

УДК 577.19

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПОТЕНЦИАЛА СОЛОКСОЛОН ТРИПТАМИДА В ОТНОШЕНИИ МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ С ПОМОЩЬЮ *in silico, in vitro* И *in vivo* ПОДХОДОВ

© 2023 А.В. Марков*, К.В. Одаренко, А.В. Сенькова, А.А. Ильина, М.А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: andmrkv@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2023

После доработки 13.03.2023

Принята к публикации 03.04.2023

Мультиформная глиобластома (МГБ) представляет собой крайне агрессивное онкологическое заболевание, характеризующееся неконтролируемым диффузным ростом, развитием резистентности к радио- и химиотерапии и высокой вероятностью рецидивов, что определяет низкую выживаемость пациентов с МГБ. Учитывая большое количество сигнальных путей, задействованных в регуляции патогенеза МГБ, разработка новых антиглиобластомных препаратов на основе мультитаргетных природных метаболитов является перспективным направлением исследований. В настоящей работе изучен противоопухолевый потенциал полусинтетического тритерпеноида солоксолон триптамида (СТА) в отношении клеток глиобластомы человека U87. Было установлено, что СТА эффективно блокирует пролиферацию клеток U87 как в 2D-, так и в 3D-культуре *in vitro*, усиливает адгезивные свойства опухолевых клеток и проявляет цитотоксическое действие синергично с темозоломидом. С помощью подходов компьютерной биологии установлено, что выраженная антиглиобластомная активность СТА может быть обусловлена его прямым взаимодействием с EGFR, ERBB2 и AKT1, играющими важную роль в регуляции злокачественности МГБ. Помимо прямого действия на клетки U87, СТА оказывал нормализующее действие на опухолевое микроокружение на мышинной гетеротопической ксенографтной модели глиобластомы U87, подавляя развитие сети незрелых тонкостенных кровеносных сосудов и продукцию эластана в опухолевой ткани. Полученные данные позволяют предложить СТА в качестве перспективного антиглиобластомного кандидата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мультиформная глиобластома, цианоеноновый фармакофор, пентациклические тритерпеноиды, сфероиды, ангиогенез, синергичность, молекулярный докинг, геномные сети, опухолевое микроокружение.

DOI: 10.31857/S0320972523070126, EDN: FYGZSR

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, мультиформная глиобластома (МГБ) представляет собой одно из наиболее агрессивных неопластических заболеваний головного мозга, распространенность которого составляет примерно 1 случай на 100 000 населения в год [1]. Несмотря на получение медицинской помощи в полном объеме, включающем максимальную резекцию опухоли, лучевое воздействие на ее ложе и химиотерапию темозоломидом (ТМЗ), медианное значение

продолжительности жизни пациентов с МГБ составляет лишь 15–18 месяцев [2]. Данный факт объясняется высокой злокачественностью клеток глиобластомы, их способностью к диффузному инфильтративному росту в окружающие ткани и развитием устойчивости клеток опухоли к радио- и химиотерапии, что определяет склонность МГБ к рецидивам [1]. Низкая эффективность лечения данного онкологического заболевания также связана с крайне ограниченным арсеналом лекарственных препаратов, одобренных для терапии МГБ, включающим ТМЗ (алкилирующий агент на основе

Принятые сокращения: МГБ – мультиформная глиобластома; СТА – солоксолон триптамид; ТМЗ – темозоломид; ALDH – альдегиддегидрогеназа; TGF- β – трансформирующий ростовой фактор бета.

* Адресат для корреспонденции.

имидазолтетразина, препарат первой линии) и бевацизумаб (гуманизированное рекомбинантное антитело к эндотелиальному фактору роста сосудов (VEGF), препарат второй линии), использование которых ограничивается развитием у клеток МГБ лекарственной устойчивости и низкой эффективностью их проникновения в опухолевую ткань соответственно [3]. Таким образом, поиск новых лекарственных агентов, способных эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер и блокировать пролиферацию и инвазионные свойства клеток МГБ является критически важным направлением современной медицинской химии.

Отличительной особенностью МГБ является ее выраженная гетерогенность, т.е. существование в рамках одной опухоли различных популяций опухолевых клеток, отличающихся друг от друга профилем ключевых сигнальных путей и, как результат, характеризующихся разным функциональным состоянием [2]. Данная особенность лежит в основе низкой эффективности современной химиотерапии МГБ [4] и свидетельствует о перспективности использования мультитаргетной стратегии для создания новых антиглиобластомных препаратов [5]. Одним из важных источников мультитаргетных фармакологически активных соединений являются природные метаболиты, активно исследуемые в настоящее время в качестве агентов, блокирующих пролиферацию и инвазивность клеток МГБ не только в клеточных экспериментах, но и на ортотопических моделях глиобластомы *in vivo* [6].

Ранее нами в сотрудничестве с исследователями из лаборатории фармакологически активных веществ Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН было разработано полусинтетическое производное глицирретовой кислоты солоксолон триптаид (СТА), обладающий комплексным противоопухолевым эффектом в отношении клеток МГБ *in vitro*, включающим индукцию митохондриального стресса с последующим запуском апоптоза, блокировку клонотического потенциала, клеточной подвижности и способности клеток МГБ к васкулогенной мимикрии [7]. Кроме этого, на гетеротопической ксенографтной мышинной модели было установлено, что СТА способен эффективно проникать через гематоэнцефалический барьер и достоверно подавлять рост глиобластомы человека U87 *in vivo* [7]. Целью настоящего исследования является расширение знаний об антиглиобластомном потенциале СТА. В данной работе изучен эффект СТА на рост клеток МГБ человека U87 в 3D-культуре и

их адгезионные свойства, проанализирована синергичность цитотоксического действия СТА с TMZ в отношении клеток глиобластомы U87 и влияние СТА на ряд характеристик опухолевого микроокружения в эксперименте с глиобластомой U87 *in vivo*. Кроме этого, с помощью подходов компьютерной биологии установлен ряд потенциальных белковых мишеней СТА, определяющих его выраженные антиглиобластомные свойства. Полученные данные позволяют предложить СТА в качестве перспективного лекарственного кандидата, оказывающего комплексный модулирующий эффект на ключевые характеристики, определяющие высокую злокачественность МГБ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемое соединение. Солоксолон триптаид (СТА) был синтезирован в лаборатории фармакологически активных веществ Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН с.н.с., к.х.н. Саломатиной О.В., согласно опубликованной ранее методике [7], и передан для проведения биологических испытаний в виде кристаллического порошка. СТА был растворен в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 10 мМ и хранился при -20°C до проведения экспериментов.

Культивирование клеток МГБ человека U87. Клетки глиобластомы человека U87, полученные из Американской коллекции клеточных культур («ATCC», США), культивировали в питательной среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM; «Sigma Aldrich», США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; «Gibco», США) и раствор антибиотикомикотиков («MP Biomedicals», Франция), включающий пенициллин, стрептомицин и амфотерицин в конечных концентрациях 100 ед./мл, 0,1 мг/мл и 0,25 мкг/мл соответственно. Культуру клеток поддерживали в инкубаторе с увлажненной атмосферой при температуре 37°C с 5%-ным содержанием CO_2 (далее — стандартные условия).

Оценка цитотоксичности СТА на 2D-культуре клеток U87 (МТТ-тест). Клетки U87 высаживали в 96-луночные планшеты («TPP», Швейцария) в концентрации 10^4 клеток на лунку в среде DMEM, содержащей 10% FBS (DMEM/10% FBS), и инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч. Затем питательную среду заменяли на бессывороточную с добавлением СТА (100–800 нМ), и инкубировали клетки дополнительные 24 ч,

после чего добавляли в каждую лунку раствор соли тетразола (МТТ) до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Спустя 2 ч инкубации среду удаляли, добавляли 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана и измеряли поглощение растворов при длине волны 570 нм и референсной длине волны 620 нм на многоканальном спектрофотометре Multiscan RC plate reader («Thermo LabSystems», Финляндия).

Исследование эффекта СТА на рост сфероидов клеток U87. Оценку воздействия СТА на рост сфероидов U87 проводили с помощью двух экспериментальных методик: путем культивирования клеток на планшетах, дно которых было покрыто 1%-ной агарозой (1) либо гидрофильным, неиногенным, нейтрально заряженным гидрогелем («Corning», США); далее — планшеты со сверхнизким сцеплением дна (2). На первом этапе клетки U87 в среде DMEM/10% FBS помещали в покрытые агарозой 48-луночные планшеты («TPP») и 6-луночные планшеты («Servicebio», Китай) со сверхнизким сцеплением дна в концентрации 2×10^3 и 5×10^5 клеток на лунку соответственно. После инкубации в течение 7 и 4 дней в стандартных условиях для методик (1) и (2) соответственно к получившимся сфероидом добавляли СТА в среде DMEM без добавления сыворотки до конечных концентраций 0,1–2 мкМ. Фотографии сфероидов делали с помощью инвертированного микроскопа ZEISS Primo Vert со встроенной камерой ZEISS AxioCam ERc5s («Carl Zeiss Microscopy GmbH», Германия) сразу после добавления растворов СТА и затем каждые 2–3 суток до 28 суток инкубации (1) либо однократно через 2 суток после добавления тритерпеноида (2). Для каждой экспериментальной группы определяли площадь 4 (1) или 250 (2) сфероидов с помощью программы ImageJ («NIH», США) и нормировали данный показатель на среднюю площадь сфероидов в контроле (клетки U87 без добавления СТА).

Исследование эффекта СТА на TGF- β -стимулированное формирование сфероидо-подобных структур на монослое клеток U87. Клетки U87 в среде DMEM/10% FBS высаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^3 клеток на лунку и культивировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем заменяли питательную среду на среду без сыворотки, содержащую TGF- β 1 (50 нг/мл) («Prospec», Израиль) и СТА (200, 400 мкМ). Через 48 ч после индукции формирование сфероидо-подобных структур регистрировали с помощью инвертированного микроскопа EVOS XL Core («Thermo Fisher Scientific», США). Для каждой экспериментальной и контрольной

групп фотографировали 4 поля при $200\times$ увеличении микроскопа с использованием встроенной CMOS-камеры. Для каждой экспериментальной группы определяли площадь не менее 10 сфероидо-подобных структур с помощью программы ImageJ и нормировали данный показатель на среднюю площадь сфероидов в контрольной группе (инкубация с TGF- β , но без СТА).

