колоректального рака, тогда как ее роль в других типах опухолей остается неясной. Изучение влияния лептина и ADAMTS6 на ЭМП в опухолевых клетках различного происхождения позволит оценить их потенциал в качестве мишеней для анти-ЭМП терапии.

3) Накопленные данные об изменении транскриптома клеток под влиянием малых молекул позволяют прогнозировать их ЭМП-ингибирующую активность *in silico*. Метод connectivity map, основанный на сопоставлении

паттернов экспрессии генов, индуцированных малыми молекулами, с паттернами известных клеточных состояний, был ранее успешно использован для поиска ингибиторов ЭМП. 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 и его опухолеспецифических вариантов определяют актуальные направления исследований, продвижение в которых позволит приблизиться к расшифровке основ управления фенотипической пластичностью опухолевых клеток.

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

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

1. Оценить влияние солосолон 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 солосолон метила, содержащих в положении C-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 полученных результатов

Впервые установлено, что цианоенон-содержащие тритерпеноиды (на примере солосолон метила (СМ)) подавляют приобретение клетками A549 аденокарциномы легкого человека мезенхимального фенотипа, индуцированного трансформирующим ростовым фактором TGF- β 1.

Впервые описано влияние адипокина лептина на злокачественные характеристики клеток Neuro2a 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 солосолон метила. Лидерное соединение пара-метиланилид солосолон метила (пМАС) эффективно ингибирует TGF- β 1-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 A549 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 солоксолон ингибирует пронеурально-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 солоксолон проявляют высокую противоопухолевую активность на опухолевых моделях *in vivo*: солоксолон метил подавляет метастазирование клеток B16 меланомы мыши в легкие, а пара-метиланилид солоксолон 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 пронеурально-мезенхимальный 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 18βН-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 мышинных 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

За последние десять лет накоплен значительный объем данных, свидетельствующих о важной роли ЭМП в прогрессировании онкологических заболеваний. Несмотря на успехи низкомолекулярных ингибиторов ЭМП-ассоциированных сигнальных путей в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, в клинических испытаниях они не продемонстрировали значимого терапевтического эффекта. Исследования последних лет сосредоточены на поиске более эффективных стратегий воздействия на ЭМП с использованием анализа больших данных, компьютерного моделирования и рационального дизайна лекарств. Опираясь на ранее опубликованные данные, настоящая диссертационная работа предлагает новые подходы к направленному воздействию на ЭМП. Полученные результаты можно разделить на три категории, соответствующие основным стратегиям разработки ингибиторов ЭМП: (1) фенотип-ориентированный подход, (2) мишень-ориентированный подход и (3) перепрофилирование лекарственных препаратов.

1. Исследование анти-ЭМП эффекта цианоенон-содержащих тритерпеноидов

Фенотип-ориентированный подход предполагает скрининг библиотек соединений на клеточных моделях с оценкой их влияния на фенотипические проявления ЭМП. Ранее в ИХБФМ СО РАН была изучена библиотека цианоенон-несущих производных 18βН-глицирретовой кислоты (синтезированы в НИОХ СО РАН), включающая СМ (Рис. 1А) и ряд его амидных производных (Рис. 1Б). Было установлено, что данные соединения вызывают гибель опухолевых клеток в низких микромолярных концентрациях, а лидерное соединение СТА (9 на Рис. 1Б) эффективно накапливалось в мозге мышей и подавляло рост ГБ в гетеротопической модели *in vivo*.

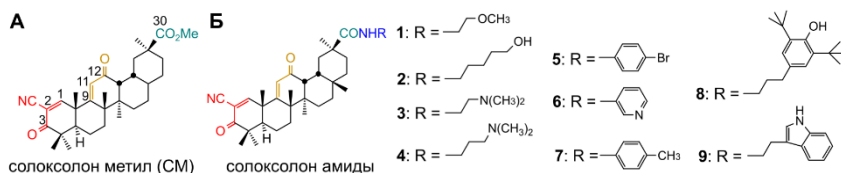


Рисунок 1. Цианоенон-содержащие пентациклические тритерпеноиды. (А) Структура СМ. (Б) Структура амидов солоксолон 1–9. Красным, оранжевым, синим и бирюзовым цветом показаны соответственно цианоеноновая группа кольца А, еноновая группа кольца С, амидная группа и метиловый эфир.

Первое направление настоящей диссертационной работы было посвящено фенотип-ориентированной оценке способности СМ и его амидных производных модулировать ЭМП и ПМП опухолевых клеток, а также влияния СМ на фенотипические изменения клеток нейробластомы, индуцированные лептином.

1.1. Оценка влияния СМ на ЭМП опухолевых клеток

Влияние СМ (Рис. 1А) на ЭМП было изучено *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах *in vitro* к клеткам А549 аденокарциномы легкого (АЛ) человека добавляли индуктор ЭМП TGF-β1 (50 нг/мл) и нетоксичную концентрацию СМ (0,5 мкМ), после чего через 48 ч анализировали ключевые фенотипические проявления, ассоциированные с ЭМП. Установлено, что TGF-β1 увеличивал среднее значение коэффициента вытянутости клеток (AR) (Рис. 2А) и их подвижность через пористую мембрану (Рис. 2Б) по сравнению с контролем, а также сдвигал профиль экспрессии маркеров ЭМП в сторону мезенхимального фенотипа: снижал уровень мРНК эпителиального гена *CDH1* и повышал уровни мРНК мезенхимальных генов *VIM* и *FN1* (Рис. 2Б). В свою очередь, СМ ингибировал приобретение TGFβ1-стимулированными клетками А549 мезенхимального фенотипа: тритерпеноид частично обращал вызванные TGF-β1 изменения клеточной морфологии (Рис. 2А), снижал клеточную подвижность практически до уровня нестимулированного контроля (Рис. 2Б), повышал экспрессию *CDH1* в 3,3 раза и снижал экспрессию *FN1* в 1,9 раза, не оказывая достоверного влияния на *VIM* (Рис. 2Б).

