

На правах рукописи

ЛЕСОВАЯ ЕКАТЕРИНА АНДРЕЕВНА

**МОДУЛИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО
РЕЦЕПТОРА В ХИМИОТЕРАПИИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Якубовская Марианна Геннадиевна

Официальные оппоненты:

Боженко Владимир Константинович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Григорьева Эльвира Витальевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего лабораторией гликобиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Имянитов Евгений Наумович, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом биологии опухолевого роста; заведующий лабораторией молекулярной онкологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «17» октября 2019 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478 г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....»2019 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Глюкокортикоиды (GC) применяют в клинической практике уже более 50 лет. Цитотоксическое действие GC на трансформированные лимфоциты обуславливает их применение при лечении ряда гемобластозов. При терапии солидных опухолей GC назначают в качестве адъювантного препарата для расширения терапевтического интервала и подавления побочных эффектов основного цитотоксического препарата. Однако GC также вызывают развитие серьезных осложнений (синдром Иценко-Кушинга, остеопороз) при лечении, а в ряде случаев способствуют прогрессии опухоли, увеличивая ее метастатический потенциал.

Биологические эффекты GC реализуются посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR) – хорошо изученного фактора транскрипции. В отсутствие лиганда рецептор находится в цитоплазме в мультипротеиновом комплексе с белками-шаперонами. При связывании с лигандом происходит изменение конформации GR, диссоциация шаперонного комплекса и высвобождение рецептора. GR в дальнейшем может димеризоваться и транслоцироваться в ядро, связываться с глюкокортикоид-респонсивными элементами (GRE) в промоторах и энхансерах ряда генов. Данный процесс носит название транс-активации, с ним связывают развитие большей части GR-опосредованных побочных эффектов. Терапевтическое действие GC в основном реализуется через ДНК-независимую транс-репрессию – белок-белковое взаимодействие мономера GR с про-пролиферативными и провоспалительными факторами транскрипции в ядре и цитоплазме, что приводит к снижению жизнеспособности опухолевых клеток. GR-зависимое ингибирование транскрипции также реализуется через ряд других механизмов. В частности, связывание GR с GRE в сайленсерах ряда генов приводит к снижению их экспрессии. При действии GC обычно запускаются оба механизма действия GR, что приводит к нелинейной зависимости суммарного эффекта от дозы препарата.

Приведенная схема молекулярных механизмов действия GR является довольно упрощенной, поскольку не все побочные эффекты ассоциированы с запуском транс-активации, равно как и не все терапевтические эффекты определяются транс-репрессией. Ряд GC-зависимых осложнений действительно реализуется за счет индукции транс-активации, в частности, гипергликемия и атрофические явления в кожной и мышечной ткани. У других GC-опосредованных побочных эффектов, таких как нарушения в работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, в основе лежит транс-репрессия, а вклад в развитие остеопороза вносят оба механизма. Тем не менее, описаны лиганды GR, которые могут избирательно индуцировать транс-репрессию без запуска транс-активации, что ведет к уменьшению риска системных побочных эффектов при сохранении противовоспалительной активности. Данные соединения относятся к классу селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора

(SEGRA). Селективный характер фармакологического действия SEGRA в настоящее время рассматривается как новый подход для повышения качества химиотерапии лейкозов и адъювантной терапии онкологических заболеваний, позволяющий снизить побочные эффекты лечения GR-зависимыми препаратами. Другим подходом к снижению побочных эффектов при длительной высокодозной терапии GC является выявление генов, отвечающих за развитие таких осложнений и направленное подавление их экспрессии. Учитывая активное использование GC при лечении опухолей, исследование механизмов регуляции и функционирования генов, определяющих развитие GC-индуцированных осложнений и разработка стратегии подавления их экспрессии, а также изучение механизмов действия новых лигандов GR класса SEGRA являются актуальными задачами экспериментальной онкологии.

В области исследования SEGRA одним из наиболее изученных препаратов данного класса является CpdA (Compound A), синтетический аналог соединения, выделенного из африканского кустарника семейства амарантовых *Salsola tuberculatiformis* Botschantzev. CpdA представляет собой соединение нестероидной структуры, для которого была продемонстрирована аффинность к GR в условиях конкурентного связывания с использованием меченого дексаметазона. CpdA не индуцирует димеризацию GR и последующие процессы транслокации рецептора в ядро и активации транскрипции, а избирательно подавляет активность транскрипционных факторов. Описаны его противовоспалительные свойства на ряде моделей *in vitro* и *in vivo*, и доказано, что CpdA относится к классу SEGRA и вызывает развитие побочных эффектов GR в меньшей степени. Противоопухолевые свойства CpdA были изучены ранее на моделях рака предстательной железы и множественной миеломы.

Однако CpdA обладает невысокой стабильностью в водных растворах. Кроме того, одним из продуктов распада CpdA является канцерогенно-опасный фенилазирин, что ограничивает его применение. Более того, молекула CpdA хиральна и существует в виде двух оптических изомеров, которые одинаковы по своим физико-химическим характеристикам, но могут обладать разными биологическими свойствами. Необходимо отметить, что препараты, основное действующее вещество которых представляет собой хиральную молекулу, разрешены к применению в медицинской практике только в виде отдельных оптических изомеров. В этом отношении представляется перспективной разработка и изучение эффектов более стабильных аналогов CpdA, а также отдельных энантиомеров данной молекулы. Эффекты энантиомеров CpdA, а также более стабильных аналогов или производных CpdA, не описаны.

Среди «генов побочных эффектов» глюкокортикоидов, экспрессия которых значительно повышалась после воздействия GC, и которые по литературным данным были вовлечены в развитие побочных эффектов GC, как наиболее активный был отмечен ген *REDD1*. Повышение экспрессии этого гена после применения GC ассоциировано с атрофическими явлениями:

атрофии кожного покрова, мускулатуры, а также остеопороза. Этот ген является консервативным GR-зависимым геном, его продукт ингибирует индуцируемый стрессом mTOR. При действии GC в ряде тканей, чувствительных к стероид-индуцированной атрофии, наблюдается повышение экспрессии *REDD1*. Мыши с нокаутом *REDD1* оказались резистентным к развитию GC-опосредованной атрофии кожи, в то время как противовоспалительные эффекты GC сохранились в полном объеме. Однако фармакологические ингибиторы экспрессии гена *REDD1* в настоящее время в литературе не описаны. В связи с этим перспективным направлением является поиск ингибиторов экспрессии *REDD1* и оценка их влияния на функциональную активность GR.

Таким образом, представленное исследование основано на имеющихся данных по функционированию GR и предлагает два независимых подхода к селективному модулированию функциональной активности GR: разработку селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора и ингибирование экспрессии гена *REDD1*.

Цель исследования

Целью данного исследования являлся изучение молекулярных механизмов избирательной активации глюкокортикоидного рецептора *in vitro* и *in vivo* и определение целесообразности использования селективного модулирования функциональной активности рецептора для оптимизации химиотерапии гемобластозов.

Задачи исследования

1. Изучить молекулярные механизмы действия селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) на моделях лейкозов и лимфом:
 - исследовать противоопухолевый эффект CpдA *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*;
 - изучить влияние CpдA на функциональную активность GR;
 - проанализировать биологические эффекты CpдA в сочетании с противоопухолевыми препаратами различных классов *in vitro* и *in vivo*.
2. Провести оценку противоопухолевого эффекта *in vitro* и *in vivo* новосинтезированных энантиомеров CpдA и химических производных CpдA:
 - оценить GR-зависимый антипролиферативный эффект полученных соединений;
 - проанализировать влияние полученных соединений на индукцию апоптоза на модельной системе злокачественных новообразований кроветворной системы *in vitro*;
 - исследовать противоопухолевый эффект наиболее активных соединений *in vivo*.
3. Изучить влияние энантиомеров CpдA и химических производных CpдA на функционирование GR
 - определить аффинность новосинтезированных химических производных CpдA к GR;
 - исследовать эффект новосинтезированных химических производных CpдA на

фосфорилирование GR;

- оценить влияние всех полученных соединений на индукцию механизмов транс-репрессии и транс-активации.

4. Провести анализ влияния ингибиторов *REDD1* на молекулярные механизмы действия глюкокортикоидов и их биологические эффекты *in vitro* и *in vivo*:

- отобрать среди зарегистрированных лекарственных препаратов потенциальные ингибиторы *REDD1*;

- изучить их эффекты на экспрессию *REDD1* и на функциональную активность GR;

- оценить противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* наиболее активных ингибиторов *REDD1* в комбинации с глюкокортикоидами;

- исследовать влияние ингибирования *REDD1* на системное и локальное действие глюкокортикоидов *in vivo*.

Методы и методология и исследования

В качестве методологической основы исследования были использованы комплексный и системный подходы с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования. В качестве модельной системы *in vitro* в представленной работе были использованы клетки линии Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза СЕМ и В-клеточной мантийноклеточной лимфомы Granta, а также сублинии данных клеток с подавленной с помощью короткой шпилечной РНК к гену GR экспрессией рецептора. Для получения лентивирусов использовали клетки эпителия почки человека HEK293-T, для моделирования воздействия GC на кожный покров *in vitro* использовали иммортализованные кератиноциты человека HaCaT. В качестве модельных систем *ex vivo* использовали первичные моноциты, выделенные из образцов крови пациентов НИИ ДОиГ и НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для моделирования системных и локальных побочных эффектов глюкокортикоидов *in vivo* использовали модели воспаления на ушах, глюкокортикоид-индуцированной атрофии кожного покрова, глюкокортикоид-индуцированного остеопороза. Для исследования противоопухолевого эффекта анализируемых соединений *in vivo* были использованы модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей и ксенографтов лимфомы у бестимусных мышей. Методическая база данной работы включала в себя такие молекулярно-биологические методы как: трансдукция лентивирусных конструкций, определение антипролиферативного и цитотоксического эффектов с помощью прямого подсчета клеток, МТТ- и МТС-тестов на цитотоксичность, полимеразная цепная реакция, Вестерн-блоттинг, люциферазный репортерный анализ, проточная цитофлуориметрия, гистология и иммуногистохимия, анализ профилей экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов и др. Синтез энантиомеров CpдA проводили на химическом факультете МГУ им.