Исследование эффекта СТА на адгезивные свойства клеток U87 (трипсиновый тест). Клетки U87 высаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 10^4 клеток на лунку в среде DMEM/10% FBS и культивировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем заменяли питательную среду на среду без сыворотки, содержащую СТА в концентрации 25–100 нМ, и инкубировали 24 ч в стандартных условиях. По окончании инкубации к клеткам добавляли 30 мкл TrypLE™ («Gibco»), разбавленного фосфатно-солевым буфером (PBS) (1 : 10), помещали планшет в CO₂-инкубатор на 3 мин, после чего дважды промывали клетки средой DMEM/10% FBS. Количество клеток, оставшихся прикрепленными ко дну лунки после отмывки, оценивали с помощью МТТ-теста.

Исследование эффекта СТА на адгезивность клеток U87 к коллагеновой подложке. Клетки U87 высаживали в 6-луночные планшеты в концентрации $2,8 \times 10^5$ клеток на лунку в среде DMEM/10% FBS и инкубировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем среду убрали, к клеткам добавляли СТА (25–100 нМ) в среде DMEM без добавления сыворотки и дополнительно культивировали 24 ч в стандартных условиях. По окончании инкубации клетки открепляли от поверхности планшетов с помощью TrypLE™, ресуспендировали в среде DMEM/10% FBS и высаживали в концентрации 10^5 клеток на лунку в 96-луночные планшеты, дно которых было предварительно покрыто коллагеном, выделенным из хвоста крысы («Cell Applications, Inc.», США). Через 1 ч инкубации в стандартных условиях лунки планшетов дважды промывали PBS и оценивали с помощью МТТ-теста количество клеток, прикрепившихся к коллагеновой подложке.

Исследование сочетанного действия СТА и ТМЗ на клетках U87. Клетки U87 высаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 10^4 клеток на лунку в среде DMEM/10% FBS и инкубировали ночь в стандартных условиях. Затем среду в лунках заменяли на DMEM без сыворотки, добавляли СТА и/или темозоломид до конечных концентраций 0,1–1 и/или 100–500 мкМ соответственно и культивировали клетки в течение 72 ч в стандартных условиях.

По окончании инкубации количество живых клеток U87 оценивали с помощью МТТ-теста. Анализ типа сочетанного действия соединений проводили с помощью веб-ресурса SynergyFinder (<https://synergyfinder.fimm.fi>) [8].

Анализ активности альдегиддегидрогеназы в клетках U87. Клетки U87 в среде DMEM/10% FBS высаживали в 6-луночные планшеты в концентрации $2,8 \times 10^5$ клеток на лунку и инкубировали в течение ночи в стандартных условиях. Затем среду убрали, и к клеткам добавляли СТА в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в среде DMEM без сыворотки и вновь инкубировали 24 ч в стандартных условиях. После этого активность альдегиддегидрогеназы (ALDH) определяли с помощью коммерческого набора AldeRed® ALDH Detection Assay («Sigma-Aldrich Inc.», Германия), согласно протоколу производителя. Коротко, клетки снимали с поверхности планшета с помощью TrypLE™, ресуспендировали в 1 мл буфера AldeRed Assay Buffer и добавляли в каждую пробирку 5 мкл флуоресцентного красителя AldeRed, а в контрольные пробирки дополнительно добавляли 5 мкл ингибитора ALDH диэтиламинобензальдегида (DEAB). После инкубации в течение 45 мин в стандартных условиях клетки собирали с помощью центрифугирования, ресуспендировали их в 200 мкл буфера, помещали пробирки в лед и проводили анализ образцов на проточном цитофлуориметре NovoCyte («ACEA Biosciences, Inc», США) с помощью программного обеспечения NovoExpress Software («ACEA Biosciences, Inc»). Для каждого образца проводили анализ 10 000 событий.

Идентификация потенциальных белковых мишеней СТА с помощью *in silico* подходов. На первом этапе анализа определяли возможные первичные белковые мишени СТА путем анализа его структуры хемоинформатическими платформами Polypharmacology Browser 2.0 [9] и SwissTargetPrediction [10], после чего добавляли их по отдельности к списку генов, ассоциированных, согласно базе данных DisGeNET, с патогенезом МГБ C1621958 (3197 генов), и строили для дополненных списков генные ассоциативные сети с использованием базы данных STRING (the Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins) [11]. Полученные сети визуализировали в программной среде Cytoscape 3.9.1 и анализировали с помощью плагина cytoHubba [12]: для каждой первичной мишени СТА вычисляли «Degree», «MCC» и «Betweenness» (характеристики центральности гена в сети), ранжировали списки мишеней по данным показателям и вычисляли «общий ранг» как среднее от ранга мишени по трем показателям.

На следующем этапе с помощью молекулярного докинга проводили моделирование взаимодействия СТА с наиболее связанными с геной сетью глиобластомы (т.е. характеризующимися наименьшим значением ранга) мишенями. Кристаллические структуры EGFR (Protein Data Bank (PDB) ID: 8A2D), AKT1 (PDB ID: 3O96), FYN (PDB ID: 2DQ7) и ERBB2 (PDB ID: 3RCD) были взяты из базы данных RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>), из них удаляли молекулы воды и кокристаллизованные лиганды (известные ингибиторы) с помощью Discovery Studio Visualizer v21.1.0 и добавляли полярные водороды и частичные атомные заряды по методу Гастейгера с помощью AutoDock Tools 1.5.7. 2D-Структуры СТА и известных ингибиторов переводили в трехмерную форму в MarvinSketch v22.1, оптимизировали геометрию молекул с помощью Avogadro v1.2.0 (силовое поле MMFF94) и устанавливали способность связей внутри лигандов к свободному вращению с помощью AutoDock Tools 1.5.7. Моделирование взаимодействий «лиганд–белок» проводили в программе AutoDockVina [13] с использованием следующих параметров: EGFR – size_x = 22, size_y = 14, size_z = 16, center_x = -1,379, center_y = -9,243, center_z = 18,98; AKT1 – size_x = 14, size_y = 18, size_z = 18, center_x = 8,507, center_y = -7,504, center_z = 10,15; FYN – size_x = 14, size_y = 14, size_z = 14, center_x = -15,594, center_y = 17,532, center_z = -12,787; ERBB2 – size_x = 16, size_y = 16, size_z = 14, center_x = 13,147, center_y = 29,114, center_z = 29,114. Докинг-комплексы с прочными взаимодействиями между лигандом и белком ($\Delta G \leq 7,0$ ккал/моль) визуализировали с помощью Discovery Studio Visualizer v21.1.0 и LigPlot⁺ v.2.2.7 в 3D- и 2D-форматах соответственно и отбирали структуры, стабилизированные наибольшим количеством водородных связей.

Потенциальные белковые мишени СТА, отобранные с помощью молекулярного докинга, наносили на иерархическое дерево киназа человека с помощью платформы KinMap (<http://www.kinhub.org/kinmap/>), в структуре которого отмечали киназы, ассоциированные с патогенезом МГБ (согласно базе данных Open Targets Platform (<https://platform.opentargets.org/>)).

Лабораторные животные. В работе использовали 6–8-недельных бестимусных мышей-самок линии Nude развода Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных на базе SPF-вивария Института цитологии и генетики (ИЦиГ)

СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН по 6 особей в клетке в соответствии с нормами содержания SPF-животных. Мыши имели свободный доступ к еде и воде. Клетки, подстилка, корм и вода подвергались автоклавированию.

Гетеротопическая ксенографтная модель МГБ. Для формирования ксенографтной модели с первичным опухолевым узлом суспензию клеток глиобластомы U87 (2×10^7 клеток/мл) вводили подкожно в левый бок мышам линии Nude в 0,1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида с 0,05 мл матригеля (Matrigel® Matrix; «Corning», США). На 5-й день после трансплантации животных распределяли на группы — по 6 мышей в каждой: (1) мыши, получавшие внутрибрюшинные (в.б.) инъекции 10%-ного Tween-80 (контроль) и (2) мыши, получавшие в.б. инъекции соединения СТА в 10%-ном Tween-80 в дозе 20 мг/кг. Все в.б. инъекции проводили в объеме 200 мкл 3 раза в неделю. Всего было произведено 7 инъекций. Мышей выводили из эксперимента на 21-й день роста опухоли путем дислокации шейных позвонков под изофлюрановой анестезией. Производили забор опухолевых узлов для последующего гистологического исследования.

Гистология. Опухолевые узлы фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине («Bio-Vitrum», Россия), затем производили обезвоживание в спиртах возрастающей концентрации, просветляли ксилолом и заключали в парафин HISTOMIX («BioVitrum»). Парафиновые срезы толщиной до 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Локализацию и количество стромального компонента опухоли (эластиновые волокна) определяли с помощью окрашивания срезов по Ван Гизону [14]. Гистологические срезы анализировали на микроскопе Axiostar plus, оснащенный камерой Axiacam MRc5 («Zeiss», Германия).

Морфометрическое исследование опухолевых узлов. Морфометрический анализ гистологических срезов опухолевых узлов проводили с использованием закрытой тестовой системы из 100 точек площадью $3,2 \times 10^6$ мкм² при 200× увеличении микроскопа, накладывая сетку случайным образом. При проведении морфометрического исследования опухолевых узлов подсчитывали объемные плотности стромального компонента опухолевой ткани и численную плотность тонкостенных кровеносных сосудов в ткани опухоли. Объемную плотность оцениваемой гистологической структуры подсчитывали по формуле:

$$V_v = (P_{\text{структура}} / P_{\text{тест}}) \times 100\%,$$

где $P_{\text{структура}}$ — количество точек, которые приходятся на структуру, а $P_{\text{тест}}$ — общее количество тестовых точек, в данном случае — 100. Численную плотность оцениваемой гистологической структуры определяли путем подсчета количества структур в пределах тестового поля, в данном случае — $3,2 \times 10^6$ мкм². Всего оценивали по 5 полей зрения в каждом образце для каждой гистологической структуры; таким образом, всего было проанализировано по 30 полей зрения в каждой экспериментальной группе.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного пакета GraphPad Prism 8.0.1. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий между группами с нормальным и ненормальным распределениями применяли непарный критерий Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна–Уитни соответственно. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

СТА эффективно подавляет рост сфероидов клеток U87. На первом этапе исследования была оценена цитотоксичность СТА (рис. 1, а) в отношении клеток МГБ человека U87 *in vitro*. Исследуемый тритерпеноид эффективно подавлял жизнеспособность клеток U87 в монослое в низких субмикромольных концентрациях: его значение $IC_{50}^{(24 \text{ ч})}$ составило около 0,7 мкМ (рис. 1, б). Учитывая, что монослой клеток (2D-культура) не в полной мере моделирует опухолевый рост *in vivo*, при котором опухолевые клетки в зависимости от положения в опухолевом узле имеют различный доступ к питательным веществам и кислороду, противоопухолевый потенциал СТА был далее проанализирован на сфероиде МГБ (3D-культура). Для этого к сфероидам клеток U87, сформированным в культуральных планшетах, покрытых 1%-ной агарозой, добавляли СТА (0,5–4 мкМ) и оценивали их относительную площадь каждые 2–4 дня в течение 21 суток. Как видно из рис. 1, в, в ходе эксперимента площадь сфероидов в контроле (без СТА) линейно росла, тогда как СТА дозозависимо тормозил рост сфероидов, причем эти различия в площади сфероидов становятся заметными, начиная с 7 дня инкубации. К концу эксперимента наблюдалось значительное снижение площади сфероидов в 2,5, 3 и 12,1 раза