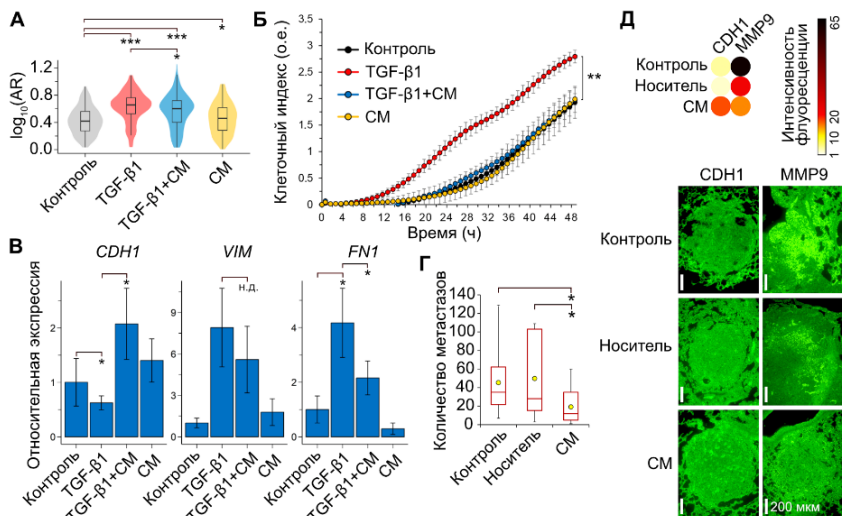


Рисунок 2. Ингибирование ЭМП под действием СМ. (А–В) Клетки A549 АЛ человека индуцировали TGF- β 1 (50 нг/мл) и СМ (0,5 мкМ) в течение 48 ч. (А) Вытянутость клеток (AR) – соотношение большой и малой осей клеток, определенное с помощью световой микроскопии. (Б) Миграция клеток, оцененная с помощью трансвелл-системы xCELLigence. (В) Экспрессия генов-маркеров ЭМП, оцененная методом RT-qPCR и нормализованная по гену домашнего хозяйства *GAPDH*. (Г, Д) Метастазирование меланомы B16 в легкие мышей: контроль – без терапии; носитель – 10% Твин-80 (в/б); СМ – СМ (25 мкг/кг, в/б). (Г) Количество поверхностных метастазов в легких, оцененное с помощью бинокулярного микроскопа. (Д) Уровни белков CDH1 и MMP9 в тканях метастазов, оцененные иммуногистохимически. Интенсивность флуоресценции нормировали относительно площади метастатического очага. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, н.д. – статистически недостоверно.

В эксперименте *in vivo* мышам линии C57Bl/6 внутривенно вводили клетки B16 меланомы мыши; начиная с 4-х суток после трансплантации животным дважды в неделю внутрибрюшинно (в/б) вводили СМ в дозе 25 мкг/кг в 10% Твин-80 (всего 6 инъекций); на 21-е сутки оценивали метастазирование – ключевой этап опухолевой прогрессии, регулируемый ЭМП. СМ снижал количество поверхностных метастазов в легких мышей в 2,4 раза, тогда как введение носителя (10% Твин-80) в отсутствие СМ подобного эффекта не вызывало (Рис. 2Г). Выраженность ЭМП в тканях метастазов оценивали иммуногистохимически. По сравнению с контролем СМ повышал уровень эпителиального маркера CDH1 и снижал уровень мезенхимального маркера MMP9 соответственно; эффект носителя оказался менее выраженным (Рис. 2Д). Полученные данные свидетельствуют о способности СМ подавлять ЭМП и снижать метастатический потенциал опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*.

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

Учитывая ранее показанную способность лептина индуцировать ЭМП в эпителиальных опухолях и поддерживать жизнеспособность клеток НБ, было

предположено, что данный адипокин может индуцировать переход клеток НБ в мезенхимальный фенотип. Однако эксперименты на клетках НБ мыши не подтвердили эту гипотезу. Хотя лептин (400 нг/мл) повышал метастатический потенциал клеток Neuro2a, о чем свидетельствовали снижение их адгезии к субстрату (пластику, коллагену и матригелю) и усиление подвижности (Рис. 3А, Б), фенотип клеток сдвигался в более эпителиально-подобное состояние, на что указывали повышение уровня эпителиального маркера TJP1 и снижение мезенхимального маркера VIM (Рис. 3В). При этом лептин активировал сигнальный путь ERK1/2, увеличивая уровень фосфорилирования ERK1/2 и ее эффектора RSK1 (Рис. 3Г). Таким образом, лептин индуцирует метастатический потенциал клеток НБ посредством механизма, независимого от ЭМП и, по крайней мере частично, опосредованного активацией пути Erk1/2.

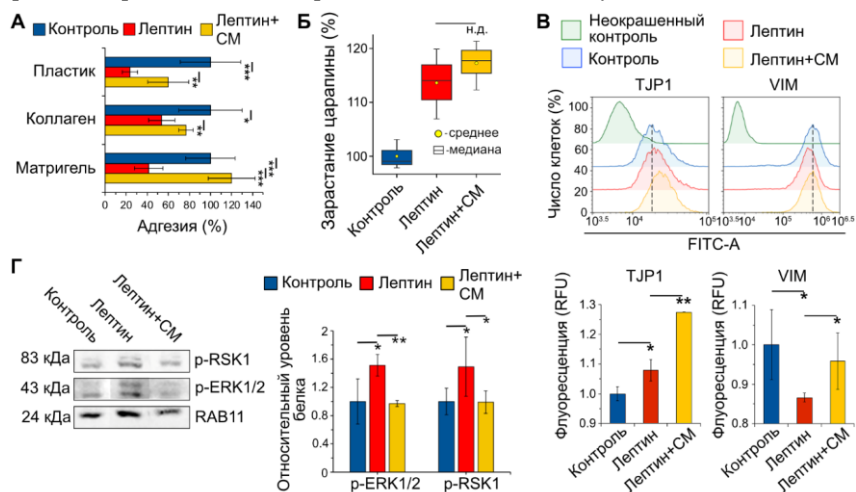


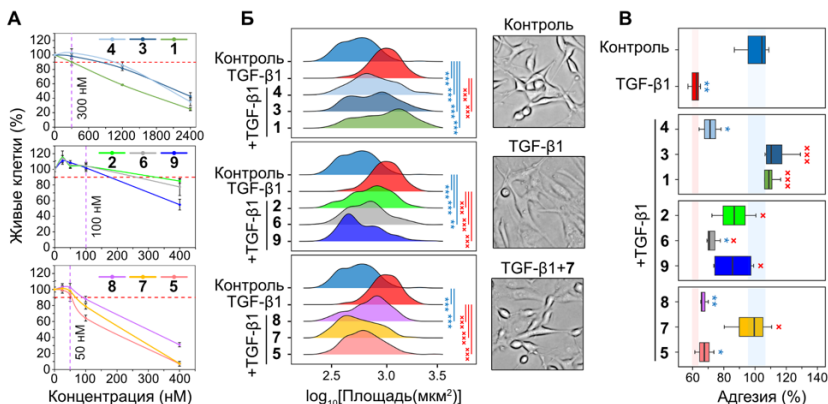
Рисунок 3. Влияние СМ на прометастатический эффект лептина. Клетки Neuro2a НБ мыши индуцировали лептином (400 нг/мл) и СМ (0,1 мкМ). (А) Адгезия клеток к матригелю, коллагену и культуральному пластику через 24 ч. (Б) Миграция клеток, оцененная с помощью теста зарастания царапины через 48 ч. (В) Уровни белков TJP1 и VIM, оцененные методом проточной цитометрии через 48 ч. (Г) Активация сигнальной оси ERK1/2/RSK1, оцененная Вестерн-блоттингом после 1 ч инкубации клеток с СМ и 30 мин – с лептином. Нормализация на контроль загрузки, белок RAB11. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, н.д. – статистически недостоверно.

