

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-57-69>

Ген рецептора урокиназы *PLAUR* как регулятор экспрессии генов эпителиально-мезенхимального перехода и миграции клеток глиом и нейробластом

А.В. Ласица¹, М.И. Антипина¹, Д.А. Назарова¹, К.А. Рубина², В.Ю. Сысоева², Е.В. Семина^{1,2}

¹Лаборатория трансляционных исследований, ОНК «Институт медицины и наук о жизни», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта»; Россия, 236041 Калининград, ул. Университетская, 2;

²лаборатория морфогенеза и репарации тканей, Медицинский научно-образовательный институт, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ломоносовский пр-кт, 27, корп. 10

Контакты: Екатерина Владимировна Семина e-semina@yandex.ru

Введение. Белки урокиназной системы, включающие сериновую протеазу – урокиназу (uPA), ее рецептор (uPAR) и ингибиторы PAI-1 и PAI-2, играют ключевую роль в биологии опухолей, влияя на клеточную пролиферацию и рост опухоли, инвазию, метастазирование и ангиогенез. Несмотря на доказанную роль этих белков в канцерогенезе многих типов опухолей, до сих пор недостаточно изучены механизмы, лежащие в основе их действия, в том числе влияние на миграцию клеток, эпителиально-мезенхимальный переход и стволовость.

Цель исследования – оценить влияние гиперэкспрессии гена рецептора урокиназы *PLAUR* на экспрессию генов адгезии и стволовости и миграцию клеток глиомы и нейробластомы человека.

Материалы и методы. В исследовании использованы 2 клеточные линии глиомы человека (U87 и U251) и клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y. Для гиперэкспрессии гена *PLAUR* создана плаزمиды и проведена трансфекция опухолевых клеток. Для оценки относительной экспрессии генов использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени. Для оценки миграции клеток применяли тест на заживления раны (Wound Healing Assay) и анализ изображений в программе ImageJ с использованием плагина MRI Wound Healing Tool. Статистический анализ результатов выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v.10.

Результаты. Высокая экспрессия гена рецептора урокиназы *PLAUR* сопряжена с существенным повышением миграции клеток и сложными фенотипическими изменениями в клетках глиомы U251 с индукцией экспрессии генов *CD56*, *CDH1*, *CDH2*, *ZEB2*, *SOX2*; в клетках глиомы U87 с индукцией экспрессии генов *PLAU*, *CD56*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *SOX2*, *NANOG* и подавлением экспрессии генов *CDH2*; в клетках нейробластомы SH-SY5Y с индукцией экспрессии генов *CD56*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2*, *SOX2* и подавлением экспрессии гена урокиназы *PLAU* по сравнению с трансфицированными контрольной плазмидой pGFP клетками.

Заключение. Полученные результаты подчеркивают сложность регуляции процессов канцерогенеза с участием гена *PLAUR* и углубляют наше понимание биологии опухолей. Высокая экспрессия гена *PLAUR* в клетках опухоли усиливает их миграцию за счет индукции экспрессии генов *SNAI1/2* и *ZEB1/2* – ключевых транскрипционных факторов, инициирующих эпителиально-мезенхимальный переход.

Ключевые слова: рецептор урокиназы, *PLAUR*, uPAR, глиома, нейробластома, эпителиально-мезенхимальный переход, миграция клеток

Для цитирования: Ласица А.В., Антипина М.И., Назарова Д.А. и др. Ген рецептора урокиназы *PLAUR* как регулятор экспрессии генов эпителиально-мезенхимального перехода и миграции клеток глиом и нейробластом. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(3):57–69.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-57-69>

Urokinase receptor gene *PLAUR* as a regulator of epithelial-mesenchymal transition gene expression and migration of glioma and neuroblastoma cells

A.V. Lasitsa¹, M.I. Antipina¹, D.A. Nazarova¹, K.A. Rubina², V.Yu. Sysoeva², E.V. Semina^{1,2}

¹Laboratory of Translational Research, Institute of Medicine and Life Sciences, I. Kant Baltic Federal University; 2 Universitetskaya St., Kaliningrad 236041, Russia;

²Laboratory of Mechanisms of Morphogenesis and Tissue Repair, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University; Bld. 10, 27 Lomonosovsky Prospekt, Moscow 119234, Russia

Contacts: Ekaterina Vladimirovna Semina e-semina@yandex.ru

Introduction. The proteins of the urokinase system, including serine protease urokinase (uPA), its receptor (uPAR), and inhibitors PAI-1 and PAI-2, play a key role in tumor biology by influencing cellular proliferation and tumor growth, invasion, metastasis, and angiogenesis. Despite the established role of these proteins in the carcinogenesis of many tumor types, the mechanisms underlying their action, including their effects on cell migration, epithelial-mesenchymal transition, and stemness, remain insufficiently studied.

Aim. To evaluate the influence of the urokinase receptor gene *PLAUR* on the expression of adhesion and stemness genes, as well as on the migration of human glioma and neuroblastoma cells.

Materials and methods. The study utilized two human glioma cell lines, U87 and U251, and the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. To achieve the overexpression of the *PLAUR* gene, a non-viral plasmid was created, followed by the transfection of the cells. Relative gene expression was assessed using real-time polymerase chain reaction. For evaluating cell migration, a Wound Healing Assay was performed, with image analysis conducted using ImageJ software and MRI Wound Healing Tool. Statistical analysis of the results was carried out using GraphPad Prism v.10.

Results. High expression of the urokinase receptor gene *PLAUR* is associated with a significant increase in cell migration and complex phenotypic changes. Specifically, in U251 glioma cells, there is an induction of the expression of the genes *CD56*, *CDH1*, *CDH2*, *ZEB2*, and *SOX2*. In U87 glioma cells, the expression of the genes *PLAU*, *CD56*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *SOX2*, and *NANOG* is induced, while the expression of the gene *CDH2* is suppressed. In SH-SY5Y neuroblastoma cells, there is an induction of the expression of the genes *CD56*, *CDH1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI2*, and *SOX2*, along with a suppression of the expression of the urokinase gene *PLAU* compared to cells transfected with the control plasmid pGFP.

Conclusion. The results highlight the complexity of the regulation of carcinogenesis processes involving the *PLAUR* gene and deepen our understanding of tumour biology. High expression of the *PLAUR* gene may enhance the activity and invasion of tumor cells by regulating the epithelial-mesenchymal transition and altering the expression of key transcription factors.

Keywords: urokinase receptor, *PLAUR*, uPAR, glioma, neuroblastoma, epithelial-mesenchymal transition, cell migration

For citation: Lasitsa A.V., Antipina M.I., Nazarova D.A. et al. Urokinase receptor gene *PLAUR* as a regulator of epithelial-mesenchymal transition gene expression and migration of glioma and neuroblastoma cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(3):57–69. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-3-57-69>

ВВЕДЕНИЕ

Урокиназная система, включающая сериновую протеазу — урокиназу (uPA), ее высокоспецифичный рецептор (uPAR) и ингибиторы PAI-1 и PAI-2, активно регулирует процессы распада фибрина, восстановление тканей и реконструкцию внеклеточного матрикса [1]. Ген *PLAUR* у человека кодирует белок uPAR, играющий ключевую роль в ремоделировании тканей и деградации внеклеточного матрикса — процессов, которые способствуют инвазии и метастазированию злокачественных опухолей [2, 3]. Кроме того, uPAR может активировать ангиогенез, что обеспечивает опухоль необходимыми питательными веществами и кислородом для ее роста [2]. Результаты исследований показывают, что экспрессия *PLAUR* повышается в различных типах опухолей, в том числе в глиомах и нейробластомах, и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [4–8].

Глиомы представляют собой группу наиболее распространенных злокачественных опухолей центральной нервной системы [9]. Их лечение часто включает хирургическое вмешательство, лучевую и химиотерапию, однако прогноз при высокозлокачественных формах глиом остается неблагоприятным. Нейробластома представляет собой злокачественное новообразование с неясным механизмом спонтанной регрессии или дифференциации и в основном встречается у детей [10]. Клинические проявления этого заболевания неоднородны: его течение варьирует от благоприятного до тяжелого, с обширным метастазированием. Несмотря на увеличение 5-летней безрецидивной выживаемости, в различных подгруппах смертность при нейробластоме существенно различается [11]. Повышенные уровни экспрессии uPA и ее рецептора uPAR предсказывают неблагоприятные исходы и частые рецидивы у пациентов с данной опухолью [12].