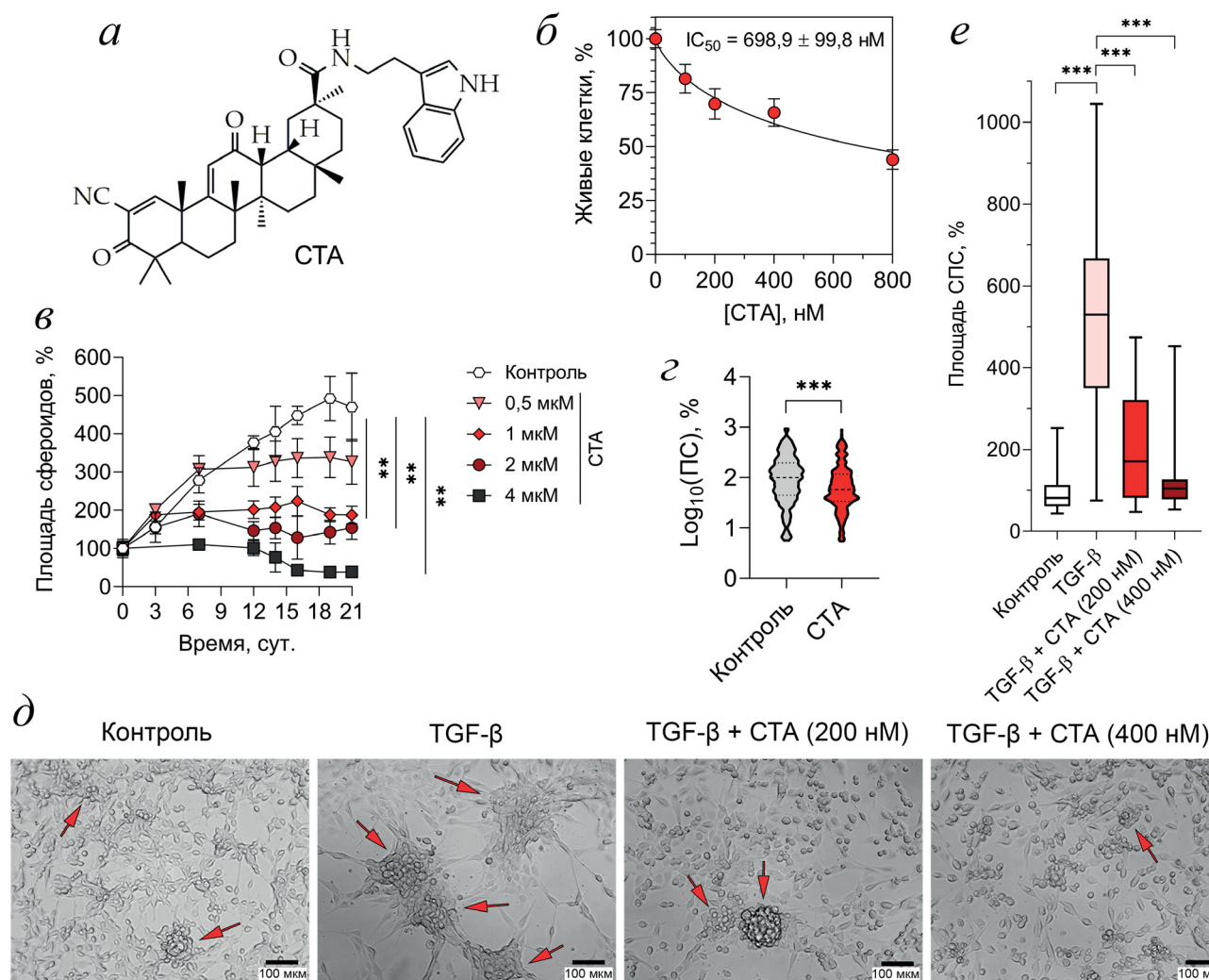


Рис. 1. Влияние STA на рост клеток глиобластомы человека. *а* — Структурная формула STA. *б* — Цитотоксичность STA в отношении клеток U87. Клетки инкубировали с указанными концентрациями STA в течение 24 ч, и затем оценивали уровень живых клеток с помощью МТТ-теста. *в* — Влияние STA на рост сфероидов U87 в планшетах, дно которых покрыто агарозой, и планшетах со свёрхнизким сцеплением дна (*г*). К сфероидам U87 добавляли STA в указанных концентрациях и оценивали площадь сфероидов в указанных временных точках (*в*) или через 48 ч инкубации (*г*) с помощью фазово-контрастной микроскопии. *д* и *е* — Влияние STA на формирование сфероидо-подобных структур в монослое клеток U87 под действием TGF-β. Клетки инкубировали с TGF-β1 (50 нг/мл) и STA (200, 400 мкМ) в течение 48 ч, и оценивали площадь сфероидов с помощью фазово-контрастной микроскопии. Фотографии сделаны при 200× увеличении (*д*), стрелками показаны сфероидо-подобные структуры. Площади сфероидов (*в*, *г*) и сфероидо-подобных структур (*е*) были подсчитаны с помощью программы ImageJ

по сравнению с контролем для концентраций STA 1, 2 и 4 мкМ соответственно (рис. 1, в). Наблюдаемый супрессивный эффект STA в отношении роста клеток МГБ в 3D-культуре был также подтвержден в независимом эксперименте со сфероидом клеток U87, сформированными на культуральных планшетах со свёрхнизким сцеплением дна. Из графика, представленного на рис. 1, г, видно, что инкубация сфероидов в присутствии 2 мкМ STA в течение 48 ч приводила к достоверному снижению их площади.

Известно, что трансформирующий ростовой фактор бета (TGF-β) играет важную роль в регуляции злокачественности МГБ, усили-

вая их стволовые свойства, инвазивность и метастазирование [15]. Учитывая, что TGF-β является также известным стимулятором сфероидного роста клеток глиобластом [16], на следующем этапе работы был исследован эффект STA на формирование сфероидо-подобных структур в монослое TGF-β-стимулированных клеток U87. Мы показали, что 3-дневный интактный монослой клеток U87 характеризовался небольшим количеством многослойных структур, размер которых в 5,3 раза увеличивался при стимуляции клеток TGF-β по сравнению с контролем, причем данный эффект не был связан с усилением пролиферации клеток (рис. 1, д и е). Инкубация TGF-β-

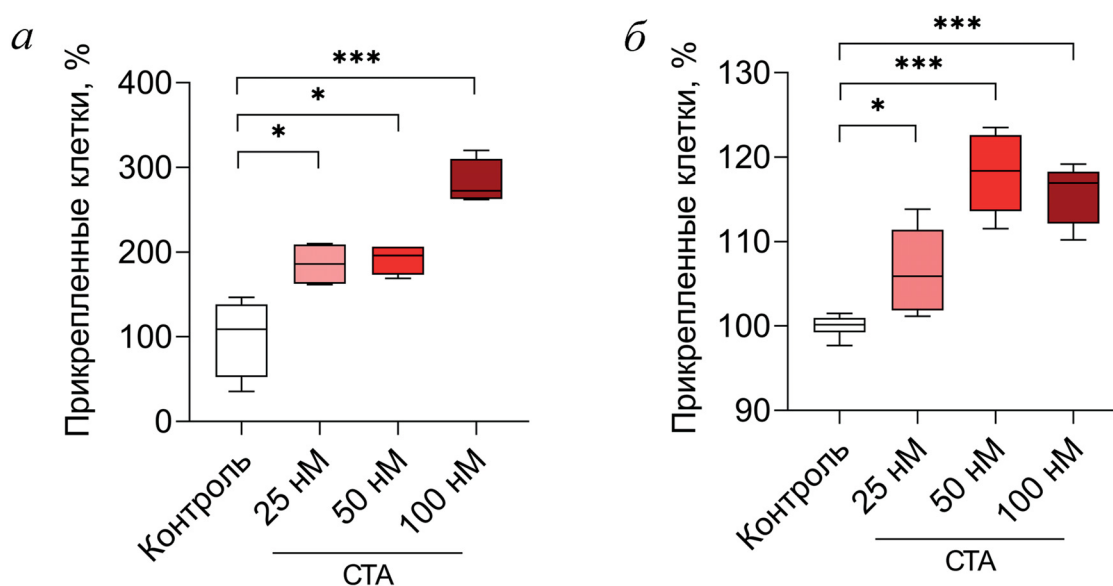


Рис. 2. Влияние СТА на адгезивные свойства клеток глиобластомы человека. *а* — Воздействие СТА на адгезивность клеток U87, оцененную методом трипсинизации. Клетки инкубировали с СТА в указанных концентрациях в течение 24 ч, затем обрабатывали TrypLE™, отмывали средой DMEM и определяли число клеток, оставшихся прикрепленными ко дну планшета с помощью МТТ-теста. *б* — Эффект СТА на адгезию клеток U87 к коллагеновой подложке. Клетки индуцировали СТА в указанных концентрациях в течение 24 ч, затем высаживали на 1 ч в лунки 96-луночного планшета, дно которого было покрыто коллагеном из хвоста крыс, после чего отмывали PBS и оценивали количество клеток, прикрепившихся к коллагеновой подложке, с помощью МТТ-теста. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение четырех (*а*) и шести (*б*) независимых экспериментов

стимулированных клеток в присутствии СТА в концентрации 200 нМ достоверно в 2,6 раза снижала размер сфероидо-подобных формирований по сравнению с TGF- β -обработанным контролем, а при дальнейшем повышении концентрации СТА до 400 нМ площадь сфероидо-подобных структур в TGF- β -стимулированных клетках U87 снижалась до значений интактного контроля (рис. 1, *д* и *е*).

СТА усиливает адгезивные свойства клеток U87. Установив наличие у СТА выраженных антипролиферативных свойств в отношении клеток U87 (рис. 1), далее мы проанализировали, обладает ли исследуемый тритерпеноид противоопухолевым потенциалом в нетоксичных концентрациях, сконцентрировав внимание на таком свойстве клеток U87, как адгезивность, ослабление которой ассоциировано с высоким метастатическим потенциалом МГБ [17].