СМ в нетоксичной концентрации 0,1 мкМ блокировал вызванное лептином снижение адгезивности клеток Neuro2a, однако не влиял на их подвижность (Рис. 3А, Б). На молекулярном уровне СМ предотвращал лептин-индуцированное снижение уровня VIM и подавлял активацию пути ERK1/2, одновременно потенцируя вызванное лептином повышение уровня TJP1 (Рис. 3В, Г). Таким образом, СМ дифференцированно модулировал лептин-индуцированные изменения в клетках Neuro2a, снижая их метастатический потенциал.

Полученные данные показывают, что СМ эффективно подавляет усиление подвижности опухолевых клеток, вызванное TGF- β 1, но не лептином (Рис. 2Б, 3Б). Вероятно, это связано с различиями в механизмах действия данных факторов: TGF- β 1 индуцирует ЭМП клеток АЛ, тогда как лептин модулирует фенотип клеток НБ независимо от ЭМП (Рис. 2, 3). Таким образом, СМ способен избирательно воздействовать на различные аспекты фенотипической пластичности опухолевых клеток, прежде всего на ЭМП-ассоциированные механизмы метастазирования. Полученные результаты обосновывают целесообразность дальнейшего изучения фенотип-модулирующих эффектов трипереноидов солоксолановой группы, в том числе в отношении ПМП клеток ГБ.

1.3. Поиск ингибиторов ПМП в библиотеке амидов солоксолана

Скрининг анти-ПМП потенциала амидов солоксолана (Рис. 1Б) проводили, оценивая их способность ингибировать вызванные TGF- β 1 изменения морфологии и межклеточной адгезии клеток ГБ. Для минимизации влияния цитотоксического действия соединений на результаты скрининга были определены их нетоксичные концентрации, снижавшие жизнеспособность клеток менее чем на 10%. Согласно данным МТТ-теста, амиды солоксолана были распределены на три группы в зависимости от выраженности цитотоксического действия в отношении клеток U87: соединения **1, 3 и 4** (группа 1) проявляли низкую, соединения **2, 6 и 9** (группа 2) – умеренную, а соединения **5, 7 и 8** (группа 3) – высокую цитотоксичность (Рис. 4А). Для последующих экспериментов были выбраны нетоксичные концентрации соединений, составлявшие 300 нМ, 100 нМ и 50 нМ для групп 1, 2 и 3 соответственно (Рис. 4А).



Рисунк 4. Скрининг библиотеки амидов солоксолана на ингибирующую активность в отношении ПМП. (А) Определение нетоксичных концентраций амидов солоксолана с помощью МТТ-теста. Фиолетовая пунктирная линия указывает на нетоксичную концентрацию соединений, снижающую жизнеспособность клеток U87 менее чем на 10% (красная пунктирная линия обозначает пороговое значение доли живых клеток в 90%). (Б, В) Оценка влияния амидов солоксолана на фенотипические проявления ПМП в клетках ГБ. Клетки U87 инкубировали с TGF- β 1 (50 нг/мл) и амидами солоксолана в нетоксичных концентрациях в

течение 48 ч. **(Б)** Морфологию клеток оценивали методом световой микроскопии; площадь клеток определяли с использованием программы ImageJ. **(В)** Межклеточную адгезию оценивали в трипсиновом тесте: клетки обрабатывали 5% TrypLE (рекомбинантным аналогом трипсина) в течение 3 мин, после чего открепившиеся клетки удаляли промывкой PBS, а адгезированные клетки окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. * – сравнение с контрольной группой, × – сравнение с TGF- β 1-индуцированной группой. */× $p < 0,05$, **/×× $p < 0,01$, ***/××× $p < 0,001$.

Инкубация клеток U87 в присутствии TGF- β 1 (50 нг/мл) приводила к увеличению распластывания (спредингу) клеток по дну лунки, что увеличивало их площадь на изображениях светового микроскопа на 76%. Добавление любого из амидов солоксолонa ослабляло этот эффект; при этом соединения **5**, **7** и **9** снижали спрединг клеток до контрольного уровня (Рис. 4Б). Инкубация с TGF- β 1 также снижала межклеточную адгезию на 38,5% по сравнению с контролем. Большинство амидов солоксолонa, за исключением **4**, **5** и **8**, значительно повышали межклеточную адгезию TGF- β 1-индуцированных клеток, при этом соединения **1**, **3** и **7** восстанавливали её до контрольного уровня (Рис. 4В). По результатам двух тестов лишь соединение **7** (пара-метиланилид солоксолонa (пМАС)) одновременно блокировало морфологические изменения и потерю межклеточной адгезии, вызванные TGF- β 1, 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.

Способность пМАС ингибировать ПМП была верифицирована с использованием расширенной панели фенотипических маркеров данного процесса в клетках ГБ. Для оценки миграционной активности клетки U87 предварительно инкубировали с TGF- β 1 и пМАС в течение 48 ч, после чего помещали в CIM-планшеты и в течение 72 ч регистрировали их проникновение через пористую мембрану с помощью системы xCELLigence. TGF- β 1 почти вдвое усиливал подвижность клеток U87, тогда как пМАС ослаблял этот эффект на 85,8%, возвращая миграционную активность почти к контрольному уровню (Рис. 5А). Инкубация клеток U87 с TGF- β 1 в течение 48 ч усиливала в них экспрессию мезенхимальных генов *CDH2*, *FN1* и *SNAI2*, однако добавление пМАС снижало эту активацию на 78,3%, 57,1% и 35,9% соответственно (Рис. 5Б). Хотя экспрессия пронейрального гена *OLIG2* под действием TGF- β 1 не изменялась, при добавлении пМАС отмечалось ее двукратное повышение (Рис. 5Б), что подтверждает анти-ПМП активность пМАС.

SMAD2/3 являются ключевыми медиаторами сигнального пути TGF- β 1: активируемые рецепторами TGF- β эти белки перемещаются в ядро и регулируют транскрипцию ПМП-ассоциированных генов. Конфокальная микроскопия показала, что TGF- β 1 индуцирует ядерную транслокацию SMAD2/3 в клетках U87 через 1 ч, в результате чего соотношение флуоресцентного сигнала в ядре и цитоплазме увеличивается в 3,3 раза (Рис. 5В). Однако предынкубация клеток с пМАС в течение 48 ч снижала TGF- β 1-индуцированное накопление SMAD2/3 в ядре на 68,9% (Рис. 5В). Эти

результаты свидетельствуют о том, что пМАС подавляет ПМП клеток ГБ за счет ингибирования сигнальной оси TGF- β 1/SMAD2/3.