Результаты исследований демонстрируют прямую связь между высокими концентрациями uPA и uPAR и степенью злокачественности опухолей, что подчеркивает их ключевую роль в патогенезе заболевания.

В процессе канцерогенеза эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) играет ведущую роль в приобретении инвазивного потенциала клетками глиом и нейробластом. Важным отличительным признаком ЭМП является изменение экспрессии трансмембранных гликопротеинов, участвующих в клеточной адгезии.

Результаты проведенных нами ранее исследований на клетках нейробластомы показали, что экспрессия uPAR необходима для поддержания их эпителиального фенотипа, а нокаут uPAR способствует ЭМП и усилению миграции клеток [1]. При этом подавление экспрессии uPAR коррелирует с дормантностью, химио-резистентностью (нечувствительностью к цисплатину и доксорубину) и образованием метастазов на мышинной модели *in vivo* [12]. Мы выявили, что изначально высокая экспрессия гена *PLAUR* предсказывает низкие показатели выживаемости при нейробластоме у человека, а при рецидивирующих нейробластомах наблюдается значительное понижение экспрессии гена *PLAUR*. В совокупности эти данные подчеркивают сложность регуляции процессов канцерогенеза, в которых участвует ген uPAR. Однако, несмотря на установленную патогенетическую роль экспрессии uPAR в различных типах опухолей, механизмы его действия, включая влияние на клеточную миграцию, ЭМП и стволовость, остаются недостаточно изученными.

Цель исследования – оценить влияние гиперэкспрессии гена рецептора урокиназы *PLAUR* на экспрессию генов адгезии и стволовости и миграцию клеток глиомы и нейробластомы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Для работы использованы клеточные линии мультиформной глиобластомы человека U251 и U87 и линия нейробластомы человека SH-SY5Y.

Клетки культивировали в полноценной среде роста Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), содержащей 4,5 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия), 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS; Capricorn Scientific, Германия) и раствор антибиотика/антимикотика (Capricorn Scientific, Германия; рабочая концентрация 100 мг/мл). Культивирование клеток проводили в клеточном инкубаторе при 37 °C и 5 % CO₂. Замену среды осуществляли по необходимости, но не реже чем 1 раз в 3 дня. При достижении 80–90 % конfluenceности клетки пассировали. Для этого среду удаляли, клетки однократно промывали раствором PBS (phosphate buffered saline; Capricorn Scientific, Германия) и инкубировали 3–5 мин в 1 % растворе трипсина (Capricorn Scientific, Германия). Для дезагрегации раствор с клетками и полноценной средой роста пипетировали и рассаживали на новые культуральные чашки в соотношении 1:4–1:5.

Получение плазмиды для гиперэкспрессии гена рецептора урокиназы. Ген uPAR *PLAUR* выделяли из матричной РНК (мРНК) нормальных фибробластов человека (первичная культура фибробластов любезно предоставлена коллегами с факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова). Матричную РНК uPAR амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью специфических праймеров, содержащих сайты рестрикции BmtI и SalI (*PLAUR_amplicon*) (табл. 1) с последующим лигированием по липким концам. Для вектора, содержащего комплементарную ДНК (кДНК) uPAR (плазмида pPLAUR), использовали коммерческую плазмиду AddGene (кат. № 178310), содержащую ген зеленого флуоресцентного белка для оценки трансфекции и работы вектора. Для создания липких концов у вставки и вектора проведена двойная рестрикция плазмиды pTYF-EF1a-hIRES-EGFP и ампликона с геном *PLAUR*. Рестрикция выполнена с использованием ферментов BmtI (сайт узнавания – GCTAG↑C/C↓GATCG) и SalI (сайт узнавания – G↑TCGAC/CAGCT↓G) (SibEnzyme, Россия). Лигирование проводили с помощью T4 ДНК лигазы (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для реакции использован буфер 5X Quick ligation, позволяющий осуществлять быстрое лигирование. Итоговые соотношения вставки и вектора рассчитаны с помощью программы NEBioCalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>), которая учитывает количество и длину фрагментов. В качестве контроля GFP использована плазмида pTYF-EF1a-EGFP (pGFP).

Для подтверждения правильности встраивания *PLAUR* в вектор использовали секвенирование по Сэнгеру. Для этого к последовательности гена *PLAUR* подобраны 3 праймера (Seq_1, Seq_2, Seq_3), позволяющие прочитать *PLAUR* полностью. Секвенирующую реакцию проводили в объеме 10 мкл (1 мкл – 2.5x BigDye premix; 1,5 мкл – 5x Sequencing Buffer; 0,5 мкл PCR-grade DMSO (Thermo Fisher Scientific, США)), 1 мкг плазмиды pTYF-EF1a-PLAUR-hIRES-EGFP (pPLAUR) с добавлением 10 мкМ праймера. Последовательности праймеров для секвенирования представлены в табл. 1. Амплификацию проводили с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Перед секвенированием образцы были очищены с помощью набора D-Pure™ Dye Terminator Removal Kit (NimaGen, Нидерланды).

Очищенные продукты амплификации секвенировали на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500/3500xL (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные результаты визуализированы в программе SnapGene 7.1.1 для оценки качества хроматограмм и выровнены в программе NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для определения правильного встраивания вставки в вектор.

Трансфекция опухолевых клеток. Клеточные линии U251, U87 и SH-SY5Y рассажены на 24-луночный планшет (Servicebio, Китай) и культивировались при 37 °C и 5 % CO₂. Для трансфекции использовали реагент

Таблица 1. Характеристика праймеров, используемых в исследовании

Table 1. Characteristics of the primers used in the study

Ген Gene	Праймер Primer	Последовательность Sequence	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C
PLAUR_amplicon	Forward_BmtI	TAATGCTAGCATGGGTCACCCGCCG	58
	Reverse_SaII	TATTGTCGACTTAGGTCCAGAGGAGAGTGCCT	
Seq_1	Forward	CAGACAGTGGTTCAAAGTTT	54
Seq_2	Forward	TTACCTCGAATGCATTTCTT	
Seq_3	Forward	TCACGAACCGAAAAACCAA	
PLAUR	Forward	CCACTCAGAGAAGACCAACAGG	59
	Reverse	GTAACGGCTTCGGGAATAGGTG	
PLAU	Forward	GGCTTAAACTCCAACACGCAAGG	59
	Reverse	CCTCCTTGGAACGGATCTTCAG	
CD44	Forward	CCAGAAGGAACAGTGGTTTGGC	59
	Reverse	ACTGTCCTCTGGGCTTGGTGTT	
CD56	Forward	CATCACCTGGAGGACTTCTACC	59
	Reverse	CAGTGTAAGTGGATGCTCTTCAGG	
CDH1	Forward	GGCTGGACCGAGAGAGTTTC	55
	Reverse	ACGACGTTAGCCTCGTTCTC	
CDH2	Forward	ATGGGAAATGGAACTTGATGGC	57
	Reverse	CAGTTGCTAAACTTCACTGAAAGG	
ZEB1	Forward	GGCATAACCTACTCAACTACGG	59
	Reverse	TGGGCGGTGTAGAATCAGAGTC	
ZEB2	Forward	AATGCACAGAGTGTGGCAAGGC	59
	Reverse	CTGCTGATGTGCGAACTGTAGG	
SNAI1	Forward	GCGAGCTGCAGGACTCTAAT	61
	Reverse	CATCTGACAGGGAGGTCAGC	
SNAI2	Forward	ATCTGCGGCAAGGCGTTTTCCA	61
	Reverse	GAGCCCTCAGATTTGACCTGTC	
NANOG	Forward	CTCCAACATCCTGAACCTCAGC	59
	Reverse	CGTCACACCATTGCTATTCTTCG	
SOX2	Forward	GAAGGATAAGTACACGCTGC	63
	Reverse	GTTCATTGTGCGGTAACGTG	
c-Myс	Forward	CCTGGTGCTCCATGAGGAGAC	63
	Reverse	CAGACTCTGACCTTTTGCCAGG	
ACTB	Forward	CTTCCGCTCGGCTGTTTTTC	59
	Reverse	GGCCTTACGTCTGCGGAT	

Invitrogen™ Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) и клетки, достигшие 50–60 % конfluenceности. Также применяли плазмиду pPLAUR для гиперэкспрессии гена *PLAUR* и контрольную плазмиду pGFP; для каждого типа клеток проведены 6 биологических повторов. Трансфекцию выполняли по протоколу Invitrogen (США). В день трансфекции полноценная среда для культивирования клеток была заменена на среду DMEM («Панэко», Россия), не содержащую сыворотки и антибиотика. Для каждой точки трансфекции подготовлены 2 реакции – с плазмидой pPLAUR/pGFP и DMEM (на общий объем 50 мкл брали 1 мкг плазмиды) и с Lipofectamine 2000 и DMEM (на общий объем 50 мкл брали 1 мкл трансфектанта). Через 5 мин инкубации раствор, содержащий плазмиду, смешивали с раствором, содержащим Lipofectamine 2000, и полученную смесь инкубировали 20 мин. Далее полученный комплекс аккуратно вносили к клеткам и инкубировали в течение 12 ч. По истечении этого времени клеткам меняли среду на полноценную и не позднее чем через 48 ч после трансфекции анализировали экспрессию генов интереса в клетках и миграцию клеток *in vitro* (Wound Healing Assay).