Для оценки влияния СТА на адгезионную активность клеток монослой клеток U87 инкубировали в отсутствие (контроль) или в присутствии СТА в концентрациях 25–100 нМ в течение 24 ч, после чего обрабатывали клетки разбавленным раствором рекомбинантного трипсина TrypLE™ в течение 3 мин, отмывали открепившиеся клетки и оценивали количество клеток, прикрепленных ко дну планшета, с помощью МТТ-теста. Как видно из рис. 2, *а*, СТА во всех используемых концентрациях до-

стоверно усиливает адгезивность клеток U87, причем с увеличением концентрации СТА в среде увеличивается и количество неоткрепившихся клеток. Количество клеток, оставшихся прикрепленными ко дну планшета после действия TrypLE™, в экспериментальных группах превышало данный показатель в контроле в 1,9–2,8 раза.

Дополнительно был изучен эффект СТА в отношении адгезии клеток U87 к коллагеновой подложке, имитирующей *in vitro* внеклеточный матрикс. Клетки U87 инкубировали в присутствии 25–100 нМ СТА в течение 24 ч, после чего их снимали с планшета с помощью TrypLE™ и переносили на 96-луночный планшет, дно лунок которого было покрыто коллагеном из хвоста крыс. Клетки инкубировали на коллагеновых подложках в течение 1 ч, отмывали от неприкрепившихся клеток и оценивали количество прикрепившихся клеток с помощью МТТ-теста. Как и в случае с предыдущим экспериментом, СТА достоверно усиливал адгезионную активность клеток U87, при этом наибольшее усиление адгезии наблюдалось при концентрации СТА в среде 50 и 100 нМ (рис. 2, *б*).

СТА действует синергически в комбинации с ТМЗ в отношении жизнеспособности клеток U87. Как было отмечено выше, препаратом первой линии при терапии МГБ является ТМЗ, который представляет собой

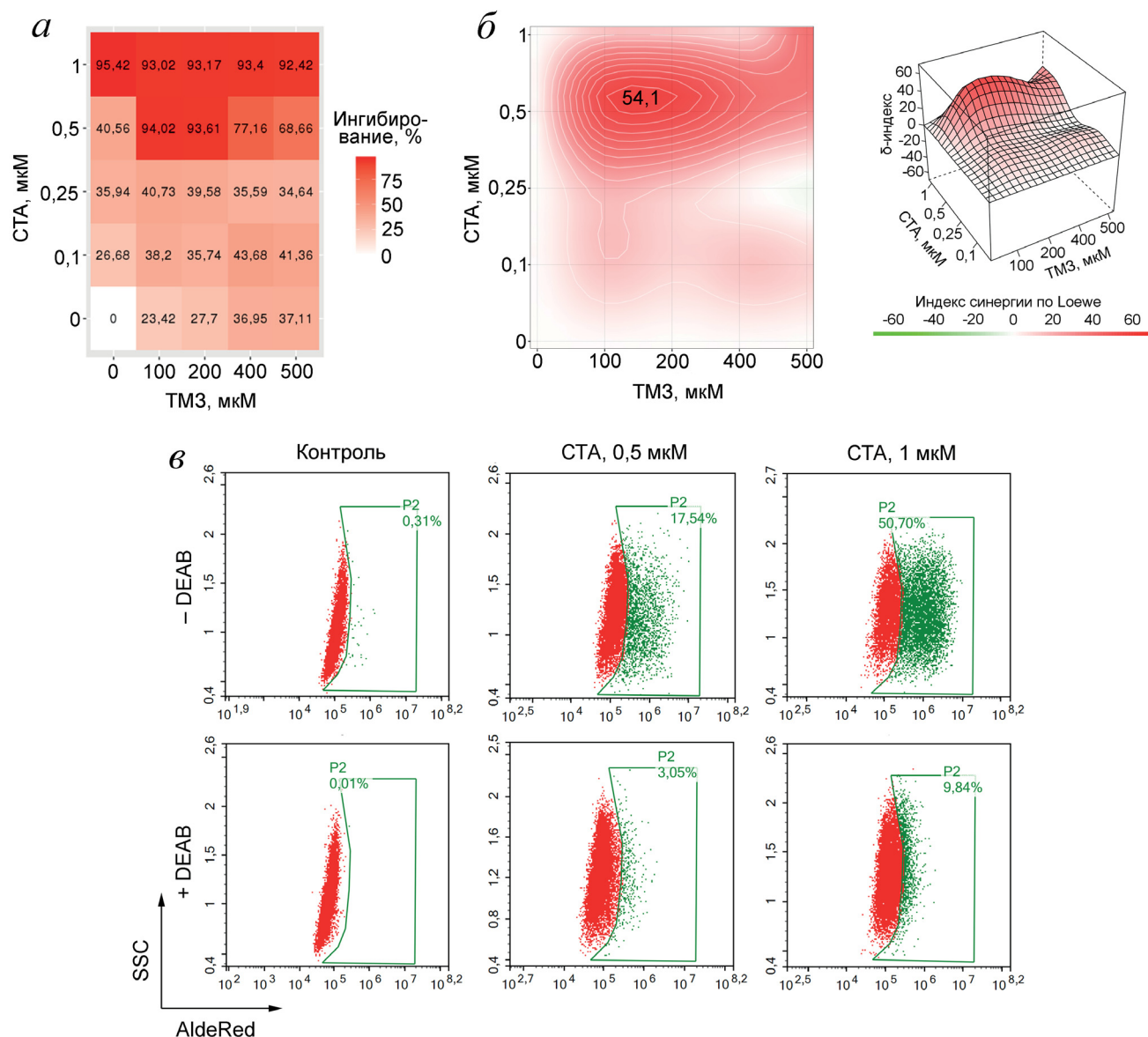


Рис. 3. Синергическое действие СТА и ТМЗ на клетки глиобластомы U87. *а* – Сочетанное действие СТА и ТМЗ в отношении жизнеспособности клеток U87. Клетки U87 культивировали с СТА и/или ТМЗ в указанных концентрациях в течение 72 ч, после чего количество живых клеток определяли с помощью МТТ-теста. *б* – Профиль совместного цитотоксического действия СТА и ТМЗ, построенный с помощью веб-ресурса SynergyFinder. *в* – Влияние СТА на активность ALDH в клетках U87. Клетки U87 инкубировали с СТА в указанных концентрациях в течение 24 ч и оценивали активность ALDH с помощью набора AldeRed® ALDH Detection Assay и проточной цитометрии. DEAB – диэтиламинобензальдегид

ДНК-метирующий агент, способствующий образованию в цепях ДНК O⁶-метилгуанина, последующему появлению в них двуцепочечных разрывов в результате репарации неканонических пар нуклеотидов и, как результат, гибели клеток МГБ [18]. Учитывая критическую важность данного алкилирующего агента в схемах лечения МГБ, важным аспектом разработки новых антиглиобластомных лекарственных кандидатов является оценка их сочетанного действия с ТМЗ. Для этого клетки U87 инкубировали в присутствии различных концентраций СТА (0,1–1 мкМ) и ТМЗ (100–

500 мкМ) в течение 72 ч, после чего определяли количество жизнеспособных клеток с помощью МТТ-теста и анализировали характер сочетанного действия исследуемых препаратов с помощью платформы SynergyFinder 2.0 [8]. Как видно из тепловой карты, представленной на рис. 3, *а*, ТМЗ обладал слабым уровнем цитотоксичности в отношении клеток U87 ($IC_{50}^{(72\text{ ч})} > 500$ мкМ), в то время как СТА в концентрации 1 мкМ приводил практически к полной гибели опухолевых клеток $IC_{50}^{(72\text{ ч})} = 0,4 \pm 0,1$ мкМ). При совместном применении ТМЗ и СТА действовали синергически

при использовании СТА в пределах значения его IC_{50} : наибольший δ -индекс синергии составлял 54,1 при сочетании 0,5 мкМ СТА и 100 мкМ ТМЗ, вызывая гибель 94% клеток глиобластомы U87 через 72 ч (рис. 3, б). Интересно, что дальнейшее повышение концентраций исследуемых соединений приводило к снижению δ -индекса (рис. 3, б), что может свидетельствовать о запуске в клетках U87 компенсационных механизмов в ответ на нарастающий ксенобиотический стресс. Для проверки данной гипотезы был исследован эффект СТА на уровень активности альдегиддегидрогеназы, играющей важную роль в детоксикации антинеопластических препаратов и подавлении вызванного ими окислительного стресса [19]. Клетки U87 инкубировали в присутствии СТА в концентрациях 0,5 и 1 мкМ в течение 24 ч, после чего проводили их окраску с помощью AldeRed, являющегося флуоресцирующим субстратом ALDH, и анализировали клетки с помощью проточной цитометрии. Как видно из цитограмм, представленных на рис. 3, в, в контроле отсутствовали клетки с высоким уровнем активности ALDH (клетки $ALDH^{high}$; 0,3%), в то время как СТА в концентрациях 0,5 и 1 мкМ вызывал увеличение доли клеток $ALDH^{high}$ до 17,5% и 50,7% соответственно. Внесение в культуральную среду селективного ингибитора ALDH диэтиламинобензальдегида значительно снижало наблюдаемый эффект тритерпеноида, свидетельствуя о том, что выявленное усиление флуоресцентного сигнала клеток в экспериментальных группах связано именно с активностью ALDH (рис. 3, в).