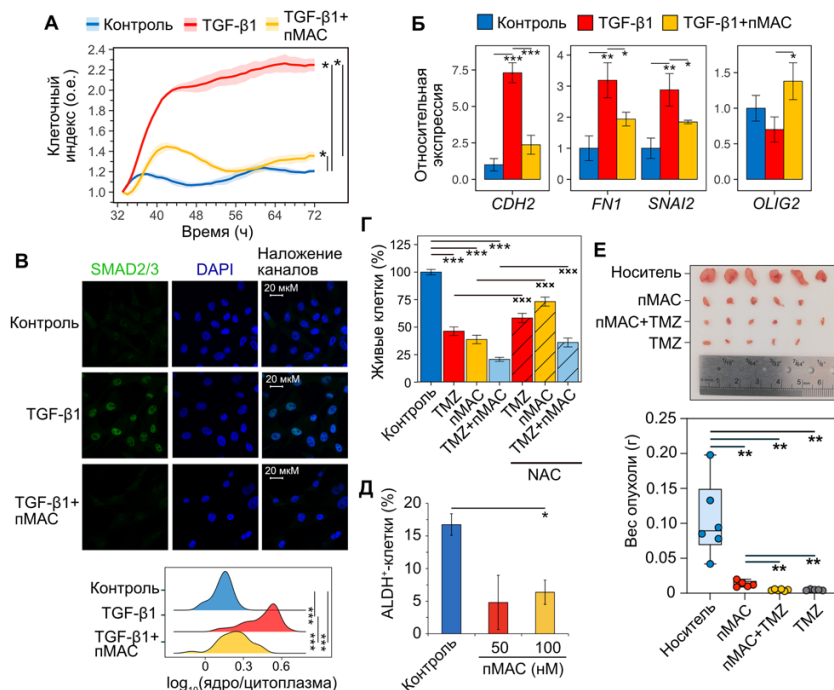


Рисунок 5. Ингибирование ПМП под действием пМАС. Клетки U87 инкубировали с TGF- β 1 (50 нг/мл) и пМАС (50 нМ) в течение 48 ч, после чего анализировали ПМП-ассоциированные фенотипические характеристики (А–Б). (А) Миграция клеток U87, оцененная в режиме реального времени с использованием трансвелл-системы xCELLigence. (Б) Экспрессия генов-маркеров ПМП в клетках U87, оцененная методом RT-qPCR и нормализованная по гену домашнего хозяйства *HPRT*. (В) Иммунофлуоресцентное окрашивание SMAD2/3 (зеленый) и окрашивание ядер DAPI (синий) в клетках U87 после инкубации с пМАС в течение 48 ч и последующей активации TGF- β 1 в течение 1 ч. Распределение SMAD2/3 в клетках U87 выражено как отношение ядерной флуоресценции к цитоплазматической. (Г) Влияние нейтрализации АФК с помощью NAC (2 мМ) на комбинированную цитотоксичность TMZ (125 мкМ) и пМАС (100 нМ) в клетках U87 через 72 ч. (Д) Активность ALDH в опухолевых сфероидсах U87 после 4 дней инкубации с пМАС (0–100 нМ), оцененная с помощью окрашивания AldeRed и проточной цитометрии. (Е) Масса подкожных опухолей U87 ГБ. Носитель (10% Твин-80, в/б), пМАС (20 мг/кг, в/б), TMZ (10 мг/кг, в/б), пМАС+TMZ (комбинированная терапия). Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. * – сравнение с контрольной группой, $\times$ – сравнение с соответствующей группой, обработанной NAC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $\times$ $p < 0,001$.

Приобретение клетками ГБ устойчивости к темозоломиду (TMZ) опосредуется несколькими молекулярными механизмами, включая подавление окислительного стресса и ПМП-ассоциированное усиление стволовых свойств. Поскольку в предыдущих исследованиях было показано, что цианоенон-содержащие тритерпеноиды индуцируют гибель опухолевых клеток за счет

усиления продукции активных форм кислорода (АФК), а в настоящей работе было установлено, что пМАС ингибирует ПМП, была выдвинута гипотеза, что пМАС может сенсibilизировать клетки ГБ к цитотоксическому действию TMZ.

Цитотоксичность TMZ (125 мкМ), пМАС (100 нМ) и их комбинации оценили в присутствии или отсутствии антиоксиданта N-ацетил-L-цистеина (NAC). Цитотоксичность комбинации пМАС и TMZ была выше, чем каждого из соединений по отдельности (Рис. 5Г); индекс синергии, рассчитанный по модели Highest Single Agent (HSA), составил 11,7, что указывает на то, что пМАС синергически усиливает эффект TMZ в отношении жизнеспособности клеток U87. В свою очередь, NAC снизил цитотоксичность TMZ, пМАС и их комбинации на 22,3%, 56,2% и 13,3% соответственно в клетках U87 (Рис. 5Г). Эти результаты демонстрируют, что повышение чувствительности клеток ГБ к TMZ под действием пМАС зависит от индукции АФК.

Ранее было показано, что стволовые свойства опухолевых клеток усиливаются при их культивировании в формате трехмерных культур, поэтому клетки U87 высевали на планшеты с низкоадгезионной поверхностью для формирования опухолевых сфероидов. После 4 дней инкубации доля клеток с высокой активностью альдегиддегидрогеназы (ALDH) – ключевого фермента, поддерживающего стволовой фенотип опухолевых клеток, – в составе опухолевых сфероидов составила 16,7%. Добавление нетоксичных концентраций пМАС (50–100 нМ) к формируемым опухолевым сфероидом снижало данный показатель в 2,3 раза (Рис. 5Д). Эти данные указывают на то, что пМАС подавляет стволовые свойства клеток ГБ, что также может играть важную роль в опосредуемой этим соединением хемосенсибилизации.

Влияние пМАС на прогрессию ГБ было далее изучено *in vivo*. Мышам линии Nude подкожно вводили клетки U87; начиная с 4-го дня после трансплантации животным трижды в неделю вводили пМАС (20 мг/кг, в/б; всего 7 инъекций) и/или ежедневно TMZ (10 мг/кг, в/б; всего 11 инъекций), а на 19-й день оценивали массу опухолевых узлов. Введение пМАС, TMZ и их комбинации привело к уменьшению массы опухолей на 87,4%, 95,4% и 95,6% соответственно по сравнению с введением 10% Твин-80, служившего носителем для обоих соединений (Рис. 5Е). Таким образом, пМАС эффективно подавляет рост ГБ *in vivo* как в монорежиме, так и в составе комбинированной терапии с TMZ.

Таким образом, эксперименты *in vitro* продемонстрировали способность СМ и пМАС ингибировать ЭМП и ПМП соответственно. Кроме того, оба соединения показали выраженный противоопухолевый эффект *in vivo*: СМ снижал метастатическое поражение легких меланомой B16, а пМАС подавлял рост ксенографтов ГБ. Эти данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале цианоенон-содержащих пентациклических тритерпеноидов и обосновывают целесообразность их дальнейшего изучения в качестве кандидатов на роль противоопухолевых агентов.

2. Исследование роли ADAMTS6 в ЭМП клеток аденокарциномы легкого человека

Мишень-ориентированный подход к разработке ингибиторов ЭМП основан на селективном подавлении белков, регулирующих данный процесс. Недавно было показано, что протеазы ADAMTS1/2/4/6/12/16 стимулируют ЭМП в опухолях различного гистогенеза. Низкомолекулярные ингибиторы ADAMTS1 эффективно подавляли метастазирование АЛ в доклинических испытаниях, что свидетельствует о перспективности семейства ADAMTS как терапевтических мишеней. Однако разработку таких ингибиторов затрудняет недостаточная изученность ADAMTS в контексте фенотипической пластичности опухолевых клеток. В частности, хотя ЭМП в клетках АЛ сопровождается повышением экспрессии гена *ADAMTS6*, роль кодируемой им протеазы в регуляции этого процесса оставалась не установленной.