М.В. Ломоносова. Синтез химических производных CpдA проводили в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского. Получение наночастиц проводили в лаборатории Ш. Тэкстона, университет Норвестерн, Чикаго, США. Биоинформатический скрининг проводили в лаборатории Дж.Т. Дадли, госпиталь Маунт-Синай, Нью-Йорк, США. Достоверность результатов подтверждена адекватным выбором методов и использованием современных методов математической статистики.

Научная новизна

Научная новизна исследования обусловлена тем, что впервые изучены подходы к селективному модулированию функциональной активности глюкокортикоидного рецептора при злокачественных новообразованиях кроветворной системы. В частности, впервые продемонстрировано, что соединение класса SEGRA CpдA противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* индивидуально и в комбинации с ингибитором протеасом бортезомибом на моделях лейкозов и лимфом. Впервые разработаны эффективные подходы к получению энантиомеров CpдA и стабильных химических производных CpдA. При оценке биологических свойств полученных соединений было впервые показано, что новосинтезированные R- и S-энантиомеры хирального соединения CpдA, являются селективными агонистами GR, действующими преимущественно по механизму активации транс-репрессии, причем их противоопухолевые и проапоптотические эффекты, а также влияние на транс-реессию и транс-активацию сопоставимы с действием рацемической смеси; противоопухолевый и проапоптотический эффекты ряда новосинтезированных химических производных CpдA преимущественно опосредованы активацией глюкокортикоидного рецептора по механизму транс-репрессии. Среди производных CpдA соединение CpдA-03 обладало наиболее высокой аффинностью к GR, сопоставимой с аффинностью исходного соединения, и проявляет наиболее выраженное противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo*. С помощью биоинформатического скрининга впервые было отобрано 9 зарегистрированных лекарственных препаратов, потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1*. Для данных препаратов было продемонстрировано, что они подавляют как базальную, так и GC-индуцированную экспрессию *REDD1*; наиболее активным является рапамицин. Впервые было показано, что рапамицин снижает GC-индуцированное фосфорилирование GR по остатку Ser211 и GC-зависимую транслокацию GR в ядро, а также подавляет запуск GC-индуцированной транс-активации; при этом степень запуска транс-репрессии либо не изменяется, либо усиливается. Также было показано, что рапамицин в комбинации с дексаметазоном обладает синергическим противоопухолевым эффектом *in vitro* и *in vivo*, в то же время снижая степень GC-индуцированных побочных эффектов.

Теоретическая и практическая значимость

При выполнении данного исследования был получен ряд приоритетных данных. Было

показано противоопухолевое действие соединения класса SEGRA, CpдA, *in vitro* и *in vivo* индивидуально и в комбинации с ингибитором протеасом бортезомибом на моделях лейкозов и лимфом. В ходе исследования были разработаны стратегии синтеза аналогов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора, и синтезированы 10 новых соединений: энантиомеры CpдA и химические производные CpдA. Скрининг их биологических свойств показал, что антипролиферативное и проапоптотическое действие аналогов CpдA, их эффекты на индукцию транс-активации и транс-репрессии, а также аффинность к GR сопоставимо с эффектами Dex и CpдA. Для наиболее активного производного CpдA-03 был продемонстрирован противоопухолевый эффект *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют о том, что данное соединение является перспективным для дальнейшего введения его в доклинические испытания в качестве потенциального препарата для терапии злокачественных новообразований кроветворной системы. Был проведен биоинформатический скрининг базы данных CMap и идентифицировано 9 потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1*, в том числе, ингибитор mTORC1 рапамицин, ингибитор mTORC1/mTORC2 OSI-027, а также модулятор холинорецепторов физостигмин. Рапамицин подавлял базальную и GC-индуцированную экспрессию *REDD1* и модулировал функциональную активность GR: снижал активность транслокации GR в ядро и степень его фосфорилирования, а также ингибировал запуск транс-активации, в то время как транс-репрессорная функция GR была сохранена или усилена. Был показан синергический противоопухолевый эффект рапамицина и GC *in vitro* и *in vivo*, а также подавлял атрофические побочные эффекты системного и локального действия GC *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют о перспективности исследования эффектов ингибиторов *REDD1* на GR-зависимые сигнальные пути, а также их применения для повышения эффективности и безопасности химиотерапии гемобластозов.

Личный вклад автора

Автор лично провела анализ научной литературы по теме диссертации, принимала непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие диссертации паспорту

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология («Медицинские науки») и областям исследований п.2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и

др.)» и п.6 «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Положения, выносимые на защиту

1. Селективный агонист глюкокортикоидного рецептора CpдA и оказывает противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* индивидуально и в комбинации с ингибитором протеасом бортезомибом на моделях лейкозов и лимфом.

2. R- и S-энантиомеры хирального соединения CpдA, являются селективными агонистами GR, действующими преимущественно по механизму активации транс-репрессии, причем их противоопухолевые и проапоптотические эффекты, а также влияние на транс-репрессию и транс-активацию сопоставимы с действием рацемической смеси, а слабым мутагенным действием обладает лишь R-энантиомер.

3. Противоопухолевый и проапоптотический эффекты ряда химических производных CpдA, полученных путем введения различных заместителей в бензольное кольцо молекулы CpдA, преимущественно опосредованы активацией глюкокортикоидного рецептора по механизму транс-репрессии.

4. Среди новосинтезированных производных CpдA соединение CpдA-03 обладает наиболее высокой аффинностью к глюкокортикоидному рецептору, сопоставимой с аффинностью исходного соединения, и проявляет наиболее выраженное противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы P388.

5. 9 зарегистрированных лекарственных препаратов, отобранных с помощью биоинформатического скрининга по потенциальной способности ингибировать экспрессию REDD1, подавляют как базальную, так и GC-индуцированную экспрессию REDD1, из которых наиболее активным является рапамицин.

6. Рапамицин влияет на функциональную активность GR, снижая GC-индуцированное фосфорилирование GR по остатку Ser211 и GC-зависимую транслокацию GR в ядро, а также подавляя запуск GC-индуцированной транс-активации; при этом степень запуска транс-репрессии либо не изменяется, либо усиливается.

7. Рапамицин в комбинации с дексаметазоном обладает синергическим противоопухолевым эффектом *in vitro* и *in vivo*, в то же время снижая степень GC-индуцированных побочных эффектов.

Внедрение результатов исследования

Экспериментально-практический материал, полученный в ходе изучения подходов к селективному модулированию функциональной активности глюкокортикоидного рецептора в клетках гемобластозов позволит осуществить оптимизацию химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы как с использованием селективных агонистов

глюкокортикоидного рецептора, так и с включением в терапию ингибиторов экспрессии гена *REDD1*. Методические подходы, разработанные в ходе выполнения работы, внедрены в деятельность сотрудников отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также используются в учебном процессе на кафедре онкологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России при чтении лекций.

Апробация

Результаты исследования были представлены и обсуждены на конференциях: конференция Американского общества онкологов AACR (17-21 апреля 2010 г., Вашингтон, США, 2-6 апреля 2011 г., Орlando, США, 1–4 апреля 2012 г., Чикаго, США), конференция Европейского общества дерматологов ESDR (19-22 сентября 2012 г., Венеция, Италия), конференция Американского общества генетиков ASHG (6-10 ноября 2012 г., Сан-Франциско, США) всероссийская научно-практическая конференция «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» (20-21 марта 2014 г., Москва, Россия), XII-XV всероссийская научно-практическая конференция «Отечественные противоопухолевые препараты» (2-4 апреля 2015 г., 17-18 марта 2016 г., 16-17 марта 2017 г., 29-30 марта 2018 г., Москва, Россия), международная конференция «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (9-12 июля 2015 г., Томск, Россия), научная школа «Сигнальные пути ядерных рецепторов» (23-28 августа 2009 г., 23-28 августа 2015 г., 27 августа – 1 сентября 2017 г., о. Спетцес, Греция), I-IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (16-17 декабря 2015 г., 6-8 декабря 2016 г., 6-8 декабря 2017 г., 17-19 декабря 2018 г., Москва, Россия), V Съезд физиологов СНГ (6-10 октября, Дагомыс, Россия), II, III Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (22-24 июня 2016 г., 23–24 июня 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), X Съезд онкологов СНГ и Евразии (23-25 апреля 2018 г., Сочи, Россия), конгресс Европейского общества онкологов EACR (30 июня – 3 июля 2018 г., Амстердам, Нидерланды). Апробация диссертации состоялась 26 марта 2019 года на объединенной научной конференции отдела химического канцерогенеза, отдела экспериментальной биологии опухолей, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза, лаборатории клинической биохимии НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

Результаты исследования изложены в 76 научных публикациях, из которых 23 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа построена по традиционной схеме, изложена на 304 листах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов,

результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений. Список литературы включает 757 источников, из которых 20 — отечественные и 737 — зарубежные. Текст иллюстрирован 15 таблицами и 61 рисунком