Выделение РНК из клеток. Тотальную РНК из клеток выделяли с использованием реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Далее выделенную РНК конвертировали в кДНК с использованием метода обратной транскрипции. Для получения кДНК применяли 1 мкг тотальной РНК. Реакцию проводили с использованием фермента обратной транскриптазы MMLV (ЗАО «Евроген», Россия) и праймеров Oligo(dT) в соответствии с протоколом производителя.

Оценка экспрессии генов в клетках. Оценена экспрессия ряда генов, кодирующих белки, участвующие в процессах ЭМП, адгезии и поддержании стволовости клеток опухоли. Исследованные гены, сгруппированные по их функциональным характеристикам и роли в опухолевом процессе, представлены в табл. 2.

Экспрессия мРНК генов оценена с помощью ПЦР в реальном времени и реагента 2X qPCRmix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Для анализа экспрессии генов урокиназной системы *PLAUR* и *PLAU*, клеточной адгезии (*CD44*, *CD56*), ЭМП (*CDH1*, *CDH2*, *ZEB1/2*, *SNAI1/2*) и стволовости (*SOX2*, *NANOG*, *c-Myc*) подобраны праймеры с использованием онлайн-сервиса Primer-Blast NCBI и дополнительных инструментов проверки правильности подбора праймеров (T_m Calculator (Thermo Fisher Scientific, США) и Oligonucleotide Properties Calculator). Для увеличения специфичности к кДНК праймеры отобраны таким образом, чтобы как минимум 1 последовательность из пары лежала на сочленении экзонов. Последовательность используемых праймеров представлена в табл. 1. Предварительную денатурацию кДНК проводили при 95 °С в течение 30 с, далее выполняли денатурацию при 95 °С в течение 30 с, отжиг праймеров 30 с при температуре, указанной для соответствующего праймера (см. табл. 1),

и элонгацию при 72 °С в течение 30 с. Для нормирования данных использовали ген домашнего хозяйства *ACTB*, относительно которого рассчитан показатель ΔCt. Значения Ct целевых генов определены эмпирически в ходе подготовительных оценочных экспериментов и варьировали от 26 до 38 циклов, что соответствует различным уровням экспрессии. Показатель ΔCt позволяет нормировать значения Ct целевого гена на референсный ген. Относительный уровень транскрипта рассчитан с использованием метода $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Оценка миграции клеток *in vitro* (Wound Healing Assay). Для исследования миграции клеток проведен тест «заживление раны» *in vitro*. Перед экспериментом клетки находились в состоянии депривации в течение суток. В каждой лунке делали царапину стерильным наконечником объемом 1000 мкл. После этого клеткам меняли среду на новую и помещали их в систему визуализации живых клеток в реальном времени JuLi Stage. Во время эксперимента в системе поддерживали стандартные условия культивирования клеток – 5 % CO₂ и 37 °С. Система визуализации осуществляла центральную съемку 3 полей зрения в каждой лунке в течение 48 ч. Скорость миграции клеток оценивали с использованием программы ImageJ и плагина MRI Wound Healing Tool с помощью вычисления процента площади царапины/раны через 0–24–48 ч для клеток глиомы U251, U87 и 0–12–24 ч для клеток нейробластомы SH-SY5Y с учетом их быстрой скорости базовой миграции. Для каждой экспериментальной точки подсчитаны не менее 4 лунок по 3 поля зрения в лунке.

Статистический анализ. Полученные данные об относительной экспрессии генов обработаны в программе GraphPad Prism (версия 10.3.0). Выбывающиеся из общей выборки показатели Ct предварительно были удалены. Показатели нормальности и значимость различий в уровнях транскрипции генов рассчитаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA – тест Dunnett). Различия между сравниваемыми выборками считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Все результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) ± стандартное отклонение.

Для анализа миграции опухолевых клеток с использованием программы ImageJ рассчитаны средние значения для временных интервалов, после чего значения на 12, 24 или 48 ч делили на контрольные значения на 0 ч и выражали в процентах для оценки относительного изменения миграции. Затем полученные результаты были перенесены в программу GraphPad Prism (версия 10.3.0) для дальнейшего анализа и визуализации. Статистический анализ проводили с использованием параметрического анализа one-way ANOVA – тест Tukey. Различия между сравниваемыми выборками считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены как средняя остаточная площадь раны через 24 ч (12 ч для клеток нейробластомы SH-SY5Y) в процентах от исходной площади раны в 0 ч.

Таблица 2. Характеристика исследуемых генов [13–18]

Table 2. Characteristics of the studied genes [13–18]

Ген Gen	Кодируемый белок Coded protein	Функциональная группа Functional group	Роль в опухолевом процессе Role in tumor growth
<i>PLAUR</i>	Рецептор урокиназы (uPAR) Urokinase receptor (uPAR)	Ремоделирование внеклеточного матрикса, инвазия Extracellular matrix remodeling, invasion	Активирует миграцию, инвазию клеток и эпителиально-мезенхимальный переход Activates migration, cell invasion and epithelial-mesenchymal transition
<i>PLAU</i>	Урокиназа (uPA) Urokinase (uPA)	Активация плазминогена, протеолиз, инвазия Plasminogen activation, proteolysis, invasion	Активирует плазминоген, способствует деградации матрикса и миграции клеток Activates plasminogen, promotes matrix degradation and cell migration
<i>CDH1</i>	Е-кадгерин E-cadherin	Межклеточная адгезия, поддержание эпителиального фенотипа Intercellular adhesion, maintenance of epithelial phenotype	Обеспечивает межклеточную адгезию, снижение экспрессии связано с активацией эпителиально-мезенхимального перехода Mediates intercellular adhesion, lowered expression is associated with activation of epithelial-mesenchymal transition
<i>CDH2</i>	N-кадгерин N-cadherin	Межклеточная адгезия, поддержание мезенхимального фенотипа Intercellular adhesion, maintenance of epithelial phenotype	Обеспечивает межклеточную адгезию, повышение экспрессии связано с активацией эпителиально-мезенхимального перехода, стимулирует инвазию и миграцию клеток Mediates intercellular adhesion, increased expression is associated with activation of epithelial-mesenchymal transition, stimulates cell invasion and migration
<i>ZEB1, ZEB2</i>	ZEB1, ZEB2	Транскрипционные факторы эпителиально-мезенхимального перехода Transcription factors of epithelial-mesenchymal transition	Напрямую подавляют экспрессию гена <i>CDH1</i> и активируют эпителиально-мезенхимальный переход Directly suppress <i>CDH1</i> gene expression and activate epithelial-mesenchymal transition
<i>SNAI1, SNAI2</i>	SNAI1, SNAI2	Транскрипционные факторы эпителиально-мезенхимального перехода Transcription factors of epithelial-mesenchymal transition	Подавляют экспрессию генов эпителиального фенотипа, активируют эпителиально-мезенхимальный переход Suppress expression of epithelial phenotype genes, activate epithelial-mesenchymal transition
<i>CD44</i>	CD44 (рецептор гиалуроновой кислоты) CD44 (hyaluronic acid receptor)	Молекула адгезии Adhesion molecule	Участвует в клеточной адгезии, миграции, поддерживает стволовые свойства клеток и способствует инвазии Participates in cell adhesion, migration, supports stem-like properties of the cells and promotes invasion
<i>CD56 (NCAM)</i>	NCAM, молекула адгезии нервных клеток NCAM, neural cell adhesion molecule	Молекула адгезии Adhesion molecule	Ассоциирован с поддержанием стволовых свойств клеток Associated with maintenance of stem-like properties of the cells
<i>SOX2, NANOG, c-Мyc</i>	SOX2, NANOG, c-Мyc	Транскрипционные факторы, маркеры стволовости Transcription factors, stemness markers	Поддерживают плюрипотентность и самообновление опухолевых клеток Maintain pluripotency and self-renewal of tumor cells

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение опухолевых клеток, гиперэкспрессирующих ген *PLAUR*. В исследовании использованы клеточные линии глиомы U251, U87 и нейробластомы SH-SY5Y человека, гиперэкспрессирующие ген *PLAUR*. Гиперэкспрессию этого гена определяли методом ПЦР в реальном времени до и после трансфекции клеточ-

ных линий плазмидами для гиперэкспрессии *PLAUR* рPLAUR и контрольной плазмидой рGFP. В результате трансфекции плазмидой рPLAUR экспрессия гена *PLAUR* в клетках глиомы U251 увеличилась в 3,4 раза, в клетках глиомы U87 – в 20 раз, в клетках SH-SY5Y – в 234 раза по сравнению с клетками рGFP, трансфицированными контрольной плазмидой GFP (рис. 1).