В рамках второго направления настоящей работы позиция гена *ADAMTS6* в ЭМП-ассоциированном регуломе была изучена *in silico*. Кроме того, роль *ADAMTS6* в регуляции ЭМП-ассоциированных фенотипических характеристик была верифицирована *in vitro* с помощью нокаутной модели.

2.1. Оценка регуляторного потенциала ADAMTS6 *in silico*

Анализ трех наборов данных кДНК-микрочипирования (GSE79235, GSE49644 и GSE123031) показал более чем четырехкратное увеличение экспрессии *ADAMTS6* в TGF- β 1-стимулированных клетках АЛ (Рис. 6А), что свидетельствует о чувствительности данного гена к индукции ЭМП.

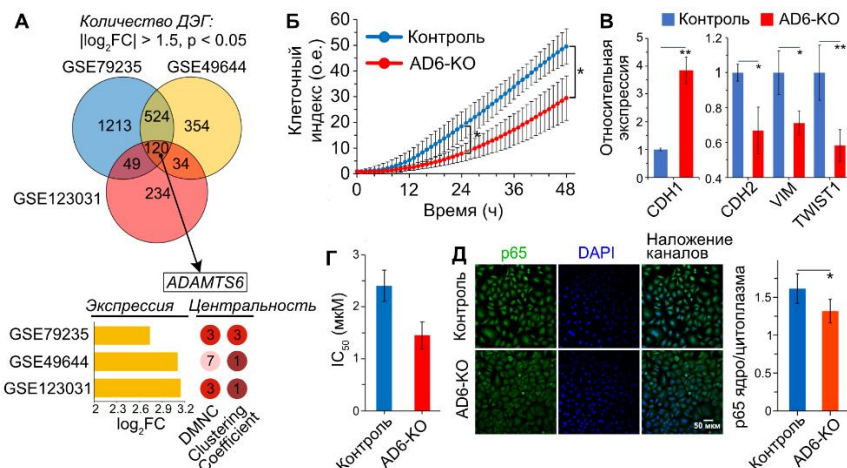


Рисунок 6. Исследование связи *ADAMTS6* с ЭМП в клетках АЛ. (А) *In silico* анализ регуляторной роли *ADAMTS6* в процессе ЭМП. Диаграмма Венна отображает ДЭГ, выявленные в TGF- β 1-индуцированных клетках АЛ человека при анализе трех наборов данных кДНК-микрочипов. Столбчатая диаграмма показывает кратность изменения экспрессии *ADAMTS6* (fold change, FC). Тепловая карта показывает ранг *ADAMTS6* среди выявленных ДЭГ по метрикам центральности DMNC и ClusteringCoefficient, рассчитанным при анализе трех генных сетей. (Б–Д) Влияние *ADAMTS6* на фенотипические характеристики клеток АЛ, регулируемые ЭМП. Контроль – родительские клетки A549; AD6-KO – клетки A549 с

нокаутом *ADAMTS6*. (Б) Миграция клеток, оцененная в режиме реального времени с использованием трансвелл-системы xCELLigence. (В) Относительная экспрессия эпителиального маркера *CDH1* и мезенхимальных маркеров *CDH2*, *VIM* и *TWIST1*, оцененная с помощью RT-qPCR и нормализованная по экспрессии *GAPDH*. (Г) Цитотоксичность DOX, оцененная с помощью МТТ-теста. IC_{50} – концентрация DOX, вызывающая гибель 50% клеток по сравнению с необработанным контролем. (Д) Иммунофлуоресцентное окрашивание NF- κ B p65 (зеленый) и клеточных ядер DAPI (синий). Распределение p65 в клетках выражено как отношение ядерной флуоресценции к цитоплазматической. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

На основе дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) для каждого набора транскриптомных данных были построены генные сети с использованием базы данных STRING. Топологический анализ полученных сетей с помощью плагина CytoHubba в программе Cytoscape показал, что среди ДЭГ *ADAMTS6* характеризуется одними из наиболее высоких значений плотности максимальной компоненты соседства (DMNC; метрика, выявляющая узлы, окруженные плотными кластерами генов-соседей) и коэффициента кластеризации (ClusteringCoefficient; показатель общей связности соседей узла). Это указывает на координирующую роль *ADAMTS6* в генных сетях, ассоциированных с ЭМП (Рис. 6А), и свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения *ADAMTS6* как мишени для анти-ЭМП терапии.

2.2. Исследование эффекта нокаута *ADAMTS6* на запуск ЭМП в клетках аденокарциномы легкого человека *in vitro*

На следующем этапе было экспериментально изучено, способно ли ингибирование *ADAMTS6* модулировать ЭМП в клетках АЛ. Поскольку в настоящее время отсутствуют селективные ингибиторы *ADAMTS6*, для решения данной задачи был использован нокаут гена *ADAMTS6*.

Анализ миграционной активности клеток А549 с CRISPS/Cas9-индуцированным нокаутом гена *ADAMTS6* (далее AD6-KO) и клеток родительской линии А549 показал, что клетки AD6-KO характеризовались достоверно более низкой подвижностью через пористую мембрану по сравнению с клетками А549 (Рис. 6Б), что указывает на снижение их метастатического потенциала в результате нокаута *ADAMTS6*. В соответствии с этим в клетках AD6-KO наблюдалось 3,8-кратное повышение экспрессии эпителиального гена *CDH1* и примерно 1,5-кратное снижение экспрессии мезенхимальных генов *CDH2*, *VIM* и *TWIST1* по сравнению с клетками А549 (Рис. 6В).

Поскольку ЭМП также способствует снижению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии, дополнительно была оценена чувствительность клеток AD6-KO к цитотоксическому действию доксорубина (DOX). Как показано на Рис. 6Г, нокаут *ADAMTS6* приводил к снижению значения IC_{50} для DOX, что свидетельствует о повышении химиочувствительности клеток AD6-KO.

Таким образом, нокаут *ADAMTS6* сдвигал фенотип клеток АЛ в сторону эпителиального, снижая их метастатический потенциал и устойчивость к DOX. Полученные результаты экспериментально подтверждают выявленную *in silico* ключевую роль *ADAMTS6* в регуляции ЭМП в клетках АЛ (Рис. 6А).

Ранее было показано, что ADAMTS6 индуцирует ЭМП в клетках рака толстой кишки через сигнальный путь NF-κB. В соответствии с этим конфокальная микроскопия выявила снижение соотношения ядерной и цитоплазматической фракций p65 NF-κB в клетках AD6-KO по сравнению с контрольными клетками A549 (Рис. 6Д). Эти данные указывают на то, что нокаут ADAMTS6 подавляет фенотипические проявления ЭМП в клетках АЛ, по крайней мере частично, за счёт ингибирования пути NF-κB.

Таким образом, комплексное исследование показало, что ADAMTS6 играет важную роль в регуляции ЭМП в клетках АЛ, что определяет кодируемую им протеазу в качестве перспективной мишени для мишень-ориентированного поиска ингибиторов ЭМП.