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Оценка противоопухолевого эффекта селективного агониста глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), 2-(4-ацетофенил)-2-хлор-N-метилдиэтиламмоний хлорида или CpдA

Оценка противоопухолевого эффекта CpдA *in vitro* и *ex vivo*

В качестве модельной системы были выбраны линия острого лимфобластного T-клеточного лейкоза СЕМ и линия В-клеточной лимфомы мантийной зоны селезенки Granta, как наиболее выразительно отвечающие на обработку клеток глюкокортикоидами и в то же время экспрессирующие достаточное количество рецептора. Поскольку важной частью дальнейших исследований было изучение зависимости всех наблюдаемых эффектов от GR, нами была проведена трансдукция клеточных линий СЕМ и Granta лентивирусными конструкциями, экспрессирующими короткую шпилечную РНК к GR (shGR). В полученных клетках было продемонстрировано подавление экспрессии GR по сравнению с клетками, трансдуцированными пустым вектором. Как представлено на рисунке 1А, экспрессия GR в клетках СЕМ и Granta снизилась примерно на 85%. Противоопухолевый эффект *in vitro* по современной терминологии определяется как антипролиферативное и проапоптотическое действие соединения на клетки. Определение антипролиферативного эффекта проводили в течение 48-часовой инкубации с Dex или CpдA с помощью прямого подсчета клеток. Общее количество клеток СЕМ при обработке Dex снизилось на 36,3% по сравнению с контролем; этот показатель для клеток Granta составил 22,8% (Рисунок 1В). Общее количество жизнеспособных клеток СЕМ при инкубации с CpдA в концентрации 1 мкМ уменьшилось на 42,6% по сравнению с контролем спустя 24 ч после обработки. Аналогичный эффект наблюдался для клеток Granta (Рисунок 1В). Наблюдаемые эффекты являлись GR-зависимыми. С помощью проточной цитофлуориметрии было продемонстрировано, что в клетках обеих линий инкубация с CpдA или с Dex вызывала запуск апоптоза после 24 часов обработки. Эти результаты согласуются с данными по расщеплению белка PARP (Рисунок 1С, D).

Также в ходе выполнения исследования нами была собрана коллекция из 25 образцов крови от пациентов с гемобластозами отделения химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Из полученных образцов была выделена моноцитарная фракция клеток. На полученных первичных культурах был оценен цитостатический эффект CpдA и глюкокортикоидов. Клетки культивировали в присутствии указанных соединений или растворителя в течение 48 ч.

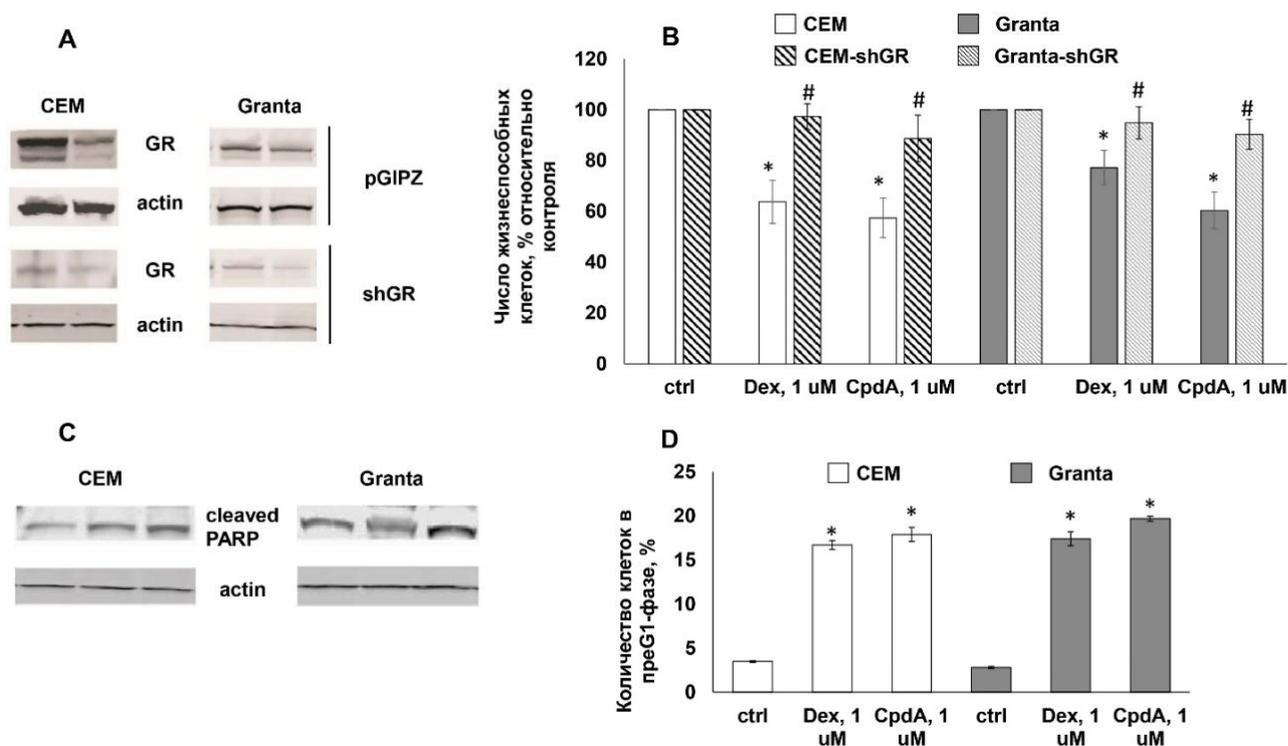


Рисунок 1 - Антипролиферативный и проапоптотический эффекты CpdA на клетки CEM, CEM-shGR, Granta и Granta-shGR. А. Уровень экспрессии GR в клетках CEM и Granta после трансдукции лентивирусного вектором pGF-shGR и культивирования в течение 48 ч в присутствии растворителя или Dex (1мкМ) оценивали с помощью Вестерн блоттинга. В. Антипролиферативный эффект CpdA и Dex на клетки CEM и Granta определяли после инкубации клеток с исследуемыми соединениями в течение 48 ч с помощью прямого подсчета клеток. На рисунке представлено количество живых клеток в процентах от контроля, обработанного растворителем. С, D. Проапоптотический эффект Dex и CpdA определяли с помощью Вестерн блоттинга по расщеплению PARP после 48 ч обработки (С) и проточной цитофлуориметрии с использованием окраски пропидий йодидом в течение 48 ч обработки (D) растворителем, Dex (1мкМ) и CpdA (1мкМ). Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали иммуноблоттинг с антителами к актину. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие между числом жизнеспособных клеток, трансдуцированных вектором shGR и контрольным вектором pGIPZ, $p < 0.05$.

Было показано, что цитостатический эффект CpdA на клетки сравним с эффектом GC. На рисунке 2 представлены 5 образцов, в которых эффект Dex и CpdA был наиболее сильно выражен. Так, количество живых клеток в образце, полученном от пациента 5, через 48 часов после обработки CpdA составило 58,9% от контрольного уровня, аналогичный показатель при обработке GC составил 66,5% живых клеток от контрольного уровня (Рисунок 2). В отношении других пациентов, данные по которым не представлены, цитотоксический эффект был выражен слабее и колебался в пределах снижения количества жизнеспособных клеток на 20-40%.

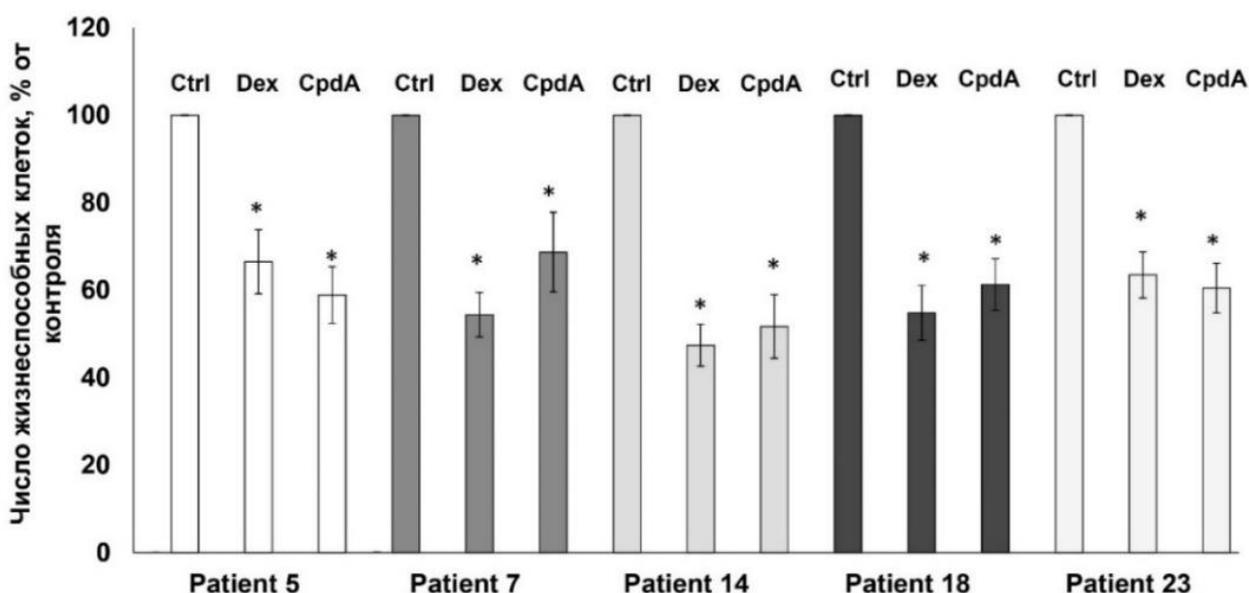


Рисунок 2 - Цитотоксический эффект Dex и CpD A на первичные трансформированные лимфоциты от пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы. Выделение моноядерной фракции клеток из образцов, полученных от пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы, проводили с помощью центрифугирования в градиенте Фиколла. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex (1мкМ), CpD A (1мкМ). Подсчет количества живых клеток проводили с помощью камеры Горяева. На рисунке представлено количество живых клеток в процентах от контроля, обработанного растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