EGFR, ERBB2 и AKT1 являются потенциальными белковыми мишенями СТА, определяющими его выраженную антиглиобластомную активность. Известно, что пентациклические тритерпеноиды, как природные, так и полусинтетические, характеризуются широким спектром молекулярных мишеней внутри клеток [20]. Для того чтобы определить потенциальные белковые мишени СТА, ассоциированные с патогенезом МГБ, был использован комплекс методов компьютерной биологии. На первом этапе на основе анализа структуры СТА с использованием хемоинформатических платформ Polypharmacology Browser 2.0 [9] и SwissTargetPrediction [10] мы идентифицировали ряд его возможных белковых мишеней (рис. 4, а). Параллельно с этим был реконструирован МГБ-ассоциированный регулом на основе ключевых генов, связанных с МГБ, по данным DisGeNET, в который далее внедряли выявленные белки-мишени СТА, анализировали топологию сетей и ранжировали

потенциальные мишени тритерпеноида по уровню взаимодействия с МГБ-ассоциированным регулом. Проведенный анализ показал, что наибольшей взаимосвязью с патогенезом МГБ среди проанализированных белков обладали рецептор эпидермального ростового фактора (EGFR), серин-треониновая протеинкиназа AKT1, тирозиновая протеинкиназа FYN и рецепторная тирозиновая протеинкиназа ERBB2 (известная также как HER2) (рис. 4, а). Дальнейшее молекулярное моделирование подтвердило способность СТА взаимодействовать с активными центрами EGFR, AKT1 и ERBB2 в сайтах связывания их известных ингибиторов с низкими значениями свободной энергии Гиббса ($\Delta G = -9,2, -7,1$ и $-7,0$ ккал/моль соответственно) (рис. 4, б). FYN был исключен из дальнейшего анализа, так как полученный докинг-комплекс СТА с данным белком характеризовался энергией связывания $\Delta G = -5,3$ ккал/моль, значительно превышающей пороговую величину ($\Delta G \leq -7,0$ ккал/моль) (рис. 4, б). Подробный анализ полученных структур показал, что молекула СТА формирует связи с аминокислотными остатками, играющими важную роль в функционировании EGFR, AKT1 и ERBB2, включая водородные связи с Arg858 (EGFR), Glu85 и Cys296 (AKT1), Lys753, Asn850 и Asp863 (ERBB2), причем выявленная сеть взаимодействий СТА оказалась схожей с сетью взаимодействия известных ингибиторов анализируемых белков (рис. 4, в). Последующее нанесение белковых мишеней СТА, верифицированных молекулярным докингом, на филогенетическое дерево, содержащее МГБ-ассоциированный кином человека (реконструированный на основе базы данных Open Targets Platform), независимо подтвердило связь EGFR и ERBB2 с патогенезом МГБ (рис. 4, г). Интересно, что AKT1, несмотря на ее высокий уровень интеграции в МГБ-специфичный регулом (рис. 4, а), оказалась не ассоциированной с патогенезом глиобластомы (рис. 4, г), что, возможно, объясняется сложностями в заполнении базы данных Open Targets Platform информацией по AKT1, так как в большинстве опубликованных работ, посвященных связи АКТ с МГБ, использовались ингибиторы пан-АКТ, обладающие сходной эффективностью действия на различные изоформы АКТ [21]. Несмотря на это, AKT1, по-видимому, играет важную роль в прогрессии МГБ — подавление ее экспрессии с помощью малых интерферирующих РНК и антисмысловых олигонуклеотидов достоверно снижало пролиферацию клеток МГБ в клеточных и мышиных экспериментах соответственно [22, 23].

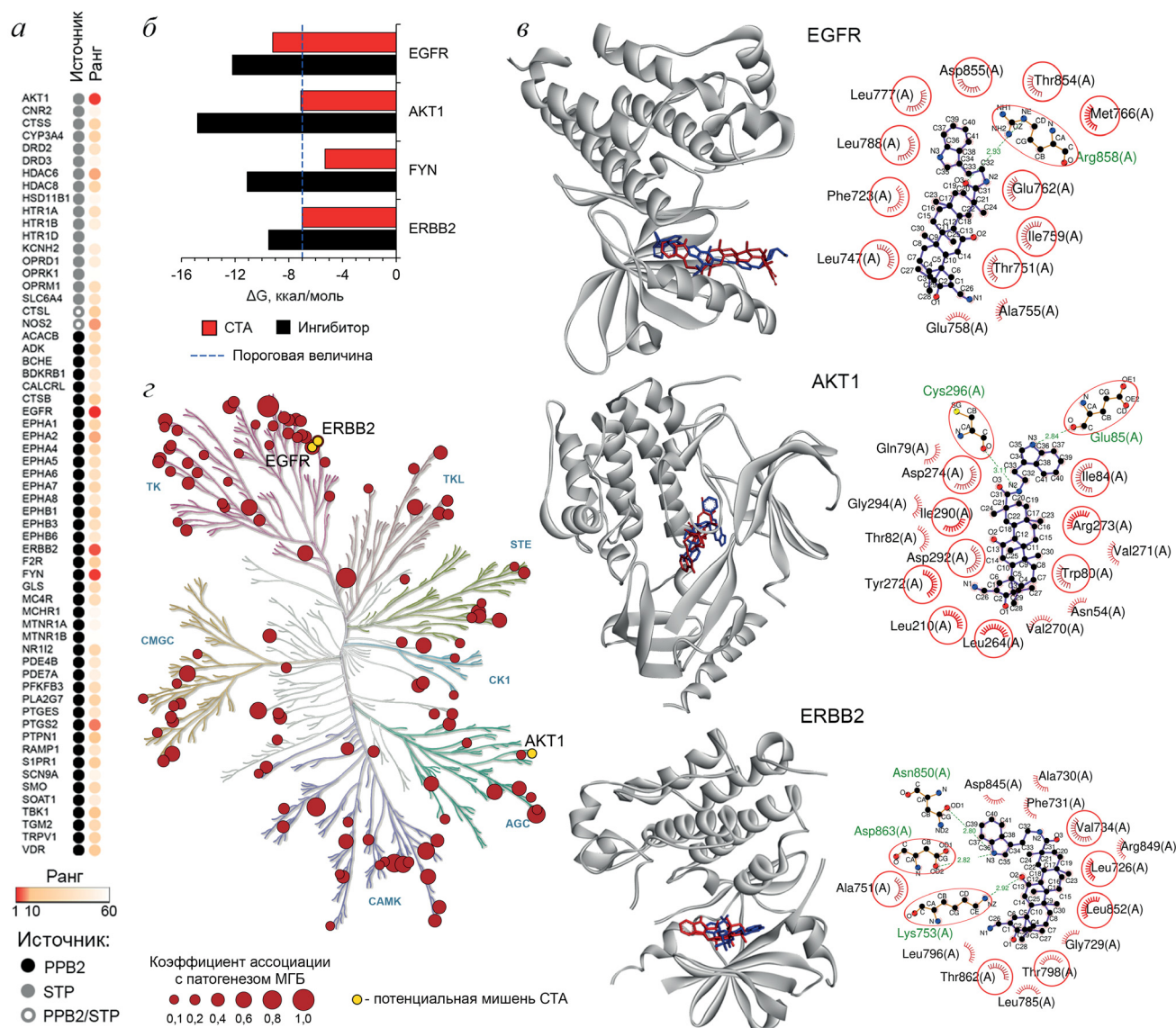


Рис. 4. Определение возможных белковых мишеней СТА, ассоциированных с МГБ. *а* – Анализ интегрированности потенциальных мишеней СТА в регулом МГБ. Первичные мишени СТА были предсказаны с помощью веб-ресурсов Polypharmacology Browser (PPB2) и SwissTargetPrediction (SWT), их взаимодействие с МГБ-ассоциированным регулом было воссоздано на основе информации из баз данных DisGeNET и STRING и проанализировано с помощью плагина cytoHubba в программной среде Cytoscape. Рэнг мишени определен на основе трех характеристик центральности гена в генной регуляторной сети (Degree, MCC и Betweenness), и его величина обратно пропорциональна значимости мишени в регуляции МГБ. *б* – Энергии связывания СТА и известных ингибиторов с АКТ1 и EGFR, определенные с помощью молекулярного докинга. *в* – Трехмерное и двухмерное изображения докинг-комплексов EGFR и АКТ1 с СТА. Красными окружностями обозначены аминокислотные остатки, являющиеся общими для докинг-комплексов СТА и известных ингибиторов EGFR и АКТ1. Зелеными пунктирными линиями обозначены водородные связи. *г* – Филогенетическое дерево кинома человека, реконструированное с помощью платформы KinMap. Взаимосвязь киназ с патогенезом МГБ восстановлена с использованием базы данных Open Targets Platform [24]

Таким образом, проведенный *in silico* анализ выявил потенциальную способность СТА взаимодействовать с активными центрами ряда киназ, связанных с патогенезом МГБ, включая EGFR, ERBB2 и АКТ1. Полученные данные требуют дальнейшего экспериментального подтверждения.

СТА блокирует развитие сети незрелых тонкостенных сосудов и снижает количество соединительнотканых волокон в ткани МГБ. Ранее

на гетеротопической ксенографтной модели глиобластомы U87 нами было показано, что 7-кратная внутривенная инъекция СТА в дозе 20 мг/кг эффективно снижала рост периферических опухолевых узлов, подавляя пролиферативный потенциал опухолевых клеток и модулируя опухолевое микроокружение [7]. Данный эффект в сочетании с установленной нами ранее способностью СТА блокировать васкулогенную мимикрию клеток U87