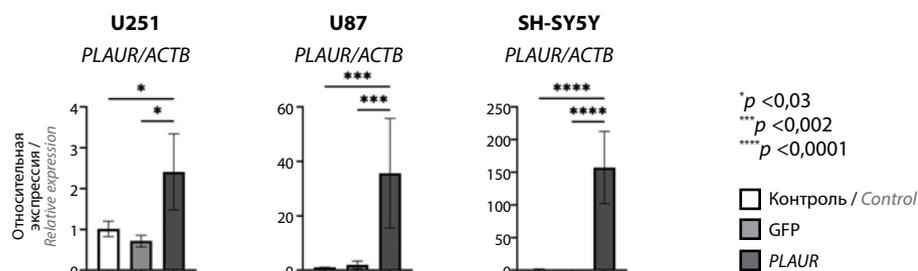


Рис. 1. Экспрессия гена *PLAUR* в клеточных линиях глиомы U251, U87 и нейробластомы SH-SY5Y. Относительная экспрессия гена *PLAUR* нормирована на референсный ген *ACTB*. В качестве контроля использовали нетрансфицированные клетки. GFP – клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; *PLAUR* – клетки после трансфекции плазмидой p*PLAUR*. Результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) ± стандартное отклонение. Статистический анализ параметрических данных проведен с помощью one-way ANOVA – теста Dunnett

Fig. 1. *PLAUR* gene expression in glioma cell lines U251, U87 and neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Relative expression of *PLAUR* gene is normalized by *ACTB* reference gene. Non-transfected cells were used as control. GFP – cells after transfection with pGFP control plasmid; *PLAUR* – cells after transfection with p*PLAUR* plasmid. Results are presented as mean (3 biological replicates) ± standard deviation. Statistical analysis of parametric data was performed using one-way ANOVA, Dunnett test

Влияние экспрессии гена *PLAUR* на экспрессию генов адгезии, эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клетках глиомы и нейробластомы человека. Далее проведена оценка экспрессии генов адгезии, ЭМП и стволовости до и после индукции экспрессии гена *PLAUR*. В клетках глиомы U251 индукция

экспрессии гена *PLAUR* привела к увеличению экспрессии гена адгезии *CD56* в 2,78 раза, гена ЭМП *CDH1* – в 5,5 раза, *CDH2* – в 6,9 раза, *ZEB2* – в 2,5 раза, гена стволовости *SOX2* – в 19,2 раза по сравнению с клетками, трансфицированными контрольной плазмидой pGFP (рис. 2). Статистически значимых разли-

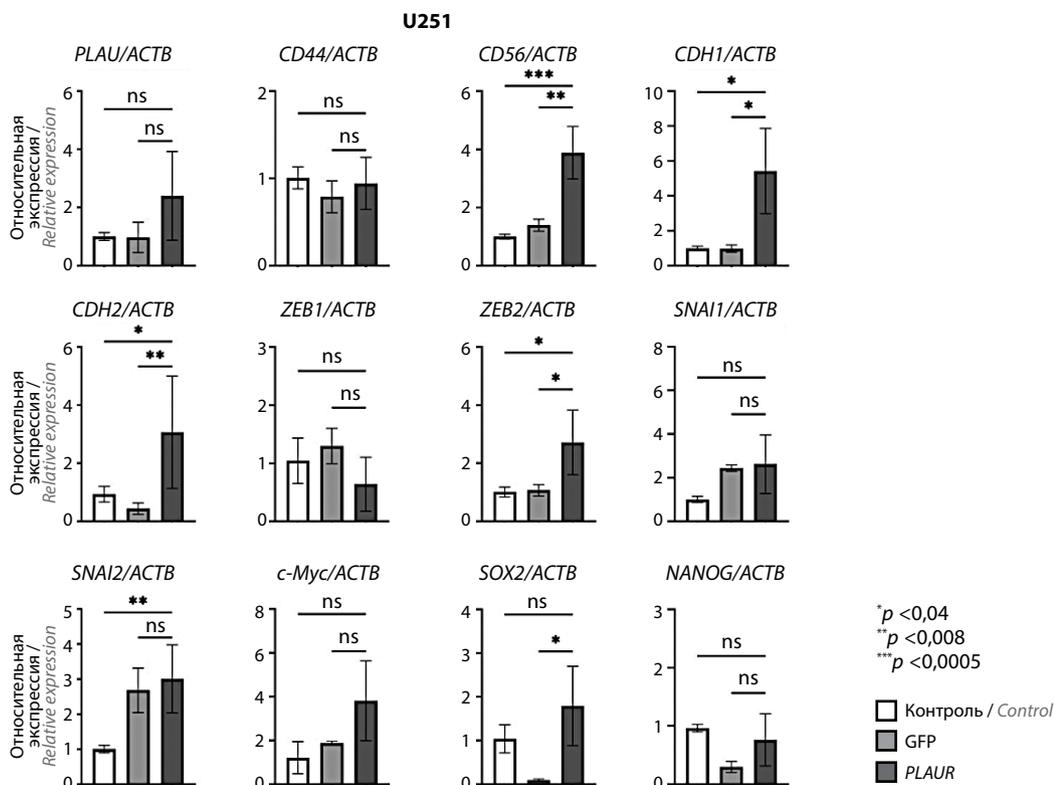


Рис. 2. Экспрессия генов адгезии, эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клеточной линии глиомы U251. Относительная экспрессия генов нормирована на референсный ген *ACTB*. Контроль – нетрансфицированные клетки; GFP – клетки после трансфекции контрольной плазмидой pGFP; *PLAUR* – клетки после трансфекции плазмидой p*PLAUR*; различия статистически незначимы. Результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) ± стандартное отклонение. Статистический анализ параметрических данных проведен с помощью one-way ANOVA – теста Dunnett

Fig. 2. Expression of genes of adhesion, epithelial-mesenchymal transition and stemness in glioma cell line U251. Relative gene expression was normalized by *ACTB* reference gene. Control – non-transfected cells; GFP – cells after transfection with pGFP control plasmid; *PLAUR* – cells after transfection with p*PLAUR* plasmid; differences are not statistically significant. Results are presented as mean (3 biological replicates) ± standard deviation. Statistical analysis of parametric data was performed using one-way ANOVA, Dunnett test

чий в экспрессии генов *PLAU*, *CD44*, *ZEB1*, *SNAI1*, *SNAI2*, *c-Myc* и *NANOG* до и после индукции экспрессии гена *PLAUR* обнаружено не было.

В клетках глиомы U87 индукция экспрессии гена *PLAUR* привела к увеличению экспрессии гена адгезии *CD56* в 5,22 раза, гена ЭМП *CDH1* – в 4,76 раза, *ZEB1* – в 4 раза, *ZEB2* – в 7,7 раза, *SNAI1* – в 2,4 раза, *SNAI2* – в 2 раза, гена стволовости *SOX2* – в 3,74 раза, *NANOG* – в 8,9 раза по сравнению с клетками pGFP (рис. 3). Также наблюдалось значимое увеличение экспрессии гена *PLAU* в 2,35 раза и значимое снижение экспрессии гена *CDH2* в 0,31 раза. Статистически значимых различий в экспрессии генов *CD44* и *c-Myc* до и после индукции экспрессии гена *PLAUR* обнаружено не было.