Исследование способности CpD A к запуску транс-репрессии и транс-активации глюкокортикоидного рецептора

ДНК-независимая транс-репрессия, запускаемая GR, обусловлена белок-белковым взаимодействием GR с другими транскрипционными факторами, такими как NF-kB, AP-1, Ets-1, Elk-1, SRF, CRE/ATF и NFATc [Yemelyanov et al, 2007]. С помощью трансдукции лентивирусного вектора были получены клеточные линии Granta и CEM, несущие ген люциферазы под контролем минимального CMV-промотора с сайтами связывания NF-kB. Эффективность трансдукции клеток обеих линий составила 50-60%, о чем судили по экспрессии маркера – зеленого флуоресцентного белка GFP (Рисунок 3А). При исследовании влияния тестируемых лигандов GR на активность NF-kB было показано, что в клетках CEM и Granta при обработке CpD A наблюдается подавление активности NF-kB в большей степени, чем при обработке Dex (Рисунок 3В). Это подтверждалось данными количественного ПЦР-анализа экспрессии NF-kB-регулируемых генов интерлейкина-1 (IL-1) и интерлейкина-6 (IL-6) (Рисунок 3С). Более того, необходимо отметить, что Dex и CpD A статистически значимо оказывали более слабый эффект на транскрипционную активность NF-kB в клетках CEM и Granta с подавленной экспрессией GR (Рисунок 3В).

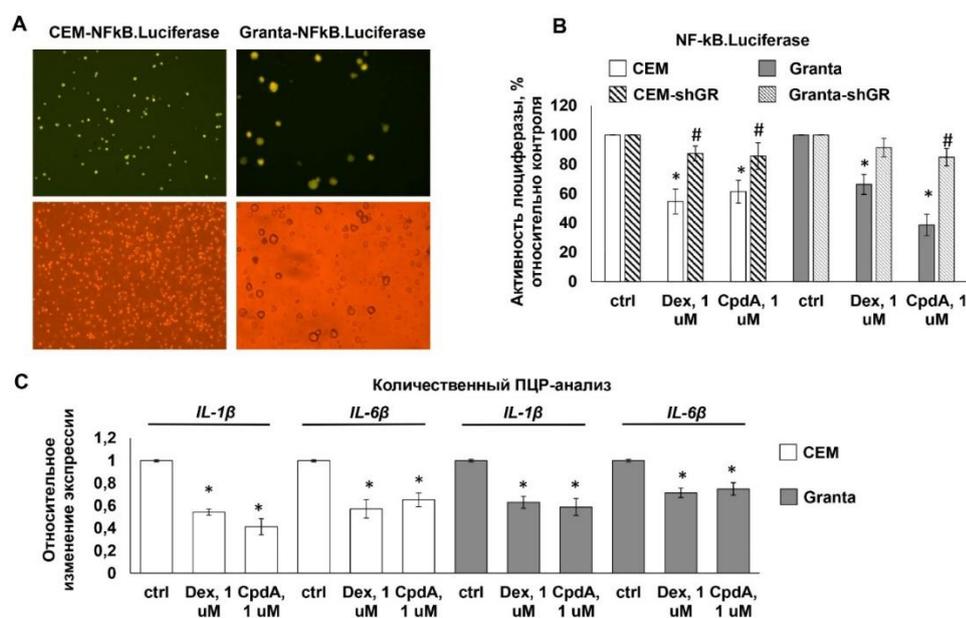


Рисунок 3 - Влияние Dex и Cpda на степень запуска GR-зависимой транс-репрессии. **А.** Эффективность трансдукции лентивирусного вектора рGF1-NF-kB. **В.** Клетки CEM, Granta, CEM-shGR и Granta-shGR после трансдукции лентивирусного вектора рGF1-NF-kB культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex (1мкМ), Cpda (1мкМ). Затем определяли активность люциферазы. Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. **С.** Количественный ПЦР-анализ экспрессии *IL-6β* и *IL-1β* в клетках CEM и Granta. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

Запуск транс-активационного механизма GR в клетке происходит при связывании гомодимера рецептора с респонсивными элементами глюкокортикоидов (GRE). Это приводит к ацетилированию гистонов, уменьшению плотности хроматина, что способствует активации транскрипции пропролиферативных и антиапоптотических генов. Мы исследовали транс-активационный потенциал Cpda с помощью трансдукции клеток лентивирусным вектором, несущим ген люциферазы светлячка под контролем GRE-содержащего CMV-промотора. После 8-часовой инкубации клеток Granta с Dex наблюдалось возрастание активности люциферазы более чем в 21 раз, в то время как Cpda вызывал ее подавление на 33%. В клетках линии CEM наблюдалось увеличение активности люциферазы после обработки Dex в 2,4 раза, в то время как Cpda снижал активность репортерного гена на 41%. Наблюдаемые эффекты были GR-зависимыми (Рисунок 4А). Данные, полученные в люциферазном тесте, были подтверждены с помощью количественного ПЦР-анализа экспрессии GR-зависимых генов FKBP51, GILZ, MKP-1 [Bruscoli et al, 2010; Shipp et al, 2010; Tchen et al, 2010]. Экспрессия данных генов возрастала после обработки Dex в течение 24 ч, в то время как при инкубации клеток Granta и CEM с Cpda экспрессия данных генов оставалась на контрольном уровне или даже снижалась (Рисунок 4В).

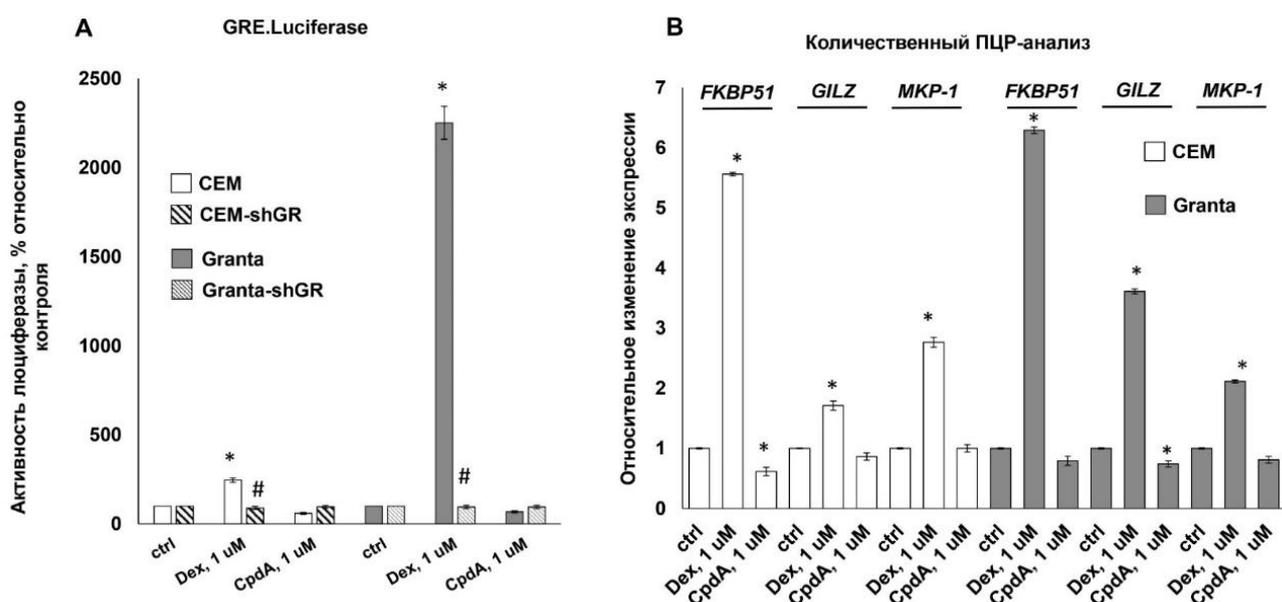


Рисунок 4 - Влияние Dex и CpdA на степень запуска GR-зависимой транс-активации. **А.** Клетки CEM, Granta, CEM-shGR и Granta-shGR после трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex (1мкМ), CpdA (1мкМ). Затем определяли активность люциферазы. Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. **В.** Количественный ПЦР-анализ экспрессии *FKBP51*, *GILZ* и *MKP-1* в клетках CEM и Granta. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

Далее было проведено исследование экспрессии генов в клетках Granta на ДНК-микрочипах Illumina после 24 ч обработки клеток Dex или CpdA (GSE71099). Анализ общих закономерностей изменения экспрессии генов показал, что в клетках Granta 92% генов, экспрессия которых увеличивается после обработки Dex, что свидетельствует о запуске механизма трансактивации, не изменяется или понижается после обработки CpdA. Более того, 30% генов, экспрессия которых падала в результате обработки стероидами, также уменьшалась после обработки CpdA в 2 и более раза (Рисунок 5А). Результаты исследования профилей экспрессии генов в клетках гемобластозов после обработки GC или CpdA были подтверждены с помощью количественного ПЦР-анализа ряда генов, экспрессия которых наиболее сильно увеличилась, и ряда генов, экспрессия которых наиболее сильно уменьшилась после обработки Dex (Рисунок 5В).