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

Методы *in silico*, в частности connectivity map, в настоящее время широко применяются для перепрофилирования известных лекарственных препаратов в качестве ингибиторов ЭМП. Однако ранее эти методы не использовались для поиска ингибиторов ПМП, и ключевая задача заключается в их адаптации к молекулярно-генетическим особенностям клеток ГБ.

В рамках третьего направления диссертационной работы *in silico* перепрофилирование было впервые применено для поиска ингибиторов ПМП. Для этого на основе транскриптомных данных и анализа генных сетей была сформирована генная сигнатура ПМП. Затем с помощью метода connectivity map и хемоинформатических подходов был найден лекарственный кандидат с отрицательной связностью к этой сигнатуре, способный проникать через ГЭБ. Выраженная ПМП-ингибирующая активность выявленного соединения была далее подтверждена *in vitro*.

3.1. Определение генной сигнатуры ПМП

Для идентификации генной сигнатуры ПМП был выполнен анализ транскриптомных профилей опухолевой ткани пациентов с ГБ из базы данных TCGA-GBM. В качестве количественной меры выраженности ПМП (PMTscore) использовали разность показателей обогащения референсных мезенхимальной и пронеуральной генных сигнатур, рассчитанных методом GSVA. Используя метод WGCNA, транскриптомные данные были кластеризованы на 21 модуль коэкспрессирующихся генов (Рис. 7А). Интегральную активность каждого модуля в отдельном опухолевом образце характеризовали значением его первой главной компоненты (eigengene). Последующий корреляционный анализ выявил наиболее сильную положительную связь PMTscore с eigengene «синего модуля» ($R = 0,73$; Рис. 7Б), что свидетельствует о координированной активации входящих в него генов в ходе индукции ПМП. Данный модуль, включающий 694 гена, был отобран в качестве кандидата для дальнейшего углубленного анализа.

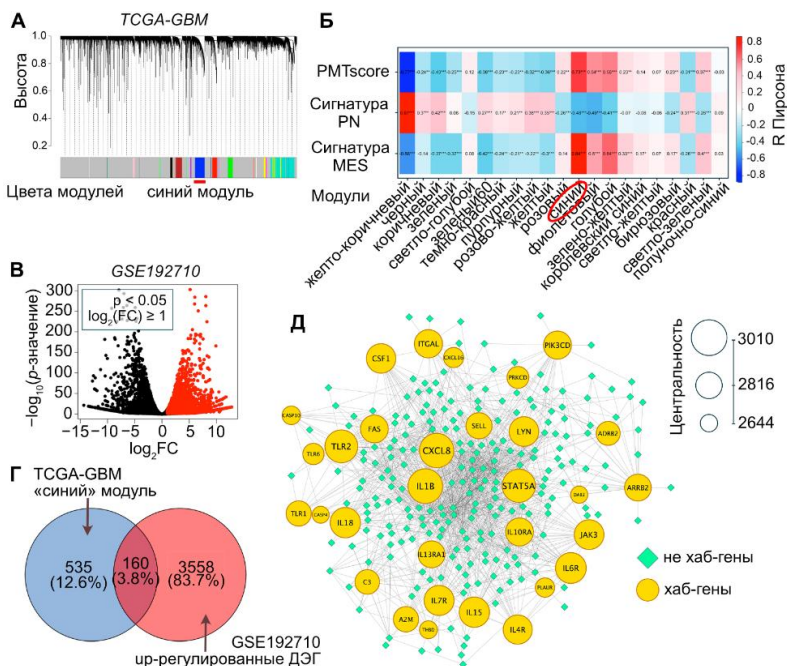


Рисунок 7. Идентификация генной сигнатуры ПМП. (А) Кластерная дендрограмма опухолей TCGA-GBM, сконструированная с помощью WGCNA. Цветами обозначены модули коэкспрессирующихся генов; красная линия указывает на «синий» модуль, для которого в ходе последующего анализа была показана ассоциация с ПМП. (Б) 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 между мезенхимальными клетками ГБ G7 и пронеуральными клетками ГБ E2 из набора данных GSE192710. Гены, экспрессия которых значительно повышена ($p < 0,05$ и $\log_2 FC \geq 1$), представлены красными точками. (Г) Пересечение ур-регулируемых ДЭГ из набора данных GSE192710 и генов из ПМП-ассоциированного «синего» модуля WGCNA. (Д) Идентификация хаб-генов. На основе ур-регулируемых 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 транскриптомные профили опухолевой ткани пациентов включают сигналы не только от злокачественных клеток, и от элементов опухолевого микроокружения (например, иммунных клеток и нейронов), был выполнен дополнительный этап фильтрации для отбора генов, ассоциированных исключительно с клетками ГБ. Для этого был использован независимый набор данных RNA-seq клеток ГБ *in vitro* (GSE192710). Анализ дифференциальной экспрессии выявил 3718 ДЭГ с повышенной экспрессией в клетках G7 (мезенхимальный подтип) по сравнению с клетками E2 (пронеуральный подтип; Рис. 7В). Пересечение данного списка с генами «синего» модуля позволило идентифицировать 160 генов, специфически

ассоциированных с опухолевыми клетками и одновременно вовлеченных в ПМП-ассоциированные коэкспрессионные программы *in vivo* (Рис. 7Г).

Для выделения генов, наиболее значимых в регуляторном отношении, был проведен анализ их топологических характеристик в генной ассоциативной сети, построенной на основе ир-регулируемых ДЭГ из GSE192710. Среди 160 отфильтрованных генов был идентифицирован 31 узловой ген (хаб-ген), занимающий центральное положение в сети и, следовательно, обладающий высоким регуляторным потенциалом (Рис. 7Д). Выявленные 31 хаб-ген были объединены в финальную генную сигнатуру ПМП, которая далее была использована для поиска ингибиторов ПМП методом *connectivity map*.

3.2. *In silico* перепрофилирование с использованием подхода *connectivity map*

Анализ *connectivity map* был выполнен на платформе CLUE с использованием в качестве запроса идентифицированной 31-генной сигнатуры ПМП. В результате анализа было отобрано 120 соединений-кандидатов, демонстрирующих отрицательный индекс связности с этой сигнатурой. Данный профиль указывает на то, что воздействие этих соединений индуцирует транскриптомные изменения, противоположные патологическим, что свидетельствует об их потенциальной способности подавлять ПМП.

Учитывая, что для эффективной терапии ГБ ингибиторы ПМП должны достигать паренхимы головного мозга, был проведен дополнительный этап фильтрация соединений-кандидатов по их способности преодолевать ГЭБ с использованием хемоинформатических платформ AlzPlatform и PreADMET. Корректность предсказательных моделей проверялась на референсных препаратах: DOX, обладающем низкой способностью к преодолению ГЭБ, и TMZ, характеризующемся высоким проникновением через данный барьер. В результате фильтрации из 120 исходных кандидатов было отобрано 59 соединений, прогнозная способность которых к преодолению ГЭБ оказалась сопоставима с таковой у TMZ или превышала ее (Рис. 8А).