В клетках нейробластомы SH-SY5Y индукция экспрессии гена *PLAUR* привела к увеличению экспрессии гена адгезии *CD56* в 4,8 раза, гена ЭМП *CDH1* – в 2,15 раза, *ZEB1* – в 2,21 раза, *ZEB2* – в 3,3 раза, *SNAI2* – в 3,5 раза, гена стволовости *SOX2* – в 3,11 раза по сравнению с клетками pGFP (рис. 4). Также наблюдалось значимое снижение экспрессии гена *PLAU*

в 0,35 раза. Статистически значимых различий в экспрессии генов *CD44*, *CDH2*, *SNAI1*, *c-Myc* и *NANOG* до и после индукции экспрессии гена *PLAUR* обнаружено не было.

Результаты оценки экспрессии анализируемых генов в клеточных линиях (глиомы U87 и U251 и нейробластомы SH-SY5Y) при гиперэкспрессии *PLAUR* представлены в табл. 3, где приведены только данные, которые статистически значимо отличаются от соответствующих контрольных значений, полученных на клетках, трансфицированных контрольной плазмидой pGFP.

Регуляция миграции клеток опухоли экспрессией гена *PLAUR*. После индукции экспрессии гена *PLAUR* клетки глиобластомы U251 и U87 и нейробластомы SH-SY5Y демонстрировали значимо более высокую подвижность по сравнению с нетрансфицированными клетками (группа контроля) и клетками, трансфицированными контрольной плазмидой pGFP (рис. 5–7).

Так, в клетках глиомы U251, гиперэкспрессирующих *PLAUR*, площадь раны через 48 ч статистически значимо уменьшилась на 70 % по сравнению с исходным

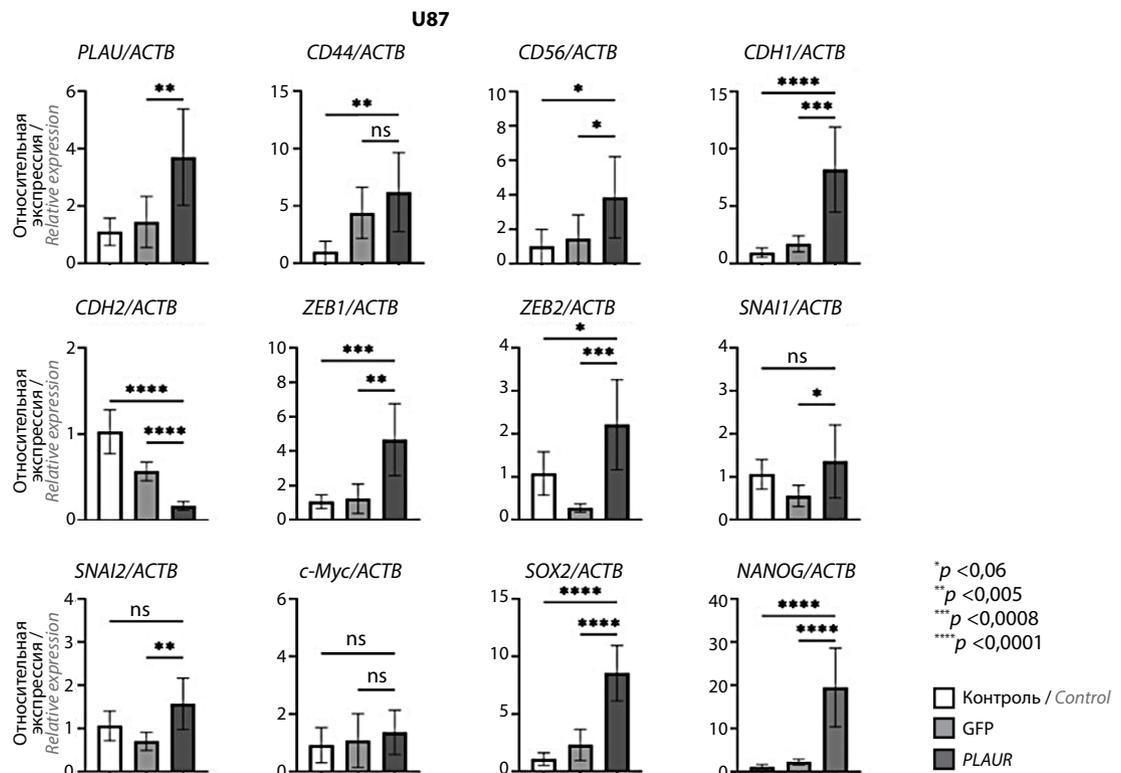


Рис. 3. Экспрессия генов адгезии, эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клеточной линии глиомы U87. Относительная экспрессия генов нормирована на референсный ген *ACTB*. Контроль – нетрансфицированные клетки; GFP – клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; PLAUR – клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; различия статистически незначимы. Результаты представлены как среднее (3 биологических повторения) \pm стандартное отклонение. Статистический анализ параметрических данных проведен с помощью one-way ANOVA – теста Dunnett

Fig. 3. Expression of genes of adhesion, epithelial-mesenchymal transition and stemness in glioma cell line U87. Relative gene expression was normalized by *ACTB* reference gene. Control – non-transfected cells; GFP – cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR – cells after transfection with pPLAUR plasmid; differences are not statistically significant. Results are presented as mean (3 biological replicates) \pm standard deviation. Statistical analysis of parametric data was performed using one-way ANOVA, Dunnett test

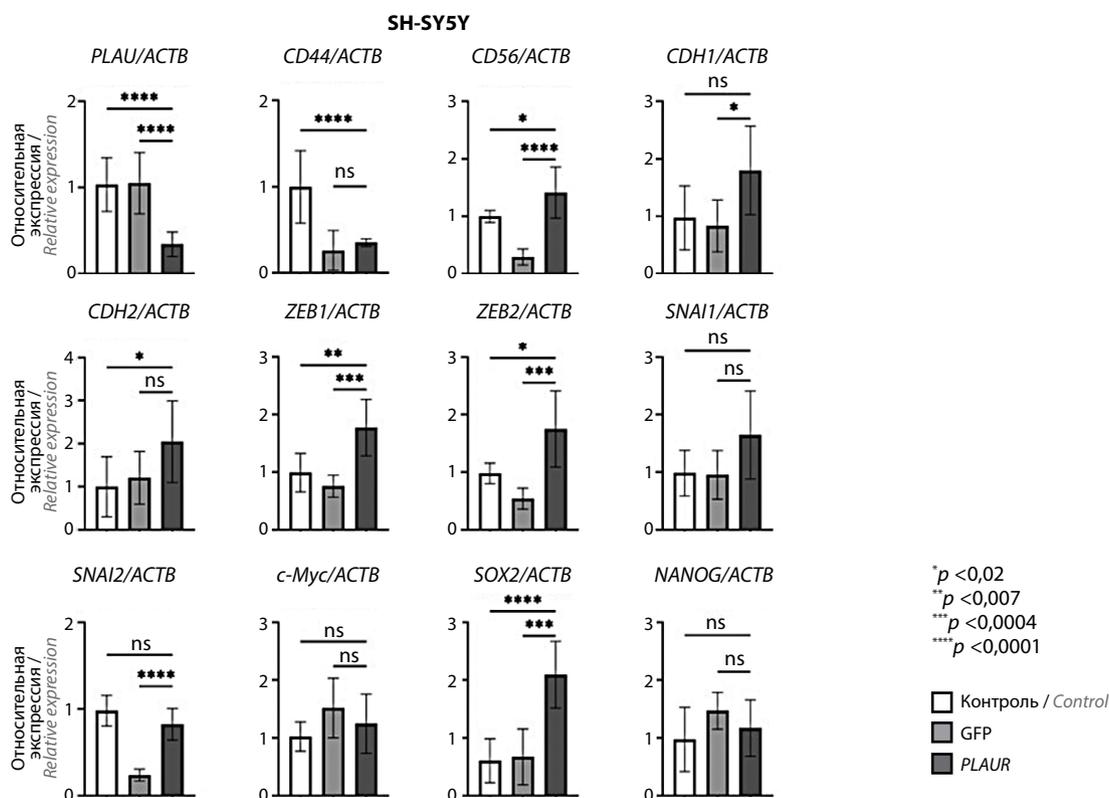


Рис. 4. Экспрессия генов адгезии, эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости в клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y. Относительная экспрессия генов нормирована на референсный ген ACTB. Контроль – нетрансфицированные клетки; GFP – клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; PLAUR – клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; ns – различия статистически незначимы. Результаты представлены как среднее (3 биологических повтора) ± стандартное отклонение. Статистический анализ параметрических данных проведен с помощью one-way ANOVA – теста Dunnett

Fig. 4. Expression of genes of adhesion, epithelial-mesenchymal transition and stemness in neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Relative gene expression was normalized by ACTB reference gene. Control – non-transfected cells; GFP – cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR – cells after transfection with pPLAUR plasmid; differences are not statistically significant. Results are presented as mean (3 biological replicates) ± standard deviation. Statistical analysis of parametric data was performed using one-way ANOVA, Dunnett test

значением. В контрольных клетках площадь сократилась на 32 % по сравнению с исходным значением (см. рис. 5, а). В клетках pGFP, трансфицированных контрольной плазмидой, площадь раны через 48 ч уменьшилась на 36 %. Клетки глиомы U251, гиперэкспрессирующие PLAUR, показали статистически значимо большую миграционную активность (в 2 раза выше) по сравнению с клетками pGFP через 48 ч и клетками группы контроля через 24 и 48 ч после начала эксперимента (см. рис. 5, б).