Таким образом, селективное модулирование функциональной активности GR с помощью CpdA со смещением в сторону транс-репрессии было подтверждено как на уровне экспрессии единичных генов и активности специфических факторов транскрипции, так и на уровне общей направленности изменения профиля экспрессии генов после воздействия исследуемых соединений.

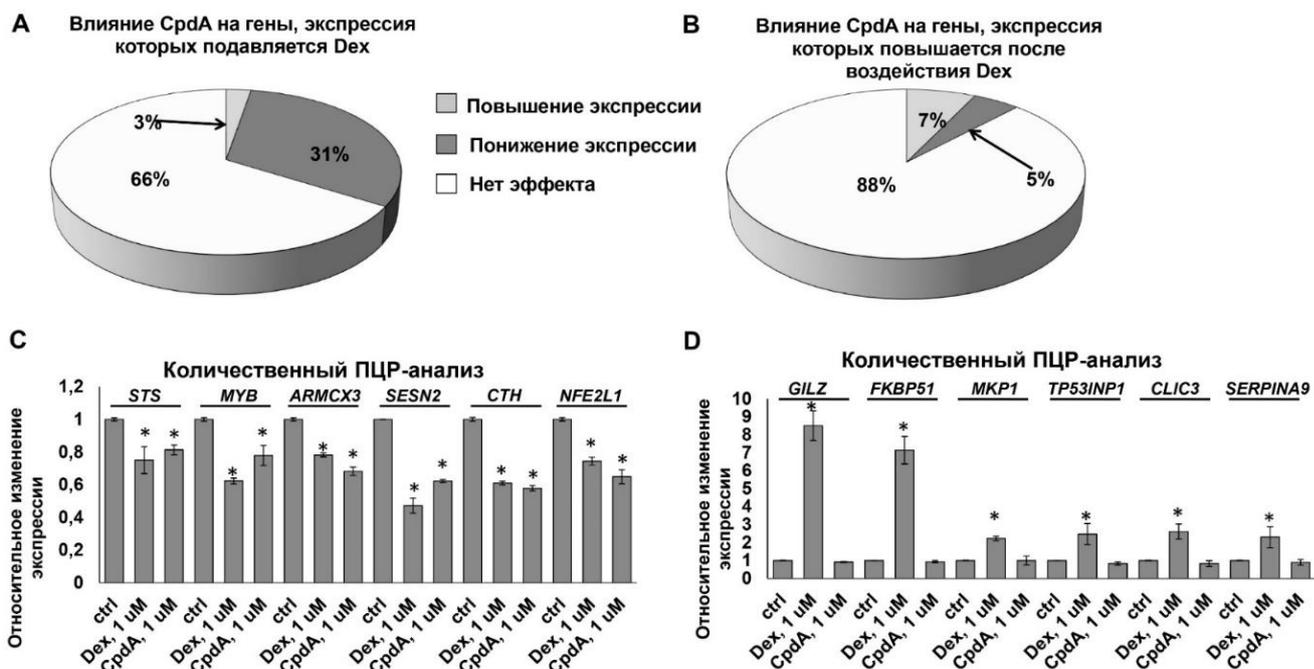


Рисунок 5 - Сравнение изменения профилей экспрессии генов в клетках Granta после обработки Dex или Cpda. **А, В.** Тотальная мРНК была выделена из клеток Granta, обработанных растворителем, Dex (1 мкМ) и Cpda (1 мкМ) в течение 24 ч. Амплификация, мечение, гибридизация РНК были проведены с помощью набора Illumina Whole-Genome Gene Expression BeadChip (HumanHT-12) согласно протоколу производителя сервисной службой по работе с ДНК и РНК, Northwestern University, Chicago, США. **С, Д.** Количественный ПЦР-анализ экспрессии генов в клетках Granta. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

Определение противоопухолевого эффекта Cpda in vivo

Для определения противоопухолевого эффекта Cpda *in vivo* нами была использована методика подкожного введения ксенографтов лимфомы человека бестимусным мышам. Животным подкожно перевивали 10 млн клеток Granta в формирующей питательной матрице Matrigel (BD Biosciences, США), которая находится в жидком состоянии при температуре от 0°C до 4°C, а при повышении температуры полимеризуется и образует гель. Животных делили на три группы, по 10 животных в каждой. На 5-7 день после перевивки у 96% животных были отмечены опухолевые узлы средним объемом 54 мм³. На 7 день после перевивки было начато введение следующих препаратов: 1) физиологический раствор; 2) раствор Dex, 1 мг/кг; 3) – раствор Cpda, 5 мг/кг. Введение проводили на 1, 3 и 5 дни недели, объем опухоли измеряли 2 раза в неделю. Эвтаназия была проведена на 32 день эксперимента. Средний объем опухоли в группе 1 (физиологический раствор) составил 1969 мм³, в группе 2 (раствор дексаметазона) – 382 мм³, в группе 3 (раствор Cpda) - 362 мм³ (Рисунок 6А). Cpda подавлял рост опухоли у бестимусных мышей в 2,5 раза по сравнению с контролем.

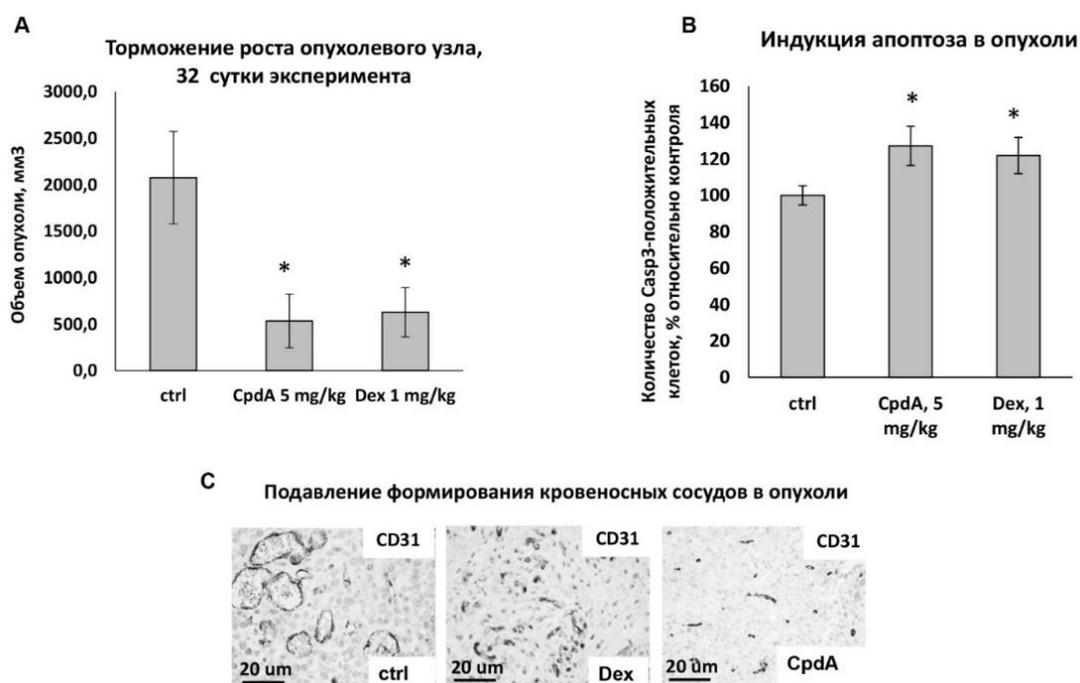


Рисунок 6 - Эффективность терапевтического действия Dex и Cpda на ксенографты лимфомы мантийной зоны селезенки Granta. **А.** Средний объем ксенографтов на 32 день эксперимента. Физиологический раствор (ctrl), Dex (1 мг/кг), Cpda (5 мг/кг) вводили внутривентриально на 1, 3 и 5 дни недели. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=10$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. **В.** Характеристические гистологические срезы опухолей в контрольной и экспериментальных группах. **С, D, E.** Количественный анализ плотности клеток в опухоли (**С**), TUNEL- (**D**) и Casp3- (**E**) положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином или специфическими антителами к TUNEL и Casp3. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. **Ф.** Характеристическое иммуногистохимическое окрашивание CD31.

При анализе результатов иммуногистохимического исследования (ИГХ) было показано, что в образцах, полученных от животных, получавших Cpda, количество жизнеспособных клеток значительно меньше, чем в контроле, о чем судили по увеличению экспрессии каспазы 3, служащей маркером апоптоза (Рисунок 6В). Также было проведено исследование полученных образцов опухолевой ткани на степень ангиогенеза. Методом ИГХ было показано, что формирование сосудов в группах, получавших Dex или Cpda, было менее выражено (Рисунок 6С). Таким образом, противоопухолевый эффект Cpda *in vitro* был подтвержден *in vivo*.