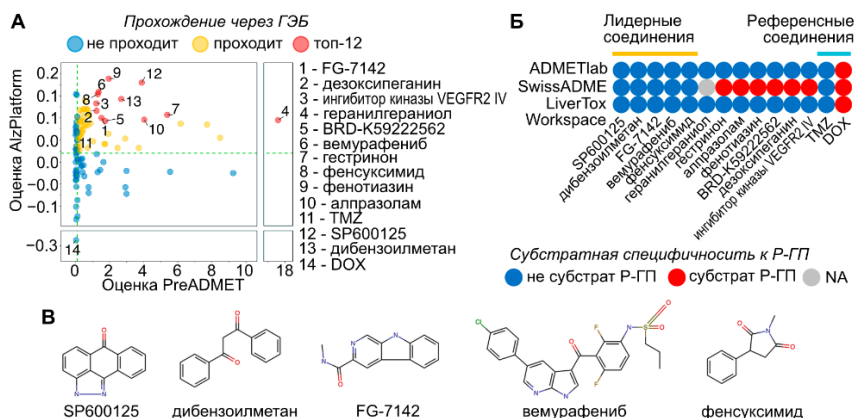


Рисунок 8. *In silico* перепрофилирование низкомолекулярных соединений для направленного ингибирования ПМП. (А) Предсказание способности преодолевать ГЭБ для соединений-

кандидатов с использованием платформ AlzPlatform и PreADMET. TMZ и DOX служат соответственно положительным и отрицательным контролями. (Б) Оценка вероятности того, что соединения-кандидаты являются субстратами Р-гликопротеина (Р-ГП), с использованием платформ LiverTox Workspace, SwissADME и ADMETlab. DOX и TMZ служат соответственно положительным и отрицательным контролем субстратной принадлежности к Р-ГП. (В) Химические структуры соединений-лидеров.

Поскольку Р-гликопротеин (Р-ГП) является наиболее значимым эффлюксным насосом в ГЭБ, ограничивающим эффективное накопление низкомолекулярных препаратов в мозге, дополнительно было оценено, являются ли его субстратами 12 молекул-лидеров, обладающих наивысшей предсказанной ГЭБ-проникающей способностью (Рис. 8А; 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 фенсуксими́д, не являются субстратами для Р-ГП (Рис. 8Б, В). ПМП-модулирующий эффект выявленных соединений-лидеров представляет большой интерес для будущих исследований. В настоящей работе эффект на ПМП был далее верифицирован для одного из лидеров – антрапиразола SP600125.

3.3. Исследование способности SP600125 ингибировать ПМП клеток глиобластомы человека *in vitro*

Ингибирующая активность SP600125 в отношении ПМП была изучена *in vitro* на клетках U87 ГБ человека в условиях воздействия ключевых факторов микроокружения, индуцирующих данный переход, – TGF-β1 и гипоксии.

Методом световой микроскопии установлено, что инкубация с TGF-β1 (50 нг/мл) в течение 48 ч индуцировала выраженные морфологические изменения клеток U87, характеризующиеся увеличением их коэффициента вытянутости (AR) на 37,5% и площади 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 статистически значимого влияния на AR (Рис. 9А).

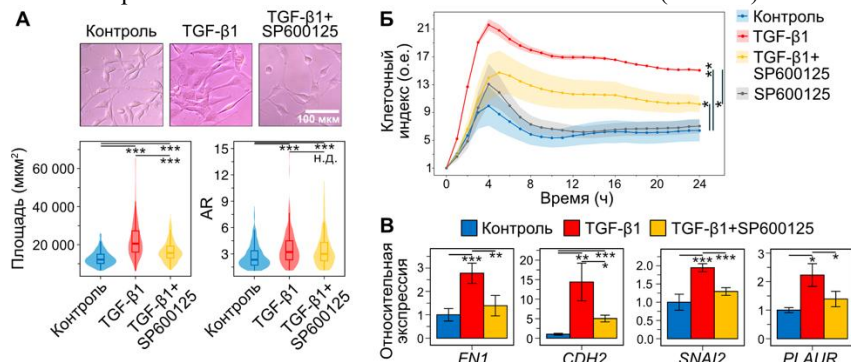


Рисунок 9. Ингибирование TGF-β1-индуцированного ПМП под действием SP600125. Клетки U87 предынкубировали 30 мин с SP600125 (20 мкМ), инкубировали с TGF-β1 (50 нг/мл) в течение 48 ч, после чего оценивали ПМП-ассоциированные фенотипические проявления. (А)

Морфология клеток U87, оцененная с помощью световой микроскопии. На графиках показано распределение клеток по площади и показателю вытянутости (AR). (Б) Миграция клеток, оцененная в режиме реального времени с использованием трансвелл-системы xCELLigence. (В) Относительная экспрессия мезенхимальных генов, измеренная методом RT-qPCR и нормализованная по гену домашнего хозяйства *HPRT*. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, н.д. – статистически недостоверно.

В трансвелл-анализе показано, что TGF- β 1 усиливал миграцию клеток U87 через пористую мембрану в 2,4 раза по сравнению с контролем, тогда как предынкубация с SP600125 снижала этот показатель на 32,4%. Примечательно, что в отсутствие стимуляции TGF- β 1 SP600125 не оказывал существенного влияния на клеточную подвижность (Рис. 9Б). Эти результаты свидетельствуют о том, что SP600125 ослабляет фенотипические проявления TGF- β 1-индуцированного ПМП в клетках U87.

Кроме того, было проанализировано влияние SP600125 на уровень молекулярных маркеров мезенхимального фенотипа в TGF- β 1-индуцированных клетках U87. TGF- β 1 увеличивал экспрессию *FN1*, *CDH2*, *SNAI2* и *PLAUR* в 2,8, 14,4, 1,9 и 2,2 раза соответственно по сравнению с контролем через 48 ч. Однако предынкубация клеток с SP600125 сохраняла экспрессию данных генов на уровне, близком к нестимулированному контролю (Рис. 9В).

Далее с целью оценки способности SP600125 ингибировать ПМП в условиях гипоксии опухолевые клетки обрабатывали хлоридом кобальта (CoCl_2). CoCl_2 ингибирует HIF-пролилгидроксилазы, предотвращая деградацию HIF-1 α , что позволяет моделировать *in vitro* клеточный ответ на гипоксию. Инкубация клеток U87 в присутствии CoCl_2 (400 мкМ) в течение 48 ч вызывала выраженные морфологические изменения, включая увеличение AR и площади клеток на 54,8% и 33,9% соответственно по сравнению с контролем. Предынкубация с SP600125 снижала эффект CoCl_2 на вытянутость клеток, уменьшая AR на 20,2%, при этом площадь клеток статистически значимо не изменялась (Рис. 10А).