В клетках глиомы U87, гиперэкспрессирующих PLAUR, площадь раны через 48 ч статистически значимо уменьшилась на 87 % по сравнению с исходным значением. В контрольных клетках через 48 ч площадь раны уменьшилась на 35 % по сравнению с начальным значением (см. рис. 6, а). В клетках pGFP наблюдалось снижение площади раны на 69 % за 48 ч. Клетки глиомы U87, гиперэкспрессирующие PLAUR, показали большую миграционную активность по сравнению с клетками pGFP (в 1,5 раза выше) и группой контроля

(в 2 раза выше) через 24 и 48 ч после начала эксперимента (см. рис. 4, б).

При анализе миграции гиперэкспрессирующих PLAUR клеток нейробластомы SH-SY5Y обнаружено значимое снижение площади раны на 55 % от исходного значения через 24 ч. В контрольных клетках нейробластомы площадь раны сократилась на 31 % по сравнению с исходным значением (см. рис. 7, а). В клетках pGFP, трансфицированных контрольной плазмидой pGFP, площадь раны сократилась на 30 % за тот же период. Оценку миграции клеток нейробластомы проводили через 12 и 24 ч, поскольку эти клетки обладают повышенной подвижностью и уже через 48 ч полностью закрывают царапину, формируя монослой. Клетки нейробластомы SH-SY5Y, гиперэкспрессирующие PLAUR, показали статистически значимо большую миграционную активность по сравнению с клетками pGFP (в 1,5 раза выше) и группы контроля (в 1,7 раза выше) через 12 и 24 ч после начала эксперимента (см. рис. 7, б).

Таблица 3. Изменения экспрессии генов в клеточных линиях глиомы U87 и U251 и нейробластомы SH-SY5Y при гиперэкспрессии гена PLAUR

Table 3. Changes in gene expression in glioma cell lines U87 and U251 and neuroblastoma cell line SH-SY5Y with PLAUR gene hyperexpression

Ген/белок Gene/protein	Глиома U251 U251 glioma	Глиома U87 U87 glioma	Нейробластома SH-SY5Y Neuroblastoma SH-SY5Y
PLAUR/uPAR	↑	↑	↑
PLAU/uPA	—	↑	↓
CD44	—	—	—
CD56/NCAM	↑	↑	↑
CDH1/Е-кадгерин CDH1/E-cadherin	↑	↑	↑
CDH2/Н-кадгерин CDH2/N-cadherin	↑	↓	—
ZEB1	—	↑	↑
ZEB2	↑	↑	↑
SNAI1	—	↑	—
SNAI2	—	↑	↑
SOX2	↑	↑	↑
NANOG	—	↑	—
c-Мyc	—	—	—

Примечание. uPA – урокиназа; uPAR – рецептор урокиназы; ↑ – значимая индукция экспрессии; ↓ – значимое подавление экспрессии; «—» – отсутствие изменений в экспрессии каждого гена в каждой опухолевой линии.

Note. uPA – urokinase; uPAR – urokinase receptor; ↑ – significant induction of expression; ↓ – significant suppression of expression; “—” – absence of changes in expression of each gene in each tumor cell line.

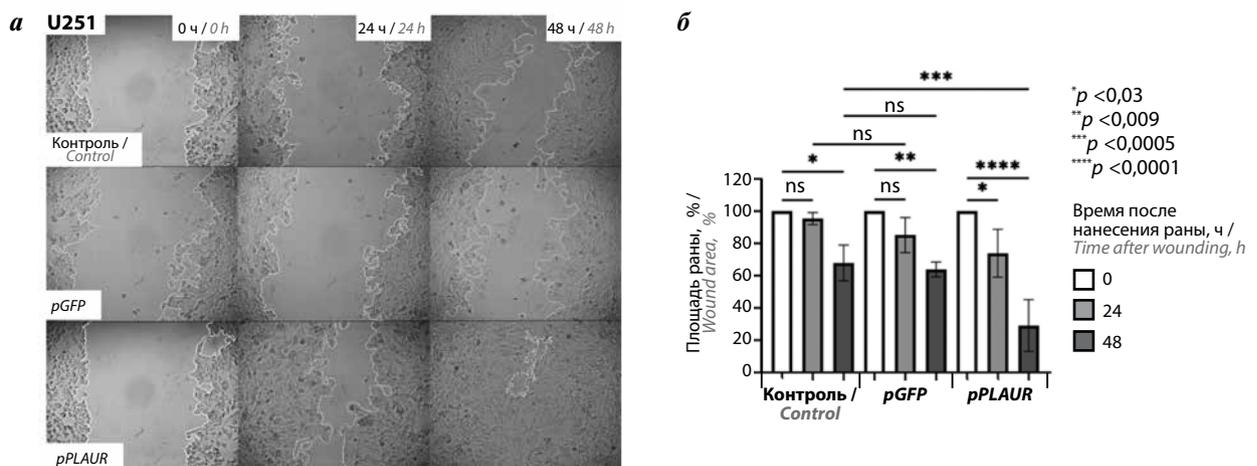


Рис. 5. Миграция клеточной линии глиомы U251 до и после индукции экспрессии гена PLAUR: а – площадь раны через 24 и 48 ч после нанесения царапины; б – анализ площади ран 3 независимых экспериментов. Контроль – нетрансфицированные клетки; pGFP – клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; pPLAUR – клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; ns – различия статистически незначимы. Данные представлены как средняя площадь раны через 24 и 48 ч в процентах относительно исходной площади раны (0 ч). Статистический анализ данных проведен с помощью one-way ANOVA – теста Tukey

Fig. 5. Migration of glioma cell line U251 before and after PLAUR gene expression: а – wound area 24 and 48 hours after wounding; б – analysis of wound areas in 3 independent experiments. Control – non-transfected cells; GFP – cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR – cells after transfection with pPLAUR plasmid; ns – differences are not statistically significant. Data are presented as mean wound area after 24 and 48 hours relative to baseline wound area (0 h) in percents. Statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA, Tukey test

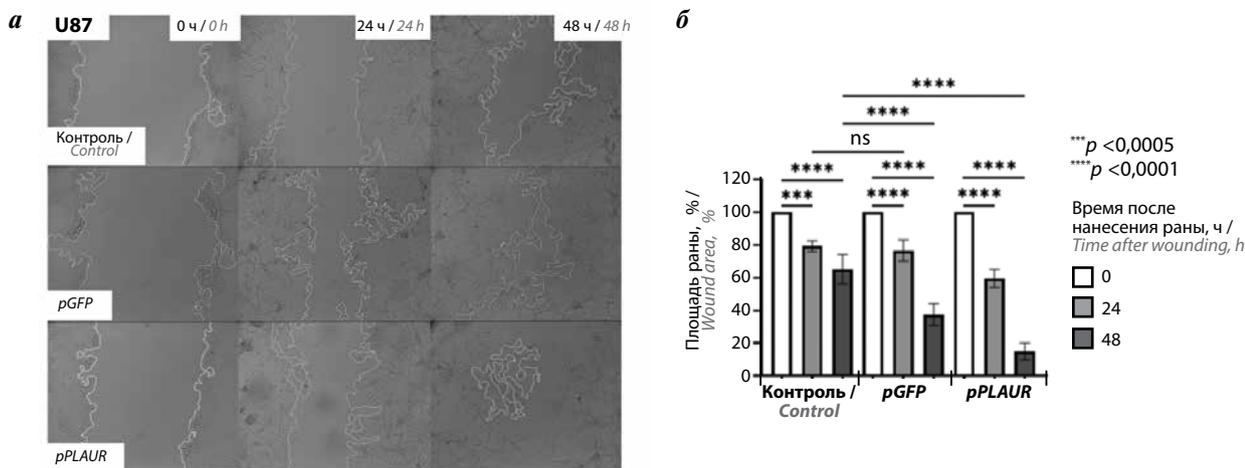


Рис. 6. Миграция клеточной линии глиомы U87 до и после индукции экспрессии гена PLAUR: а – площадь раны через 24 и 48 ч после нанесения царапины; б – анализ площади ран 3 независимых экспериментов. Контроль – нетрансфицированные клетки; pGFP – клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; pPLAUR – клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; ns – различия статистически незначимы. Данные представлены как средняя площадь раны через 24 и 48 ч в процентах относительно исходной площади раны (0 ч). Статистический анализ данных проведен с помощью one-way ANOVA – теста Tukey