Исследование совместного влияния Cpda и противоопухолевых препаратов различных классов на жизнеспособность опухолевых клеток

Для изучения совместного действия Cpda и противоопухолевых препаратов различного механизма действия были выбраны следующие классы соединений: 1) классические химиопрепараты, используемые при терапии злокачественных новообразований

кровенворной системы (митоксантрон (Mito), доксорубин (Dox), винкристин (Vinc)); 2) ингибиторы убиквитин-протеосомной системы (бортезомиб (BZ), карфилзомиб (CFZ), иксазомиб (IXZ), MLN4924); 3) узкобороздочные лиганды (УБЛ) (трабектедин (Trab), диминазен (Dim), пентамидин (Pent), нетропсин (Net)). Для всех указанных препаратов был оценен цитотоксический эффект в широком диапазоне концентраций (1 нМ – 1 мкМ) как индивидуально, так и в комбинации с Dex или CpdA на клетках мантийноклеточной лимфомы Granta и клетках лейкоза СЕМ. Для комбинаций всех указанных соединений с CpdA был рассчитан «комбинационный индекс» (combination index, CI), который представляет собой числовую характеристику типа совместного действия препаратов: синергизм, аддитивность или антагонизм. Результаты расчета представлены в таблице 1. Ни одна комбинация цитостатиков, ингибиторов УПС или УБЛ в комбинации с CpdA не проявляла антагонистических свойств. Преимущественным типом совместного действия исследуемых веществ была аддитивность. Синергизм совместного действия CpdA и исследуемых препаратов наблюдался наиболее выражено в случае бортезомиба. Расчетное значение CI для данной комбинации препаратов составило 0,746 для клеток СЕМ и 0,801 для клеток Granta (Таблица 1). Данные по цитотоксичности согласовались с результатами анализа степени индукции апоптоза методом проточной цитофлуориметрии.

Таблица 1 - Комбинационный индекс (combination index, CI), характеризующий эффективность совместного действия CpdA и препаратов классов стандартных цитостатиков, ингибиторов УПС и узкобороздочных лигандов.

Комбинация препаратов	CI, СЕМ	CI, Granta
Dox+CpdA	0,971	0,928
Vinc+CpdA	0,983	0,943
Mito+CpdA	0,876	0,917
BZ+CpdA	0,746	0,801
CFZ+CpdA	0,843	0,878
IXZ+CpdA	0,850	0,973
MLN4924+CpdA	0,821	0,827
Trab+CpdA	0,834	0,849
Dim+CpdA	0,984	0,924
Net+CpdA	0,979	0,947
Pent+CpdA	0,966	0,981

Примечание: CI<1, CI=1 и CI>1 показывают соответственно синергизм, аддитивный эффект или антагонизм рассматриваемых воздействий

Наибольший интерес по своим эффектам на клетки лимфомы и лейкоза для нас представлял ингибитор протеасом бортезомиб. Были исследованы эффекты бортезомиба на Dex- и CpdA-индуцированные механизмы транс-репрессии и транс-активации. Было показано, что бортезомиб оказывает потенцирующее действие на эффекты CpdA. Так, с помощью люциферазного теста мы оценили влияние CpdA, бортезомиба и их сочетания на активность

транскрипционных факторов NF- κ B и AP-1. В клетках CEM падение активности репортерного гена после 8-часовой обработки комбинацией исследуемых соединений составило 69,5% (Рисунок 7А). Аналогичные эксперименты на клетках линии Granta продемонстрировали падение активности NF- κ B на 65,8%, 36,4% и 72,7% после 8-часовой инкубации клеток с 1 мкМ CpдA, 3 нМ бортезомибом, и их сочетанием (Рисунок 7А). При изучении совместного влияния CpдA и бортезомиба на транс-активационный механизм было показано, что бортезомиб не вызывает запуска транс-активации, а CpдA, как уже было отмечено ранее, подавляет ее на 33% в клетках CEM и на 41% в клетках Granta (Рисунок 7В).

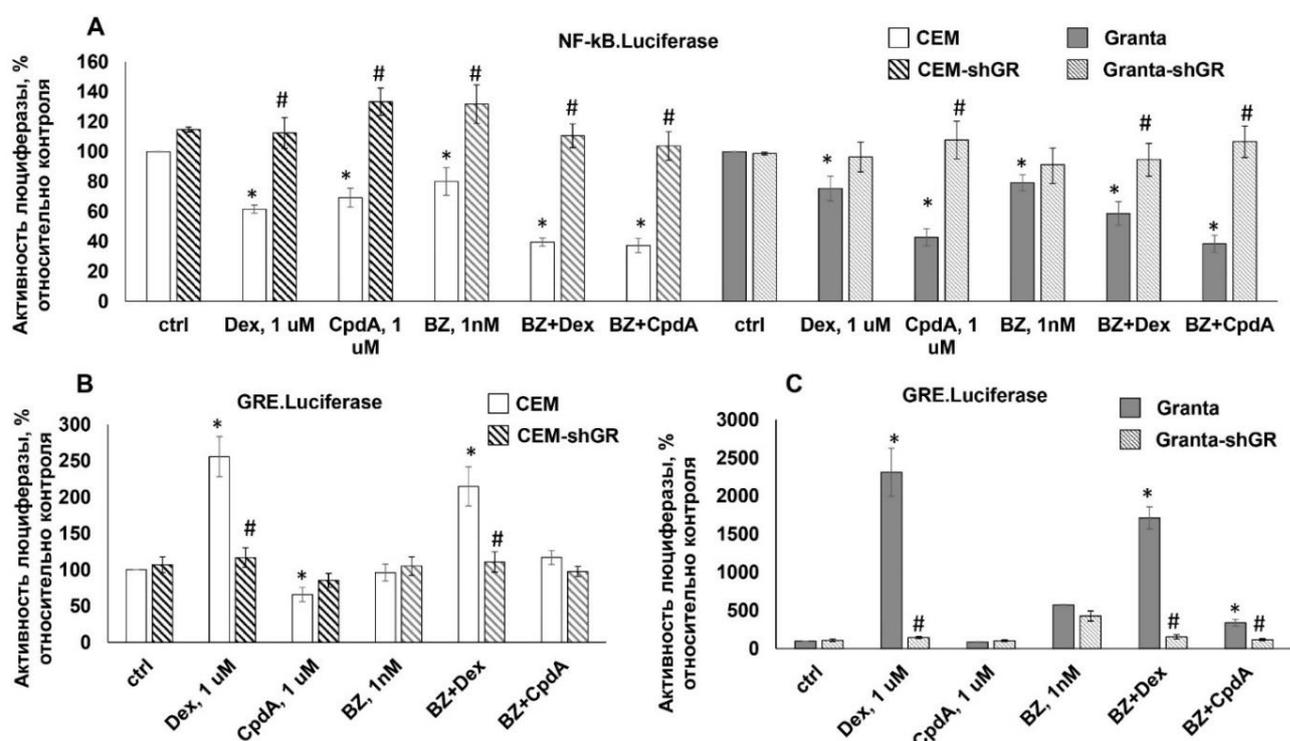


Рисунок 7 - Влияние Dex, CpдA, BZ и их комбинаций на степень запуска GR-зависимой транс-репрессии и транс-активации. Клетки CEM (A, B) и Granta (A, C) после трансдукции лентивирусных векторов pGF1-NF- κ B и pGF1-GRE культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex (1мкМ), CpдA (1мкМ), BZ (1нМ) и их комбинаций. Затем определяли активность люциферазы. Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля ($p < 0.05$), # - статистически значимое отличие между активностью люциферазы в клетках, трансдуцированных вектором shGR и контрольным вектором pGIPZ, $p < 0.05$.

Далее было исследовано противоопухолевое действие комбинации бортезомиба с CpдA *in vivo* на модели подкожных ксенографтов лимфомы у бестимусных мышей. Было показано, что объем опухоли у животных, получавших раствор CpдA или Dex, уменьшился в 3-4 раза по сравнению с животными контрольной группы (Рисунок 8А). У животных, получавших только

бортезомиб, объем опухоли уменьшился в 2 раза, в то время как, у животных, получавших BZ+CpdA, объем опухоли уменьшился в 10 раз (Рисунок 8А). При анализе результатов ИГХ было показано, что в образцах от животных, получавших CpdA, количество жизнеспособных клеток значительно меньше, чем в контроле, о чем судили по уменьшению экспрессии TUNEL и увеличению экспрессии каспазы 3 (Рисунок 8В, С). При исследовании влияния препаратов на ангиогенез было показано, что формирование сосудов гораздо менее выражено в случае животных, получавших Dex, CpdA, BZ или BZ+CpdA (Рисунок 8D).