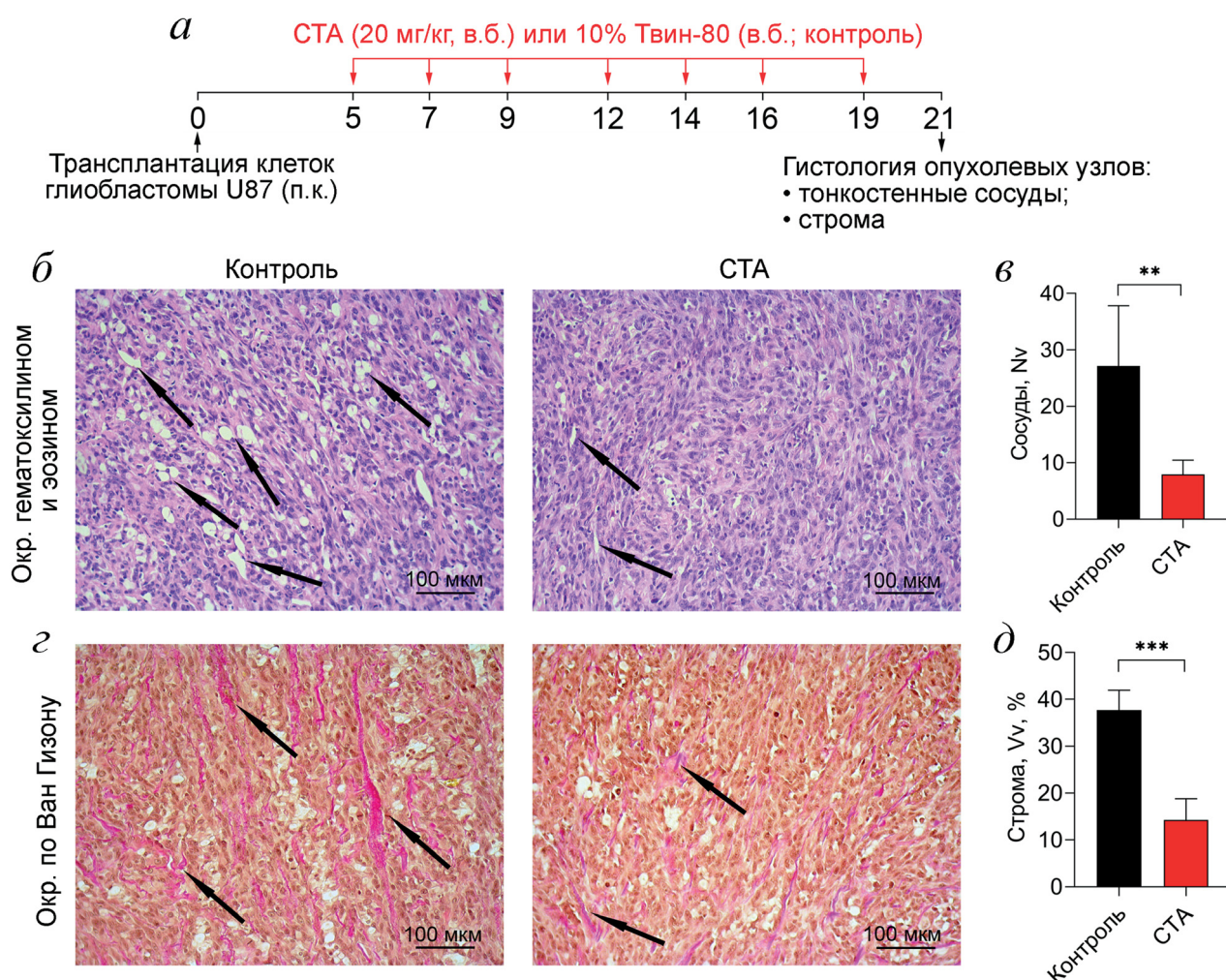


Рис. 5. Эффект СТА на содержание тонкостенных кровеносных сосудов и эластических волокон в опухолевой ткани на ксенографтной модели глиобластомы U87. *а* – Схема эксперимента. Мышам линии Nude подкожно трансплантировали клетки глиобластомы U87. На 5-й день роста опухоли мышам вводили соединение СТА или Tween-80. Всего было проведено 7 инъекций. На 21-й день роста опухоли мышей выводили из эксперимента. *б* – Гистологическое исследование опухолевых узлов. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. Черными стрелками указаны тонкостенные кровеносные сосуды. *в* – Количественная оценка содержания тонкостенных кровеносных сосудов в ткани глиобластомы U87. Nv – численная плотность структуры. *г* – Анализ соединительнотканых структур в опухолевых узлах. Окрашка по Ван Гизону. Увеличение $\times 200$. *д* – Количественная оценка содержания эластических волокон в ткани глиобластомы U87. Vv – объемная плотность структуры (%)

in vitro [7] побудили нас к проведению детального исследования эффекта СТА на интенсивность ангиогенеза в ткани МГБ на вышеуказанной мышинной модели.

Учитывая тесную морфологическую связь сосудистого и стромального компонентов опухоли, нами была проанализирована представленность не только тонкостенных кровеносных сосудов, но также соединительнотканых волокон в опухолевой ткани мышей с трансплантированной подкожно глиобластомой U87, получавших в.б. инъекции СТА в дозе 20 мг/кг или 10%-ный Tween-80, который использовали в качестве контроля. Схема эксперимента представлена на рис. 5, *а*.

При гистологическом исследовании было выявлено, что ткань глиобластомы U87 содер-

жит большое количество незрелых тонкостенных кровеносных сосудов, пронизывающих опухоль (рис. 5, *б*), численная плотность которых достоверно в 3,4 раза снижалась при терапии СТА по сравнению с контролем (рис. 5, *в*). Наблюдаемый эффект полностью согласуется с показанной нами ранее способностью СТА блокировать процесс формирования тубулярных структур клетками U87 *in vitro* (васкулогенная мимикрия) [7]. Кроме того, гистологическое исследование выявило обширную сеть соединительнотканых волокон в опухолевой ткани, представленность которой значительно обеднялась при введении исследуемого три-терпеноида (рис. 5, *г*): объемная плотность окрашенных по Ван Гизону волокон в экспериментальной группе оказалась в 2,7 раза ниже

по сравнению с контролем (рис. 5, *д*). Эти результаты полностью согласуются с выявленной ранее способностью СТА снижать содержание коллагеновых волокон в ткани глиобластомы U87 на мышинной модели [7].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учитывая высокий уровень злокачественности МГБ, определяемой не только усиленной клеточной пролиферацией, но также выраженной подвижностью опухолевых клеток, их инвазивностью и предрасположенностью к развитию лекарственной устойчивости [2], одним из многообещающих направлений в области создания новых классов антиглиобластомных препаратов является поиск и синтез соединений, способных оказывать не только прямое токсическое воздействие на клетки МГБ, но также блокировать их прометастатический фенотип [25]. В настоящей работе были продолжены исследования антиглиобластомного потенциала СТА, относящегося к группе полусинтетических пентациклических тритерпеноидов, несущих в кольце А цианоеноновый фармакофорный заместитель и обладающих выраженным комплексным фармакологическим эффектом в отношении опухолевой прогрессии, воспаления и повреждения тканей [20, 26, 27]. В ходе проведенного исследования было установлено, что СТА эффективно ингибирует рост клеток U87 в 3D-культуре (рис. 1, *в–е*), причем данный эффект был показан для цианоенон-содержащих тритерпеноидов впервые – в предыдущих работах антиглиобластомный потенциал соединений данного ряда был оценен лишь на монослойных моделях [28–30], и только в работах Zhou et al. [31], So et al. [32] и Murad et al. [33] был установлен блокирующий эффект CDDO-Me и CDDO-Im на рост сфероидов клеток рака молочной железы и простаты человека. Выявленная способность СТА ингибировать рост клеток U87 в сфероиде хорошо согласуется с его супрессивным эффектом на рост опухолевых узлов на мышинной гетеротопической ксенографтной модели глиобластомы U87, показанным нами ранее [7].

Помимо подавления сфероидного роста, наблюдаемый эффект СТА в отношении повышения адгезивности клеток U87 (рис. 2) также подтверждает его выраженный антиглиобластомный потенциал. Известно, что слабый уровень межклеточной адгезии опухолевых клеток связан с их мезенхимальным фенотипом и играет важную роль в метастазировании [34],

поэтому модулирование данной характеристики опухолевых клеток можно рассматривать в качестве перспективного направления в противоопухолевой терапии [35]. Показанная в настоящей работе способность СТА увеличивать межклеточную адгезию клеток U87 в трипсиновом тесте (рис. 2, *а*), с одной стороны, согласуется со схожим эффектом азиатиковой кислоты в отношении адгезивности клеток рака легких человека A549 [36], однако, с другой стороны, противоречит описанному в работе Tsai et al. [30] ингибирующему эффекту RTA-404 (аналог СТА) в отношении адгезионных свойств клеток U87. Данное несоответствие можно объяснить значительными отличиями в используемых концентрациях тритерпеноидов: в нашей работе эффект СТА был изучен в нетоксичном диапазоне концентраций (25–100 нМ) (рис. 2, *а*), тогда как в работе Tsai et al. [30] влияние RTA-404 на адгезивность клеток U87 исследовалось в концентрации 500 нМ, вызывающей гибель примерно 50% клеток, т.е. наблюдаемое снижение адгезивности клеток МГБ, стимулированных RTA-404, с высокой долей вероятности могло быть вызвано их апоптозом. Помимо межклеточной адгезии, СТА усиливал адгезивность клеток U87 к коллагену, моделирующему внеклеточный матрикс (рис. 2, *б*), что также свидетельствует в пользу его выраженного антиглиобластомного потенциала: ранее Ramaswamy et al. [37] показали подобный эффект в отношении адгезивности клеток U87 к желатину при действии U0126, селективного ингибитора ERK1/2, обладающего выраженными антиглиобластомными свойствами.

Наличие синергизма между цитотоксическими эффектами СТА и ТМЗ на модели клеток U87 (рис. 3, *б*), а также показанная нами ранее способность СТА эффективно накапливаться в тканях головного мозга мышей [7] говорят о потенциальной возможности введения исследуемого тритерпеноида в современные схемы химиотерапии МГБ, однако вызванное им усиление активности ALDH в клетках U87 (рис. 3, *в*) свидетельствует о необходимости тщательного подбора оптимальных дозировок и схем введения СТА. Активация ALDH в опухолевых клетках связана с их цитопротекторным ответом на ксенобиотики, электрофильный и окислительный стресс [38], являясь также ключевым маркером опухолевых стволовых клеток (ОСК) [39]. Учитывая наличие в структуре СТА электрофильного акцептора Михаэля (цианоеноновая группа), его стимулирующий эффект на продукцию активных форм кислорода в клетках U87,

показанный нами ранее [7], и способность ингибировать рост сфероидов клеток U87 (рис. 1, *в–е*), являющихся важным источником ОСК [40], мы предполагаем, что наблюдаемая активация ALDH под действием СТА (рис. 3, *в*) все же является следствием компенсационных механизмов в клетках МГБ в ответ на ксенобиотический стресс, а не маркером усиления их стволовых свойств, что требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

Проведенные гистологические исследования срезов опухолевой ткани глиобластомы U87 показали, что СТА способен воздействовать не только напрямую на опухолевые клетки, но и на опухолевое микроокружение, подавляя формирование в ней сети незрелых тонкостенных кровеносных сосудов (рис. 5, *в*), хаотичная разветвленная структура и высокая проницаемость которых формирует в опухолевой ткани очаги гипоксии, способствующие появлению высокозлокачественных клеток МГБ мезенхимального фенотипа, которые и определяют диффузный рост глиобластом [41]. Наблюдаемый супрессорный эффект СТА в отношении тонкостенных кровеносных сосудов, стенки которых представлены не только эндотелиоцитами, но и опухолевыми клетками [42], согласуется с его блокирующим воздействием на формирование тубулярных структур из клеток U87 (васкулогенная мимикрия) *in vitro*, показанный нами ранее [7]. Полученные данные в сочетании с выявленной ранее способностью СТА усиливать экспрессию маркеров зрелых сосудов α -SMA и CD31 в ткани глиобластомы U87 на ксенографтной модели *in vivo* [7] свидетельствуют о нормализации патологического ангиогенеза в опухолевой ткани, что может способствовать сокращению объемов гипоксических зон в ткани МГБ и, как результат, усилению ее чувствительности к химио- и радиотерапии [43]. Наряду с влиянием на рост тонкостенных кровеносных сосудов, СТА также снижал содержание в опухолевом микроокружении соединительнотканых волокон (рис. 5, *г* и *д*), высокая представленность которых формирует барьер для химиопрепаратов, питательных веществ, кислорода и иммунных клеток (иммунные ловушки), который снижает чувствительность клеток МГБ к химио-, радио- и иммунотерапии [44].