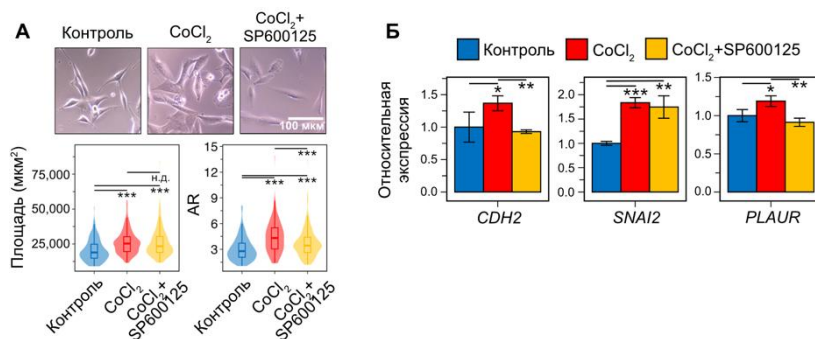


Рисунок 10. Ингибирование гипоксия-индуцированного ПМП под действием SP600125. Клетки U87 предынкубировали 30 мин с SP600125 (20 мкМ), инкубировали с CoCl_2 (миметик гипоксии; 400 мкМ) в течение 48 ч, после чего оценивали ПМП-ассоциированные фенотипические проявления. (А) Морфология клеток U87, оцененная с помощью световой микроскопии. На графиках показано распределение клеток по площади и показателю

вытянутости (AR). (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*. Данные представлены как среднее значение $\pm$ SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, н.д. – статистически недостоверно.

Кроме того, CoCl_2 достоверно повышал экспрессию мезенхимальных генов *CDH2*, *SNAI2* и *PLAUR* (Рис. 10Б), хотя амплитуда данной индукции оказалась менее выраженной по сравнению с TGF- β 1-стимулированной *in vitro* моделью (Рис. 9Б). SP600125 снижал CoCl_2 -индуцированную гиперэкспрессию *CDH2* и *PLAUR*, не влияя при этом на экспрессию *SNAI2* (Рис. 10Б).

Таким образом, проведенные *in vitro* эксперименты подтвердили способность SP600125 эффективно ингибировать ПМП, что согласуется с результатами предшествующего *in silico* анализа. Несмотря на определенные различия в индукции ПМП под действием TGF- β 1 и CoCl_2 , соединение SP600125 эффективно предотвращало приобретение клетками ГБ ключевых признаков мезенхимального фенотипа в обеих моделях, включая изменение морфологии, усиление миграции и повышение экспрессии мезенхимальных генов.

Заключение

Проведенное исследование выявило новые молекулярные мишени и фармакологические агенты для ингибирования ЭМП, которые могут быть применены в терапии онкологических заболеваний.

Во-первых, с помощью фенотип-ориентированного подхода было установлено, что СМ эффективно подавляет TGF- β -индуцированный ЭМП клеток АЛ. Это позволяет рассматривать СМ как структурную платформу для разработки корректоров ЭМП-подобных процессов в опухолях разного гистогенеза. Отсутствие влияния СМ на лептин-индуцированную миграцию клеток НБ может свидетельствовать об избирательности его действия, ограниченной TGF- β -ассоциированными сигнальными путями. В согласии с этим, пМАС (производное СМ) подавляет ПМП клеток ГБ за счет ингибирования оси TGF- β /SMAD2/3. Кроме того, пМАС повышает чувствительность клеток ГБ к TMZ, усиливая продукцию АФК и подавляя стволовой фенотип. Противоопухолевый потенциал СМ и пМАС подтвержден на мышинных моделях *in vivo*.

Во-вторых, в рамках мишень-ориентированного поиска с применением *in silico* анализа была идентифицирована протеаза ADAMTS6 как новая мишень для анти-ЭМП терапии АЛ. Нокаут гена *ADAMTS6* в клетках АЛ сопровождается снижением экспрессии мезенхимальных генов и подавлением миграционного потенциала посредством ингибирования сигнального пути NF- κ B. Следовательно, ингибирование ADAMTS6 является перспективной стратегией подавления ЭМП, что обосновывает целесообразность разработки селективных ингибиторов данной протеазы для терапии АЛ.

В-третьих, впервые продемонстрирована принципиальная возможность адаптации метода connectivity map для поиска ингибиторов ПМП. С помощью данного подхода выявлена ПМП-ингибирующая активность у антрапиразола

SP600125, которая затем была экспериментально подтверждена на клеточных моделях ПМП, индуцированного TGF- β и химической гипоксией (CoCl₂).

Таким образом, полученные результаты раскрывают новые стратегии фармакологического контроля фенотипической пластичности опухолевых клеток и создают научную основу для разработки противоопухолевых средств, направленных на снижение метастатического потенциала и преодоление лекарственной устойчивости.

ВЫВОДЫ

1. Полусинтетические тритерпеноиды солоксолон метил и пара-метиланилид солоксолон являются перспективными противоопухолевыми агентами, модулирующими фенотипическую пластичность опухолевых клеток:
 - 1.1. Солоксолон метил ингибирует TGF- β 1-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 солоксолон блокирует пронейрально-мезенхимальный переход клеток U87 глиобластомы человека, индуцированный TGF- β 1, 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 доксорубину *in vitro*, что ассоциировано с подавлением сигнального пути NF- κ B.
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- β 1 и хлоридом кобальта.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. Odarenko K.V., Matveeva A.M., Stepanov G.A., Zenkova M.A., Markov A.V. Deciphering the Role of ADAMTS6 in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Lung Adenocarcinoma Cells // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – № 24. – P. 11850. DOI: 10.3390/ijms262411850.
2. Markov A.V., Odarenko K.V., Sen'kova A.V., Salomatina O.V., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A. Cyano Enone-Bearing Triterpenoid Soloxolone Methyl Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Lung Adenocarcinoma Cells In Vitro and Metastasis of Murine Melanoma In Vivo // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 24. – P. 5925. DOI: 10.3390/molecules25245925.
3. Odarenko K.V., Sen'kova A.V., Salomatina O.V., Markov O.V., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A., Markov A.V. Soloxolone para-methylanilide effectively suppresses aggressive phenotype of glioblastoma cells including TGF- β 1-induced glial-mesenchymal transition in vitro and inhibits growth of U87 glioblastoma xenografts in mice // Frontiers in Pharmacology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1428924. DOI: 10.3389/fphar.2024.1428924.
4. Odarenko K.V., Salomatina O.V., Chernikov I.V., Salakhutdinov N.F., Zenkova M.A., Markov A.V. Soloxolone Methyl Reduces the Stimulatory Effect of Leptin on the Aggressive Phenotype of Murine Neuro2a Neuroblastoma Cells via the MAPK/ERK1/2 Pathway // Pharmaceuticals. – 2023. – Vol. 16. – № 10. – P. 1369. DOI: 10.3390/ph16101369.
5. Odarenko K.V., Zenkova M.A., Markov A.V. Transcriptomic-Driven Drug Repurposing Reveals SP600125 as a Promising Drug Candidate for the Treatment of Glial-Mesenchymal Transition in Glioblastoma // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – № 19. – P. 9772. DOI: 10.3390/ijms26199772.
6. 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. DOI: 10.3390/ijms242417325.

Работа выполнена при поддержке бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН (проекты № АААА-А17-117020210024-8, № 121031300044-5 и № 125012300659-6) и грантов РНФ № 17-75-20120, № 19-74-30011 и № 23-14-00374.