Fig. 6. Migration of glioma cell line U87 before and after PLAUR gene expression: а – wound area 24 and 48 hours after wounding; б – analysis of wound areas in 3 independent experiments. Control – non-transfected cells; GFP – cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR – cells after transfection with pPLAUR plasmid; ns – differences are not statistically significant. Data are presented as mean wound area after 24 and 48 hours relative to baseline wound area (0 h) in percents. Statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA, Tukey test

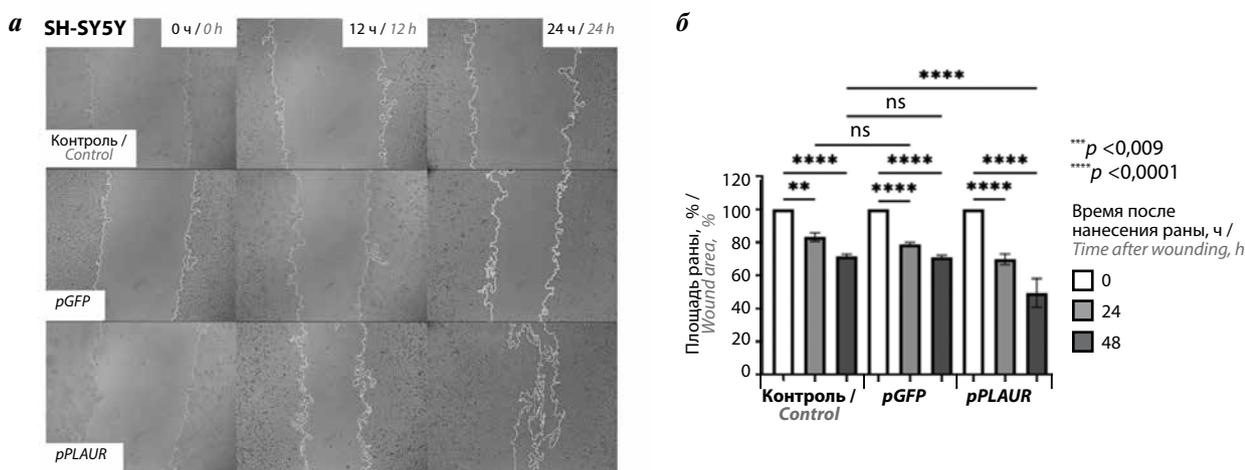


Рис. 7. Миграции клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y до и после индукции экспрессии гена PLAUR: а – площадь раны через 12 и 24 ч после нанесения царапины; б – анализ площади ран 3 независимых экспериментов. Контроль – нетрансфицированные клетки; pGFP – клетки после трансфекции с контрольной плазмидой pGFP; pPLAUR – клетки после трансфекции плазмидой pPLAUR; различия статистически незначимы. Данные представлены как средняя площадь раны через 12 и 24 ч в процентах относительно исходной площади раны (0 ч). Статистический анализ данных проведен с помощью one-way ANOVA – теста Tukey

Fig. 7. Migration of neuroblastoma cell line SH-SY5Y before and after PLAUR gene expression: а – wound area 12 and 24 hours after wounding; б – analysis of wound areas in 3 independent experiments. Control – non-transfected cells; GFP – cells after transfection with pGFP control plasmid; PLAUR – cells after transfection with pPLAUR plasmid; ns – differences are not statistically significant. Data are presented as mean wound area after 12 and 24 hours relative to baseline wound area (0 h) in percents. Statistical analysis of data was performed using one-way ANOVA, Tukey test

ОБСУЖДЕНИЕ

Рецептор урокиназы, кодируемый геном PLAUR, является ключевым компонентом патогенеза злокачественных новообразований. Его повышенная экспрессия в клетках опухоли способствует ее прогрессии, инвазии и метастазированию. Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований демонстрируют стойкую зависимость между

высоким уровнем экспрессии гена PLAUR и агрессивным фенотипом опухолей, что делает uPAR перспективной мишенью для противоопухолевой терапии [19].

В ходе нашего исследования установлено, что индукция экспрессии гена PLAUR в клетках глиомы и нейробластомы человека сопровождается увеличением экспрессии CDH1 и CDH2 (Е- и N-кадгеринов соответственно) как ключевых генов, кодирующих

белки межклеточной адгезии и ассоциированных с ЭМП и повышенной миграционной активностью опухолевых клеток. В частности, в клетках глиомы U87 отмечено снижение уровня экспрессии *CDH2*, что может быть связано с особенностями молекулярной регуляции ЭМП в данной клеточной линии, тогда как в нейробластоме SH-SY5Y и глиоме U251 наблюдается повышение уровня экспрессии *CDH2*, что согласуется с ролью uPAR в активации интегринов и ремоделировании внеклеточного матрикса [13–15]. Кроме того, выявлена *PLAUR*-зависимая индукция экспрессии транскрипционных факторов ЭМП генов *ZEB1* и *ZEB2*, которые подавляют экспрессию гена *CDH1* и способствуют активации мезенхимального фенотипа и миграции клеток. В клетках U251 эти гены не продемонстрировали статистически значимых изменений в уровне экспрессии по сравнению с контролем (клетками рGFP), что может отражать особенности регуляции ЭМП в данной клеточной линии [20]. Аналогично гены *SNAI1* и *SNAI2*, кодирующие транскрипционные факторы *SNAI1* и *SLUG* соответственно, играют большую роль в индукции ЭМП. Результаты нашего исследования показали, что наблюдаемая вслед за гиперэкспрессией *PLAUR* в клетках SH-SY5Y индукция *SNAI1* сопровождается повышенной миграцией клеток в рану (см. рис. 5–7), что может отражать усиление инвазивности опухолевых клеток [13, 21].

Мы также определили ответ на гиперэкспрессию *PLAUR* генов стволовости. Обнаруженная нами достоверная индукция *CD56* (*NCAM*) в нейробластоме и глиоме может способствовать изменению клеточного фенотипа и устойчивости к апоптозу [17]. Мы выявили такие факторы стволовости, как умеренное повышение уровней экспрессии *SOX2* и *NANOG*, поддерживающих плюрипотентность, в то время как значимые изменения в уровне экспрессии *c-Myc* обнаружены не были, что указывает на сложную и клеточнозави-

симум регуляцию стволовых свойств под влиянием *PLAUR* [18, 22–24].

Динамическая индукция экспрессии генов ЭМП, таких как *CD56*, *CDH1*, *ZEB1/2*, *SNAI1/2*, *SOX2* и *NANOG*, наблюдаемая в нашем исследовании, может свидетельствовать о комплексной регуляции фенотипической пластичности клеток под влиянием экспрессии гена *PLAUR*. Мы выявили изменение экспрессии генов, кодирующих белки, участвующие в процессе ЭМП. Результаты нашего исследования также продемонстрировали, что гиперэкспрессия *PLAUR* способствует активации ЭМП, что ведет к повышению миграционной активности клеток глиом и нейробластомы, стимулируя прогрессию опухолевого роста и метастазирование.