Согласно данным компьютерного моделирования, наблюдаемые антиглиобластомные эффекты СТА могут быть основаны на его прямом ингибирующем воздействии на EGFR, ERBB2 и AKT1 (рис. 4, *б* и *в*). Накопленные к настоящему моменту данные подтверждают способность цианоенон-содержащих тритер-

пеноидов эффективно ингибировать сигнальные пути EGFR, ERBB2 и AKT1 в различных опухолевых клетках [20, 45], в том числе в клетках глиобластомы [30, 46]. Более того, Liu et al. [47] экспериментально доказали прямую блокировку киназной активности AKT1 аналогом СТА CDDO-Me, Kim et al. [48] выявили способность CDDO-Me напрямую взаимодействовать с ERBB2, а в нашей недавней работе было установлено, что CDDO-Im способен взаимодействовать с активным центром EGFR с энергией связывания ниже энергии связывания известного ингибитора EGFR эрлотиниба [49]. Учитывая ключевую роль EGFR, ERBB2 и AKT1 в регуляции прогрессии МГБ [50–52], в том числе в приобретении клетками МГБ мезенхимального фенотипа и стволовых свойств [53, 54], выявленная с помощью *in silico* подходов способность СТА формировать комплексы с данными белками требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что СТА обладает выраженным антиглиобластомным потенциалом, опосредуемым как его прямым модулирующим воздействием на клетки МГБ, включая блокировку сфероидного роста, усиление адгезивности и синергичность цитотоксического эффекта с ТМЗ, так и нормализацией ряда параметров опухолевого микроокружения. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения его эффектов на приобретение клетками МГБ мезенхимального фенотипа и стволовых свойств и позволяют предложить СТА в качестве перспективного мультитаргетного антиглиобластомного кандидата.

Вклад авторов. А.В. Марков — концепция и руководство работой; К.В. Одаренко, А.В. Сенькова, А.А. Ильина — проведение экспериментов; А.В. Марков, А.В. Сенькова — обсуждение результатов исследования; А.В. Марков, К.В. Одаренко, А.В. Сенькова — написание текста; М.А. Зенкова — редактирование текста статьи и общее руководство исследованиями.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30011, <https://rscf.ru/project/19-74-30011/>) и базового бюджетного финансирования ИХБФМ СО РАН № 121031300044-5.

Благодарности. Авторы выражают особую признательность с.н.с., к.х.н. Саломатиной О.В. (НИОХ СО РАН) за предоставленный СТА и ведущему инженеру Владимировой А.В. (ИХБФМ СО РАН) за помощь в поддержании клеточных культур.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все эксперименты на мышинной модели проведены в соот-

ветствии с нормами обращения с животными, изложенными в Директиве Европейского Парламента и Совета ЕС 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. и «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г.). Все эксперименты на животных были одобрены межинститутской Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 56 от 10.08.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sanati, M., Binabaj, M. M., Ahmadi, S. S., Aminyavari, S., Javid, H., Mollazadeh, H., Bibak, B., Mohtashami, E., Jamialahmadi, T., Afshari, A. R., and Sahebkar, A. (2022) Recent advances in glioblastoma multiforme therapy: a focus on autophagy regulation, *Biomed. Pharmacother.*, **155**, 113740, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113740.
- Torrisi, F., Alberghina, C., D'Aprile, S., Pavone, A. M., Longhitano, L., Giallongo, S., Tibullo, D., Di Rosa, M., Zappalà, A., Cammarata, F. P., Russo, G., Ippolito, M., Cuttone, G., Li Volti, G., Vicario, N., and Parenti, R. (2022) The hallmarks of glioblastoma: heterogeneity, intercellular crosstalk and molecular signature of invasiveness and progression, *Biomedicines*, **10**, 806, doi: 10.3390/biomedicines10040806.
- Cha, G. D., Kang, T., Baik, S., Kim, D., Choi, S. H., Hyeon, T., and Kim, D.-H. (2020) Advances in drug delivery technology for the treatment of glioblastoma multiforme, *J. Control. Release*, **328**, 350-367, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.09.002.
- Qazi, M. A., Vora, P., Venugopal, C., Sidhu, S. S., Moffat, J., Swanton, C., and Singh, S. K. (2017) Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma, *Ann. Oncol.*, **28**, 1448-1456, doi: 10.1093/annonc/mdx169.
- Sestito, S., Runfola, M., Tonelli, M., Chiellini, G., and Rapposelli, S. (2018) New multitarget approaches in the war against glioblastoma: a mini-perspective, *Front. Pharmacol.*, **9**, 874, doi: 10.3389/fphar.2018.00874.
- Behl, T., Sharma, A., Sharma, L., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Zengin, G., Bungau, S., Toma, M. M., Gitea, D., Babes, E. E., Judea Pusta, C. T., and Bumbu, A. G. (2021) Current perspective on the natural compounds and drug delivery techniques in glioblastoma multiforme, *Cancers (Basel)*, **13**, 2765, doi: 10.3390/cancers13112765.
- Markov, A. V., Ilyina, A. A., Salomatina, O. V., Sen'kova, A. V., Okhina, A. A., Rogachev, A. D., Salakhutdinov, N. F., and Zenkova, M. A. (2022) Novel soloxolone amides as potent anti-glioblastoma candidates: design, synthesis, *in silico* analysis and biological activities *in vitro* and *in vivo*, *Pharmaceuticals*, **15**, 603, doi: 10.3390/ph15050603.
- Ianevski, A., Giri, A. K., and Aittokallio, T. (2020) SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies, *Nucleic Acids Res.*, **48**, W488-W493, doi: 10.1093/nar/gkaa216.
- Awale, M. and Reymond, J. L. (2019) Polypharmacology browser PPB2: target prediction combining nearest neighbors with machine learning, *J. Chem. Inf. Model.*, **59**, 10-17, doi: 10.1021/acs.jcim.8b00524.
- Daina, A., Michielin, O., and Zoete, V. (2019) SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules, *Nucleic Acids Res.*, **47**, W357-W364, doi: 10.1093/nar/gkz382.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K. P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L. J., and Von Mering, C. (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life, *Nucleic Acids Res.*, **43**, D447-D452, doi: 10.1093/nar/gku1003.
- Chin, C.-H., Chen, S.-H., Wu, H.-H., Ho, C.-W., Ko, M.-T., and Lin, C.-Y. (2014) cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome, *BMC Syst. Biol.*, **8**, S11, doi: 10.1186/1752-0509-8-S4-S11.
- Trott, O., and Olson, A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **31**, 455-461, doi: 10.1002/jcc.21334.
- Suhovskih, A. V., Kazanskaya, G. M., Volkov, A. M., Tsidulko, A. Y., Aidagulova, S. V., and Grigorieva, E. V. (2019) Suitability of RNALater solution as a tissue-preserving reagent for immunohistochemical analysis, *Histochem. Cell Biol.*, **152**, 239-247, doi: 10.1007/s00418-019-01799-z.
- Joseph, J. V., Balasubramanian, V., Walenkamp, A., and Krut, F. A. E. (2013) TGF- β as a therapeutic target in high grade gliomas – promises and challenges,

- Biochem. Pharmacol.*, **85**, 478-485, doi: 10.1016/j.bcp.2012.11.005.
16. Peñuelas, S., Anido, J., Prieto-Sánchez, R. M., Folch, G., Barba, I., Cuartas, I., García-Dorado, D., Poca, M. A., Sahuquillo, J., Baselga, J., and Seoane, J. (2009) TGF- β increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma, *Cancer Cell*, **15**, 315-327, doi: 10.1016/j.ccr.2009.02.011.
 17. Beri, P., Popravko, A., Yeoman, B., Kumar, A., Chen, K., Hodzic, E., Chiang, A., Banisadr, A., Placone, J. K., Carter, H., Fraley, S. I., Katira, P., and Engler, A. J. (2020) Cell adhesiveness serves as a biophysical marker for metastatic potential, *Cancer Res.*, **80**, 901-911, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-1794.
 18. Beltzig, L., Schwarzenbach, C., Leukel, P., Frauenknecht, K. B. M., Sommer, C., Tancredi, A., Hegi, M. E., Christmann, M., and Kaina, B. (2022) Senescence is the main trait induced by temozolomide in glioblastoma cells, *Cancers (Basel)*, **14**, 2233, doi: 10.3390/cancers14092233.
 19. Poturnajova, M., Kozovska, Z., and Matuskova, M. (2021) Aldehyde dehydrogenase 1A1 and 1A3 isoforms – mechanism of activation and regulation in cancer, *Cell. Signal.*, **87**, 110120, doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110120.
 20. Markov, A. V., Zenkova, M. A., and Logashenko, E. B. (2017) Modulation of Tumour-related signaling pathways by natural pentacyclic triterpenoids and their semisynthetic derivatives, *Curr. Med. Chem.*, **24**, 1277-1320, doi: 10.2174/0929867324666170112115313.
 21. McDowell, K. A., Riggins, G. J., and Gallia, G. L. (2011) Targeting the AKT pathway in glioblastoma, *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 2411-2420, doi: 10.2174/138161211797249224.
 22. Mure, H., Matsuzaki, K., Kitazato, K. T., Mizobuchi, Y., Kuwayama, K., Kageji, T., and Nagahiro, S. (2010) Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas, *Neuro. Oncol.*, **12**, 221-232, doi: 10.1093/neuonc/nop026.
 23. Yoon, H., Kim, D. J., Ahn, E. H., Gellert, G. C., Shay, J. W., Ahn, C.-H., and Lee, Y. B. (2009) Antitumor activity of a novel antisense oligonucleotide against Akt1, *J. Cell. Biochem.*, **108**, 832-838, doi: 10.1002/jcb.22311.
 24. Ochoa, D., Hercules, A., Carmona, M., Suveges, D., Gonzalez-Urriarte, A., Malangone, C., Miranda, A., Fumis, L., Carvalho-Silva, D., Spitzer, M., Baker, J., Ferrer, J., Raies, A., Razuvayevskaya, O., Faulconbridge, A., Petsalaki, E., Mutowo, P., Machlitt-Northen, S., Peat, G., McAuley, E., Ong, C. K., Mountjoy, E., Ghousaini, M., Pierleoni, A., Papa, E., Pignatelli, M., Koscielny, G., Karim, M., Schwartzen-truber, J., Hulcoop, D. G., Dunham, I., and McDonagh, E. M. (2021) Open Targets Platform: supporting systematic drug–target identification and prioritisation, *Nucleic Acids Res.*, **49**, D1302-D1310, doi: 10.1093/nar/gkaa1027.
 25. Bazan, N. G., Reid, M. M., Flores, V. A. C., Gallo, J. E., Lewis, W., and Belayev, L. (2021) Multi-prong control of glioblastoma multiforme invasiveness: blockade of pro-inflammatory signaling, anti-angiogenesis, and homeostasis restoration, *Cancer Metastasis Rev.*, **40**, 643-647, doi: 10.1007/s10555-021-09987-x.
 26. Liby, K. T., and Sporn, M. B. (2012) Synthetic oleanane triterpenoids: multifunctional drugs with a broad range of applications for prevention and treatment of chronic disease, *Pharmacol. Rev.*, **64**, 972-1003, doi: 10.1124/pr.111.004846.
 27. Sen'kova, A. V., Savin, I. A., Odarenko, K. V., Salomatina, O. V., Salakhutdinov, N. F., Zenkova, M. A., and Markov, A. V. (2023) Protective effect of soloxolone derivatives in carrageenan- and LPS-driven acute inflammation: Pharmacological profiling and their effects on key inflammation-related processes, *Biomed. Pharmacother.*, **159**, 114231, doi: 10.1016/j.biopha.2023.114231.
 28. Tsai, T.-H., Lieu, A.-S., Huang, T.-Y., Kwan, A.-L., Lin, C.-L., and Hsu, Y.-C. (2021) Induction of mitosis delay and apoptosis by CDDO-TFEA in glioblastoma multiforme, *Front. Pharmacol.*, **12**, 756228, doi: 10.3389/fphar.2021.756228.
 29. Tsai, T. H., Hsu, Y. C., Lieu, A. S., Huang, T. Y., Kwan, A. L., and Lin, C. L. (2021) RTA404, an activator of Nrf2, activates the checkpoint kinases and induces apoptosis through intrinsic apoptotic pathway in malignant glioma, *J. Clin. Med.*, **10**, 4805, doi: 10.3390/jcm10214805.
 30. Tsai, T.-H., Lieu, A.-S., Wang, Y.-W., Yang, S.-F., Hsu, Y.-C., and Lin, C.-L. (2021) Therapeutic potential of RTA 404 in human brain malignant glioma cell lines via cell cycle arrest via p21/AKT signaling, *Biomed Res. Int.*, **2021**, 5552226, doi: 10.1155/2021/5552226.
 31. Zhou, L., Wang, Z., Yu, S., Xiong, Y., Fan, J., Lyu, Y., Su, Z., Song, J., Liu, S., Sun, Q., and Lu, D. (2020) CDDO-Me elicits anti-breast cancer activity by targeting LRP6 and FZD7 receptor complex, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **373**, 149-159, doi: 10.1124/jpet.119.263434.
 32. So, J. Y., Lin, J. J., Wahler, J., Liby, K. T., Sporn, M. B., and Suh, N. (2014) A synthetic triterpenoid CDDO-Im inhibits tumorsphere formation by regulating stem cell signaling pathways in triple-negative breast cancer, *PLoS One*, **9**, e107616, doi: 10.1371/journal.pone.0107616.
 33. Murad, H. Y., Chandra, P. K., Kelly, C. A., Khurana, N., Yu, H., Bortz, E. P., Hong, S. N., Mondal, D., and Khismatullin, D. B. (2022) Pre-exposure to stress-inducing agents increase the anticancer efficacy of focused ultrasound against aggressive prostate cancer cells, *Antioxidants*, **11**, 341, doi: 10.3390/antiox11020341.