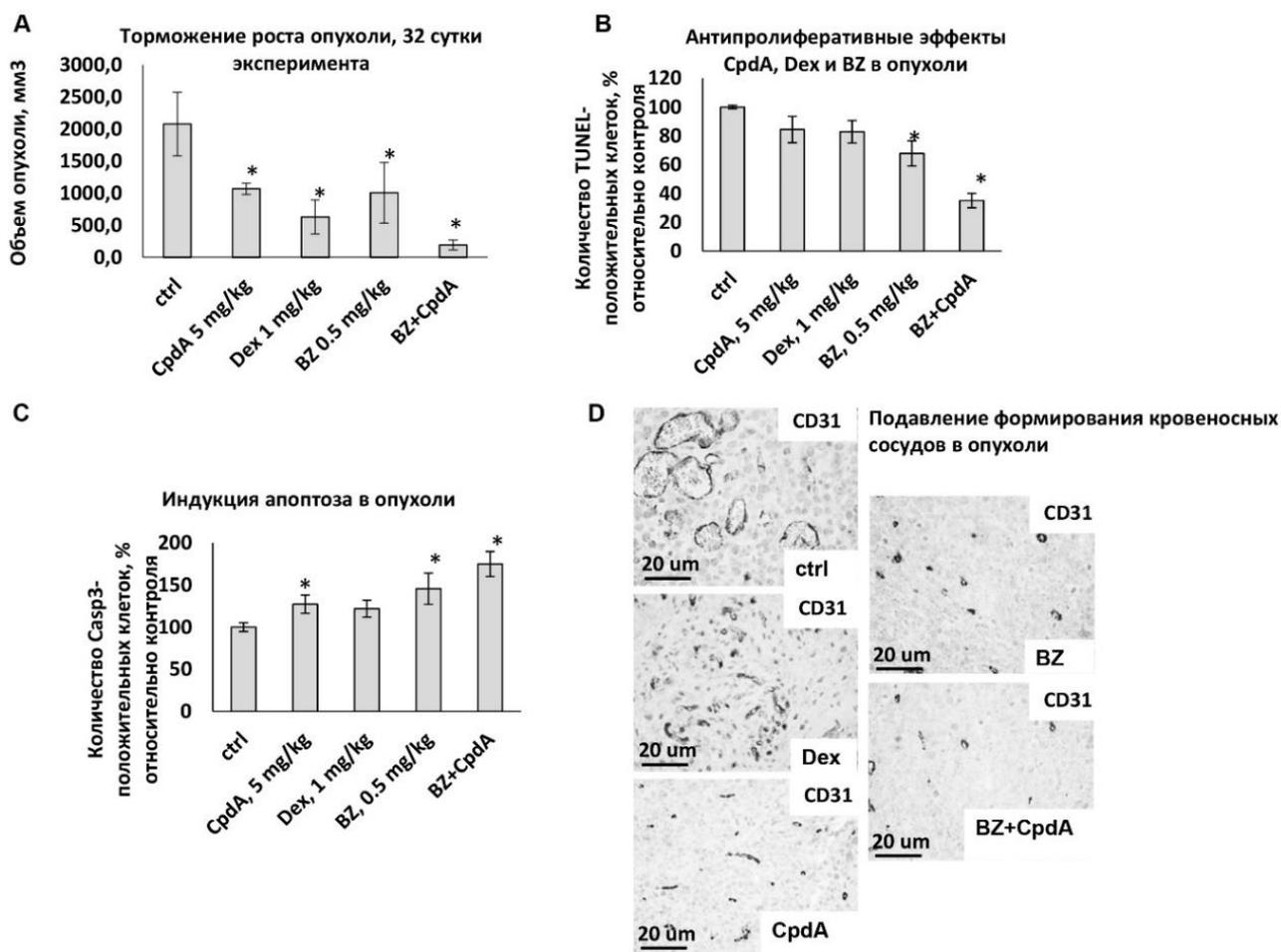


Рисунок 8 - Эффективность терапевтического действия Dex, CpdA и BZ на ксенографты лимфомы мантийной зоны селезенки Granta. **А.** Средний объем ксенографтов на 32 день эксперимента. Физиологический раствор (ctrl), Dex (1 мг/кг), CpdA (5 мг/кг) вводили внутривентриально на 1, 3 и 5 дни недели, BZ (0,5 мг/кг) вводили внутривентриально на 2 и 4 дни недели. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=10$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. **В.** Гистологические срезы опухолей в контрольной и экспериментальных группах. **С, D, Е.** Количественный анализ плотности клеток в опухоли (**С**), TUNEL- (**Д**) и Casp3- (**Е**) положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином или специфическими антителами к TUNEL и Casp3. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. **Ф.** Иммуногистохимическое окрашивание CD31.

Разработка подходов к получению новых SEGRA на основе молекулы CpдA

Как было продемонстрировано в ходе исследований, описанных выше, CpдA имеет большой трансляционный потенциал по использованию в химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы. Однако данная молекула имеет также ряд недостатков. В частности, описана ее низкая стабильность в водных растворах [Louw et al, 1997], и, хотя также описана стабилизация молекулы CpдA белками сыворотки крови при введении в кровеносное русло, это не решает проблему реализации и хранения растворов. Также молекула CpдA является хиральной – один из атомов углерода в ее составе связан с 4 различными заместителями, от взаимного расположения которых зависит конформация молекулы и, следовательно, ее биологические свойства. Оптические изомеры хиральной молекулы обладают одинаковыми физико-химическими свойствами, однако их биологические свойства могут существенно различаться. Таким образом, следующим этапом наших исследований являлись разработки подходов к повышению стабильности молекулы CpдA, а также выделение и исследование свойства энантиомеров CpдA.

Получение наночастиц золота, содержащих CpдA, и оценка их противоопухолевого эффекта in vitro

В качестве одного из подходов к стабилизации молекулы CpдA было предложено получить наночастицы из липопротеинов высокой плотности с ядром из золота (high density lipoprotein nanoparticles, HDL NP). Получение подобных наночастиц проводили совместно с лабораторией проф. Ш. Тэкстона и проф. И. Будуновой (университет Норсвестерн, Чикаго, США). HDL NP обеспечивают доставку холестерина в стероидогенные органы, где производится синтез стероидных гормонов, являющихся важными регуляторами процессов жизнедеятельности как нормальных, так и опухолевых клеток [Simons et al, 2000; Chapman, 1980]. Нами было высказано предположение, что загрузка CpдA в HDL NP будет способствовать его таргетной доставке в органы синтеза глюкокортикоидов и созданию более высокой конкуренции с эндогенными GC за связывание с GR. Более того, липопротеины высокой плотности, как и высокомолекулярные белки сыворотки, будут способствовать стабилизации молекулы CpдA. Синтез HDL NP был осуществлен с добавлением избытка CpдA. Был оценен эффект HDL NP-CpдA на жизнеспособность клеток лейкоза СЕМ и клеток лимфомы Granta. Однако в ходе исследований было показано, что цитотоксичность HDL NP, не загруженных CpдA, идентична цитотоксичности HDL NP-CpдA (IC50 для клеток СЕМ в первом случае составило 0,11 мкМ, во втором случае – 0,14 мкМ, для клеток Granta данные показатели составили 0,09 и 0,08 мкМ, соответственно). При повторении части экспериментов нами было проведено сравнение цитотоксичных свойств исходного раствора CpдA с цитотоксичностью раствора остаточного раствора после синтеза HDL NP. Было показано, что эффект данных

растворов совпадает, соответственно, проблема заключалась в недостаточной загрузке CpдA в HDL NP при синтезе, что может быть связано с отсутствием сродства CpдA к липопротеинам высокой плотности. Таким образом, была предпринята попытка стабилизации и усилению противоопухолевых свойств CpдA с помощью его загрузки в HDL NP, однако данный способ был признан неэффективным и требующим дальнейшей оптимизации, что не входило в задачи исследования.

Исследование противоопухолевой активности энантиомеров CpдA in vitro

Синтез энантиомеров CpдA (Рисунок 9) проводили на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова на основании асимметричного дигидроксилирования алкенов по Шарплессу на оптически активном субстрате (Рисунок 10). Подтверждение пространственной структуры полученных энантиомеров проводилась по измерению угла вращения плоскости поляризации монохроматического света на поляриметре, подтверждение химической структуры проводили с помощью ^1H -ЯМР-спектроскопии.

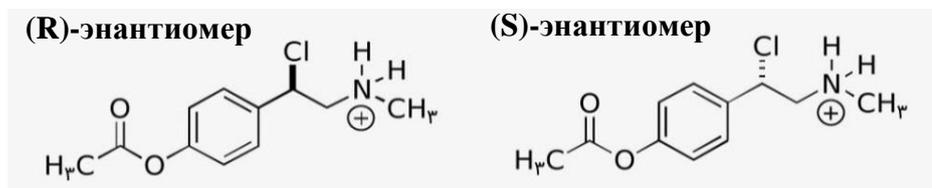


Рисунок 9 - Энантиомеры CpдA.

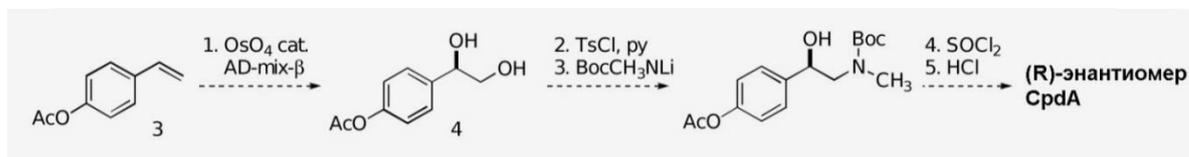


Рисунок 10 - Схема синтеза чистых энантиомеров CpдA на основании асимметричного дигидроксилирования алкенов по Шарплессу.

Определение антипролиферативного эффекта проводили в течение 48-часовой инкубации с растворителем, Dex, CpдA или энантиомерами CpдA с помощью прямого подсчета клеток. Обработка R- и S-энантиомерами CpдA клеток СЕМ-pGIPZ, обладающих нормальным уровнем экспрессии GR, привела к гибели 56 % и 43% клеток, что было близко к эффекту рацемата CpдA (Рисунок 11А) и превышало эффект Dex. При анализе эффектов как энантиомеров, так и рацемата CpдA и Dex на клетки СЕМ-shGR с подавленной экспрессией рецептора статистически значимых эффектов при действии всех вышеупомянутых соединений не наблюдали. Аналогичные данные были получены при анализе эффектов R- и S-CpдA на клетки Granta-pGIPZ и Granta-shGR (Рисунок 11В). Данные по цитотоксичности согласовались с результатами анализа степени индукции апоптоза методом проточной цитофлуориметрии.