Таким образом, наблюдается не только усиление экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих ЭМП, но и заметное увеличение миграционной способности опухолевых клеток. В некоторых случаях выявлено снижение уровня экспрессии гена урокиназы *PLAU*, что может свидетельствовать о нарушениях обратных связей в регуляции протеолитической активности и миграционной способности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в клетках глиомы и нейробластомы выявлена статистически значимая ассоциация высокого уровня экспрессии гена *PLAUR* с индукцией экспрессии ключевых генов, отвечающих за клеточную адгезию, ЭМП и миграцию клеток опухоли. Наблюдаемое снижение экспрессии некоторых генов стволовости указывает на потенциальное влияние гиперэкспрессии гена *PLAUR* на переход в дормантность. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения механизма действия гена uPAR в патогенезе опухолей, что может способствовать разработке более эффективных терапевтических стратегий в лечении нейробластом и глиом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Semina E.V., Rubina K.A., Shmakova A.A. et al. Downregulation of uPAR promotes urokinase translocation into the nucleus and epithelial to mesenchymal transition in neuroblastoma. *J Cell Physiol* 2020;235(9):6268–86. DOI: 10.1002/jcp.29555
- Choong P.F.M., Nadesapillai A.P.W. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 2003;415:S46–58. DOI: 10.109701.blo.0000093845.72468.bd
- Zeng F., Li G., Liu X. et al. Plasminogen activator urokinase receptor implies immunosuppressive features and acts as an unfavorable prognostic biomarker in glioma. *Oncologist* 2021;26(8):e1460–9. DOI: 10.1002/onco.13750
- Gouri A., Dekaken A., El Bairi K. et al. Plasminogen activator system and breast cancer: potential role in therapy decision making and precision medicine. *Biomark Insights* 2016;11:105–11. DOI: 10.4137/BMI.S33372
- Gilder A.S., Natali L., Van Dyk D.M. The urokinase receptor induces a mesenchymal gene expression signature in glioblastoma cells and promotes tumor cell survival in neurospheres. *Sci Rep* 2018;8(1):2982. DOI: 10.1038/s41598-018-21358-1
- Hildenbrand R., Schaaf A. The urokinase-system in tumor tissue stroma of the breast and breast cancer cell invasion. *Int J Oncol* 2009;34(1):15–23.
- Boonstra M.C., Verspaget H.W., Ganesh S. et al. Clinical applications of the urokinase receptor (uPAR) for cancer patients. *Curr Pharm Des* 2011;17(19):1890–910. DOI: 10.2174/138161211796718233
- Noh H., Hong S., Huang S. Role of urokinase receptor in tumor progression and development. *Theranostics* 2013;3(7):487–95. DOI: 10.7150/thno.4218
- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131(6):803–20. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1
- Brodeur G.M. Spontaneous regression of neuroblastoma. *Cell Tissue Res* 2018;372(2):277–86. DOI: 10.1007/s00441-017-2761-2

11. Linabery A.M., Ross J.A. Childhood and adolescent cancer survival in the US by race and ethnicity for the diagnostic period 1975–1999. *Cancer* 2008;113(9):2575–96. DOI: 10.1002/cncr.23866
12. Shmakova A.A., Klimovich P.S., Rysenkova K.D. et al. Urokinase receptor uPAR downregulation in neuroblastoma leads to dormancy, chemoresistance and metastasis. *Cancers (Basel)* 2022;14(4):994. DOI: 10.3390/cancers14040994
13. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178–96. DOI: 10.1038/nrm3758
14. Noronha C., Ribeiro A.S., Taipa R. et al. Cadherin expression and EMT: a focus on gliomas. *Biomedicines* 2021;9(10):1328. DOI: 10.3390/biomedicines9101328
15. Meel M.H., Schaper S.A., Kaspers G.J.L. et al. Signaling pathways and mesenchymal transition in pediatric high-grade glioma. *Cell Mol Life Sci* 2018;75(5):871–87. DOI: 10.1007/s00018-017-2714-7
16. Inoue A., Ohnishi T., Nishikawa M. et al. A Narrative review on CD44's role in glioblastoma invasion, proliferation, and tumor recurrence. *Cancers (Basel)* 2023;15(19):4898. DOI: 10.3390/cancers15194898
17. Van Acker H.H., Capsomidis A., Smits E.L. et al. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol* 2017;8:892. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00892
18. Miller D.M., Thomas S.D., Islam A. et al. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res* 2012;18(20):5546–53. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0977.
19. Zhai B.-T., Tian H., Sun J. et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) as a therapeutic target in cancer. *J Transl Med* 2022;20(1):135. DOI: 10.1186/s12967-022-03329-3
20. Suzuki K., Kawataki T., Endo K. et al. Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade. *Oncol Lett* 2018;16(2):1758–64. DOI: 10.3892/ol.2018.8852
21. Шмакова А.А., Климович П.С., Рысенкова К.Д. и др. Рецептор урокиназы uPAR как мишень в онкологии: подавление экспрессии uPAR в клетках нейробластомы снижает пролиферацию, но вызывает дормантность, химиорезистентность и метастазирование. *Злокачественные опухоли* 2021;11:75–6. Shmakova A.A., Klimovich P.S., Rysenkova K.D. et al. UPA urokinase receptor as a target in oncology: suppression of uPAR expression in neuroblastoma cells reduces proliferation, but causes dormancy, chemoresistance, and metastasis. *Zlokachestvennyye oprukholi = Malignant Tumors* 2021;11:75–6. (In Russ.).
22. Бойченко В.С., Климович П.С., Шипова А.А. и др. Механизмы участия урокиназного рецептора в репрограммировании клеток опухолевой стромы. *Гены и клетки* 2022;17:32. Boychenko V.S., Klimovich P.S., Shchipova A.A. et al. Mechanisms of participation of the urokinase receptor in the reprogramming of tumor stroma cells. *Geny i kletki = Genes and Cells* 2022;17:32. (In Russ.).
23. Mamun M.A., Mannoork K., Cao J. et al. SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials. *J Mol Cell Biol* 2020;12(2):85–98. DOI: 10.1093/jmcb/mjy080
24. Jeter C.R., Yang T., Wang J. et al. Concise review: NANOG in cancer stem cells and tumor development: an update and outstanding questions. *Stem Cells* 2015;33(8):2381–90. DOI: 10.1002/stem.2007

Благодарность. Авторы выражают благодарность Галине Валерьевне Павловой из ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский институт нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России за предоставление линий глиомы и Максиму Николаевичу Карагяру из ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» за предоставление линии нейробластомы.

Acknowledgment. The authors would like to thank Galina Valeryevna Pavlova from the National Medical Research Institute of Neurosurgery named after Academician N.N. Burdenko, Ministry of Health of Russia for the provision of glioma lines and Maxim Nikolaevich Karagyaur from the Lomonosov Moscow State University for the provision of a neuroblastoma line.

Вклад авторов

А.В. Ласица, М.И. Антипина, Е.В. Семина: разработка дизайна исследования, планирование исследования, анализ данных, написание текста статьи;

Д.А. Назарова: клонирование плазмид для эксперимента, получение данных для анализа;

К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева: обсуждение дизайна исследования, анализ данных.

Authors' contributions

A.V. Lasitsa, M.I. Antipina, E.V. Semina: development of research design, research planning, data analysis, article writing;

D.A. Nazarova: cloning plasmids for experiment, obtaining data for analysis;

K.A. Rubina, V.Yu. Sysoeva: discussion of research design, data analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Ласица / A.V. Lasitsa: <https://orcid.org/0009-0005-3938-4798>

М.И. Антипина / M.I. Antipina: <https://orcid.org/0000-0002-1818-7139>

Д.А. Назарова / D.A. Nazarova: <https://orcid.org/0009-0006-3971-7668>

К.А. Рубина / K.A. Rubina: <https://orcid.org/0000-0002-7166-7406>

В.Ю. Сысоева / V.Yu. Sysoeva: <https://orcid.org/0000-0001-9885-9056>

Е.В. Семина / E.V. Semina: <https://orcid.org/0000-0002-3927-9286>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Разработка и наращивание плазмиды, а также работа с опухолевыми линиями выполнены в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (задание № 03р-23/110-03). Молекулярно-биологические исследования (полимеразная цепная реакция) и оценка миграционной активности опухолевых клеток выполнены на средства программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» ФГАУ ВО «Балтийский федеральный университет им. И. Канта».

Funding. The development and expansion of plasmids, as well as work with tumor lines, were carried out within the framework of the state assignment of the Lomonosov Moscow State University (assignment No. 03р-23/110-03). Molecular biological research (polymerase chain reaction) and assessment of the migration activity of tumor cells were carried out using the funds of the strategic academic leadership program «Priority 2030» of the I. Kant Baltic Federal University.

Статья поступила: 04.05.2025. **Принята к публикации:** 10.06.2025. **Опубликована онлайн:** 06.10.2025.

Article submitted: 04.05.2025. **Accepted for publication:** 10.06.2025. **Published online:** 06.10.2025.