34. Le Bras, G. F., Taubenslag, K. J., and Andl, C. D. (2012) The regulation of cell–cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression, *Cell Adh. Migr.*, **6**, 365–373, doi: 10.4161/cam.21326.
35. Janiszewska, M., Primi, M. C., and Izard, T. (2020) Cell adhesion in cancer: beyond the migration of single cells, *J. Biol. Chem.*, **295**, 2495–2505, doi: 10.1074/jbc.REV119.007759.
36. Cui, Q., Ren, J., Zhou, Q., Yang, Q., and Li, B. (2019) Effect of asiatic acid on epithelial-mesenchymal transition of human alveolar epithelium A549 cells induced by TGF- β 1, *Oncol. Lett.*, **17**, 4285–4292, doi: 10.3892/ol.2019.10140.
37. Ramaswamy, P., Nanjaiah, N. D., and Borkotokey, M. (2019) Role of MEK-ERK signaling mediated adhesion of glioma cells to extracellular matrix: possible implication on migration and proliferation, *Ann. Neurosci.*, **26**, 52–56, doi: 10.5214/ans.0972.7531.260203.
38. Singh, S., Bocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B. C., Matsumoto, A., Thompson, D. C., and Vasiliou, V. (2013) Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **56**, 89–101, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010.
39. Rodriguez, S. M., Staicu, G.-A., Sevastre, A.-S., Baloi, C., Ciubotaru, V., Dricu, A., and Tataranu, L. G. (2022) Glioblastoma stem cells – useful tools in the battle against cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4602, doi: 10.3390/ijms23094602.
40. Wang, X., Zhou, W., Li, X., Ren, J., Ji, G., Du, J., Tian, W., Liu, Q., and Hao, A. (2020) Graphene oxide suppresses the growth and malignancy of glioblastoma stem cell-like spheroids via epigenetic mechanisms, *J. Transl. Med.*, **18**, 200, doi: 10.1186/s12967-020-02359-z.
41. Angara, K., Borin, T. F., and Arbab, A. S. (2017) Vascular mimicry: a novel neovascularization mechanism driving anti-angiogenic therapy (AAT) resistance in glioblastoma, *Transl. Oncol.*, **10**, 650–660, doi: 10.1016/j.tranon.2017.04.007.
42. Viallard, C., and Larrivée, B. (2017) Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets, *Angiogenesis*, **20**, 409–426, doi: 10.1007/s10456-017-9562-9.
43. Zheng, R., Li, F., Li, F., and Gong, A. (2021) Targeting tumor vascularization: promising strategies for vascular normalization, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **147**, 2489–2505, doi: 10.1007/s00432-021-03701-8.
44. Mohiuddin, E. and Wakimoto, H. (2021) Extracellular matrix in glioblastoma: opportunities for emerging therapeutic approaches, *Am. J. Cancer Res.*, **11**, 3742–3754.
45. Konopleva, M., Zhang, W., Shi, Y. X., McQueen, T., Tsao, T., Abdelrahim, M., Munsell, M. F., Johansen, M., Yu, D., Madden, T., Safe, S. H., Hung, M. C., and Andreeff, M. (2006) Synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces growth arrest in HER2-overexpressing breast cancer cells, *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 317–328, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0350.
46. Gao, X., Deeb, D., Jiang, H., Liu, Y., Dulchavsky, S. A., and Gautam, S. C. (2007) Synthetic triterpenoids inhibit growth and induce apoptosis in human glioblastoma and neuroblastoma cells through inhibition of prosurvival Akt, NF- κ B and Notch1 signaling, *J. Neurooncol.*, **84**, 147–157, doi: 10.1007/s11060-007-9364-9.
47. Liu, Y., Gao, X., Deeb, D., and Gautam, S. C. (2012) Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits Akt activity without affecting PDK1 kinase or PP2A phosphatase activity in cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 570–575, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.007.
48. Kim, E.-H. H., Deng, C., Sporn, M. B., Royce, D. B., Risingsong, R., Williams, C. R., and Liby, K. T. (2012) CDDO-methyl ester delays breast cancer development in Brca1-mutated mice, *Cancer Prev. Res.*, **5**, 89–97, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0359.
49. Markov, A. V., Odarenko, K. V., Ilyina, A. A., and Zenkova, M. A. (2022) Uncovering the anti-angiogenic effect of semisynthetic triterpenoid CDDO-Im on HUVECs by an integrated network pharmacology approach, *Comput. Biol. Med.*, **141**, 105034, doi: 10.1016/J.COMPBIOMED.2021.105034.
50. Westphal, M., Maire, C. L., and Lamszus, K. (2017) EGFR as a target for glioblastoma treatment: an unfulfilled promise, *CNS Drugs*, **31**, 723–735, doi: 10.1007/s40263-017-0456-6.
51. Majewska, E., and Szeliga, M. (2017) AKT/GSK3 β signaling in glioblastoma, *Neurochem. Res.*, **42**, 918–924, doi: 10.1007/s11064-016-2044-4.
52. Vitanza, N. A., Johnson, A. J., Wilson, A. L., Brown, C., Yokoyama, J. K., Künkele, A., Chang, C. A., Rawlings-Rhea, S., Huang, W., Seidel, K., Albert, C. M., Pinto, N., Gust, J., Finn, L. S., Ojemann, J. G., Wright, J., Orentas, R. J., Baldwin, M., Gardner, R. A., Jensen, M. C., and Park, J. R. (2021) Locoregional infusion of HER2-specific CAR T cells in children and young adults with recurrent or refractory CNS tumors: an interim analysis, *Nat. Med.*, **27**, 1544–1552, doi: 10.1038/s41591-021-01404-8.
53. Takashima, Y., Kawaguchi, A., and Yamanaka, R. (2019) Promising prognosis marker candidates on the status of epithelial–mesenchymal transition and glioma stem cells in glioblastoma, *Cells*, **8**, 1312, doi: 10.3390/cells8111312.
54. Barzegar Behrooz, A., Talaie, Z., Jusheghani, F., Łos, M. J., Klonisch, T., and Ghavami, S. (2022) Wnt and PI3K/Akt/mTOR survival pathways as therapeutic targets in glioblastoma, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 1353, doi: 10.3390/ijms23031353.

EVALUATION OF THE ANTITUMOR POTENTIAL OF SOLOXOLONE TRYPTAMIDE AGAINST GLIOBLASTOMA MULTIFORME USING *in silico*, *in vitro* AND *in vivo* APPROACHES

A. V. Markov*, K. V. Odarenko, A. V. Sen'kova, A. A. Ilyina, and M. A. Zenkova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: andmrkv@gmail.com

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly aggressive neoplasia characterized by uncontrollable diffusive growth, development of resistance to chemo- and radiotherapy and a high rate of recurrence that leads to low survival of patients with GBM. Given the number of signaling pathways regulating GBM pathogenesis, the development of novel anti-glioblastoma compounds based on multitarget natural metabolites is a promising direction for the study. In the current work, the antitumor potential of semisynthetic triterpenoid soloxolone tryptamide (STA) against human glioblastoma U87 cells was explored. It was found that STA effectively blocked the growth of U87 cells in 2D and 3D culture systems, enhanced the adhesiveness of tumor cells and displayed synergistic cytotoxicity with temozolomide. Performed *in silico* analysis revealed that the pronounced anti-glioblastoma activity of STA can be explained by its direct interaction with EGFR, ERBB2 and AKT1, which play an important role in the regulation of GBM malignancy. Along with observed direct modulatory action of STA on U87 cells, explored compound had a normalizing effect on the tumor microenvironment in murine heterotopic U87 xenograft model, suppressing the development of immature blood vessels and the production of elastin in tumor tissue. Taken together, obtained results clearly demonstrate that STA can be considered a novel promising antitumor candidate for GMB treatment.

Keywords: glioblastoma multiforme, cyanoenone pharmacophore, pentacyclic triterpenoids, spheroids, angiogenesis, synergistic effect, molecular docking, gene network, tumor microenvironment