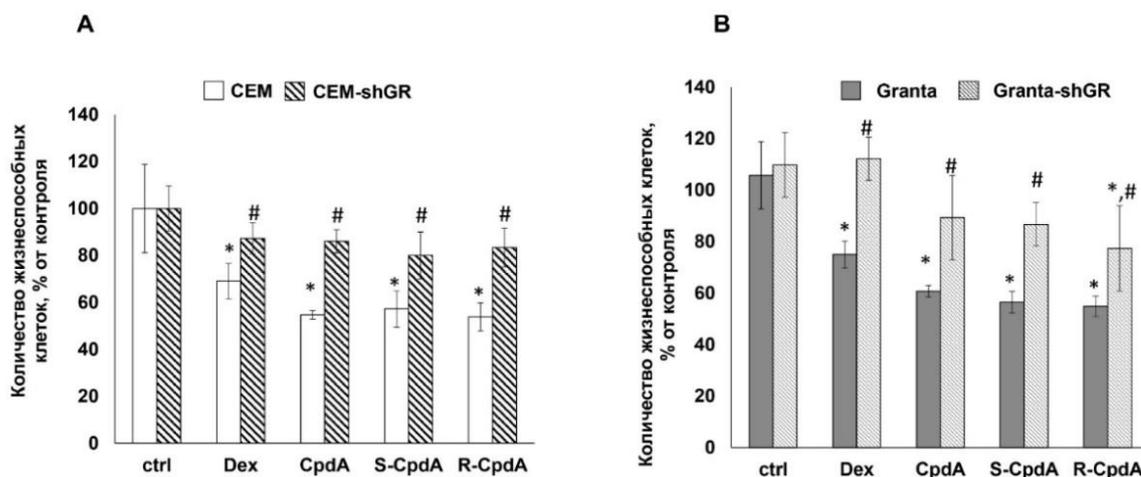


Рисунок 11 - Антипролиферативный эффект энантиомеров CpdA на клетки CEM, Granta, CEM-shGR, Granta-shGR. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантиомеров CpdA (R, S) (все соединения в концентрации 1мкМ). Подсчет количества живых клеток проводили с помощью прямого подсчета клеток. На рисунке представлено количество живых клеток после обработки Dex, CpdA или одним из энантиомеров CpdA (R, S) в процентах от контроля, обработанного растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие между числом жизнеспособных клеток, трансдуцированных вектором shGR и контрольным вектором pGIPZ, $p < 0.05$.

Оценку транс-репрессорного потенциала энантиомеров CpdA проводили по отработанной ранее схеме: анализ экспрессии генов - маркеров транс-репрессии совместно с репортерным анализом активности NF- κ B. В качестве маркеров транс-репрессии были выбраны гены, регулируемые NF- κ B – регуляторы клеточного цикла циклины D1 и D2, содержащих в промоторной области сайты связывания NF- κ B для клеток CEM, и цитокины IL-6 β и IL-1 β для клеток Granta, поскольку основным патогенетическим звеном мантийноклеточной лимфомы является хромосомная транслокация t(11;14), затрагивающая гены *IgH* и *CCND1/D2* [Тилова и соавт., 2017]. При обработке Dex клеток CEM экспрессия гена *CCND1* снизилась в 3,1 раза, в то время как при обработке CpdA этот показатель снизился в 1,7 раза. При обработке S- и R-энантиомерами экспрессия того же гена в клетках была подавлена в 1,3 и 2,2 раза (Рисунок 12A). Экспрессия гена *CCND2* после обработки Dex и CpdA снизилась на 15-20%. При оценке экспрессии *CCND2* данный показатель был отличен от контроля только в случае R-энантиомера (Рисунок 12B). Схожие результаты были отмечены для клеток линии Granta. Более выраженный эффект на подавление экспрессии *IL-1 β* был показан для S-CpdA, а в случае анализа экспрессии гена *IL-6 β* было показано, что ингибирующий эффект R-CpdA выражен сильнее (Рисунок 12C,D). Данные ПЦР-анализа подтверждались результатами люциферазного репортерного анализа, представленными на рисунке 13. После обработки клеток энантиомерами CpdA, а также рацемической смесью CpdA и Dex в качестве положительного контроля, наблюдалось снижение активности NF- κ B в 1,5-2,5 раза.

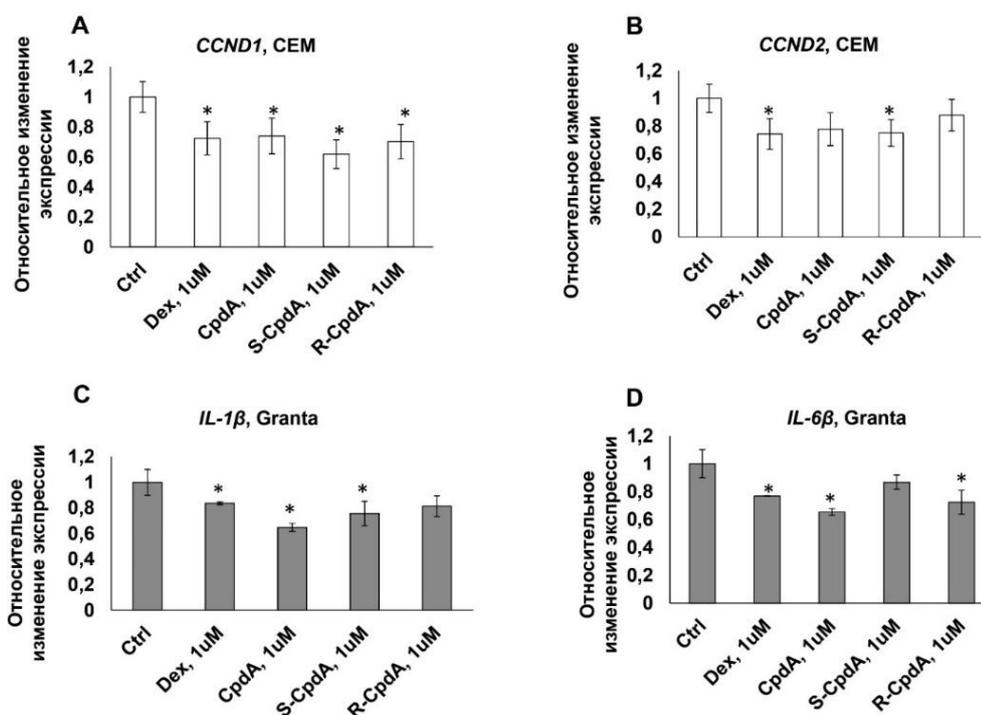


Рисунок 12 - Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию генов-маркеров транскрепрессии в клетках CEM (A, B) и Granta (C, D). Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, S-CpdA, R-CpdA (все соединения в концентрации 1мкМ). Уровень экспрессии генов *CCND1*, *CCND2*, *IL-6β* и *IL-1β* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

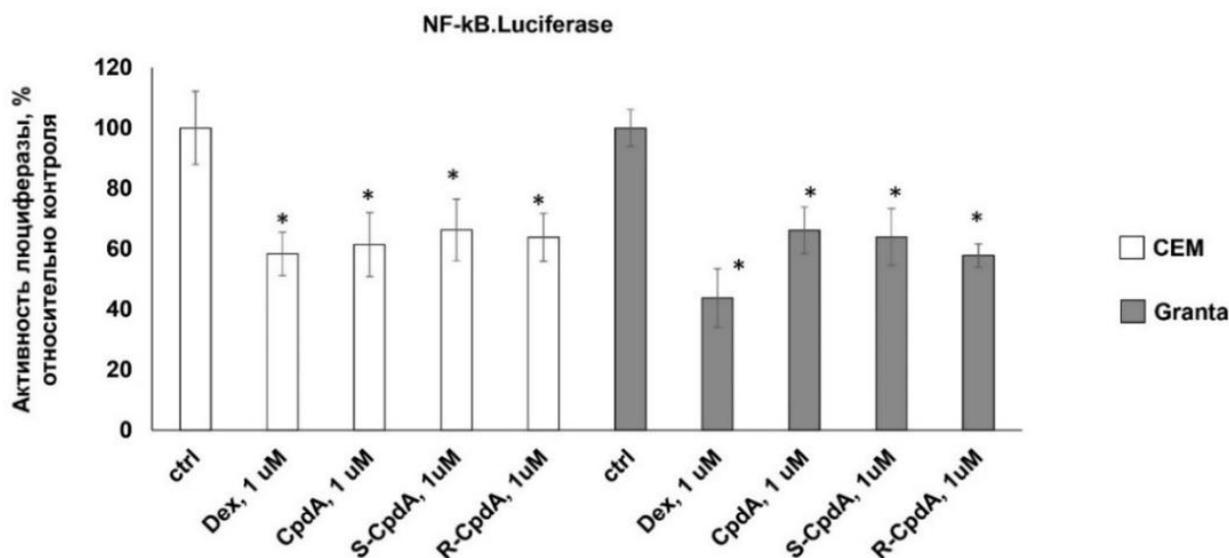


Рисунок 13 - Влияние энантиомеров CpdA на активность NF-κB. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-NF-κB клетки CEM и Granta культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, S-CpdA, R-CpdA (все соединения в концентрации 1мкМ). Затем определяли активность люциферазы. Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

Транс-активационный потенциал энантиомеров CpдA был проанализирован путем оценки изменения экспрессии GR-зависимых генов *FKBP51* и *GILZ*, несущих в своих промоторах GRE. Количество мРНК вышеперечисленных генов сильно возросло после обработки Dex в 6,1 и 5,5 раз для *FKBP51* и *GILZ* соответственно, в то время как при инкубации клеток СЕМ с CpдA экспрессия этих генов уменьшалась (Рисунок 14А, В). Для клеток Granta была показана индукция экспрессии *FKBP51* и *GILZ* после обработки Dex, а также незначительное снижение экспрессии этих генов при обработке CpдA на 15-25% (Рисунок 14С, D). Экспрессия гена *FKPB51* при обработке клеток СЕМ и Granta S-энантиомером CpдA снижалась в 2 раза, аналогичное наблюдение было сделано по экспрессии гена *GILZ* в клетках СЕМ. Снижение уровня транскрипции данных генов на 10-20% было показано для клеток обеих линий при обработке их R-CpдA. Данные ПЦР согласовались с данными репортерного анализа (Рисунок 15).

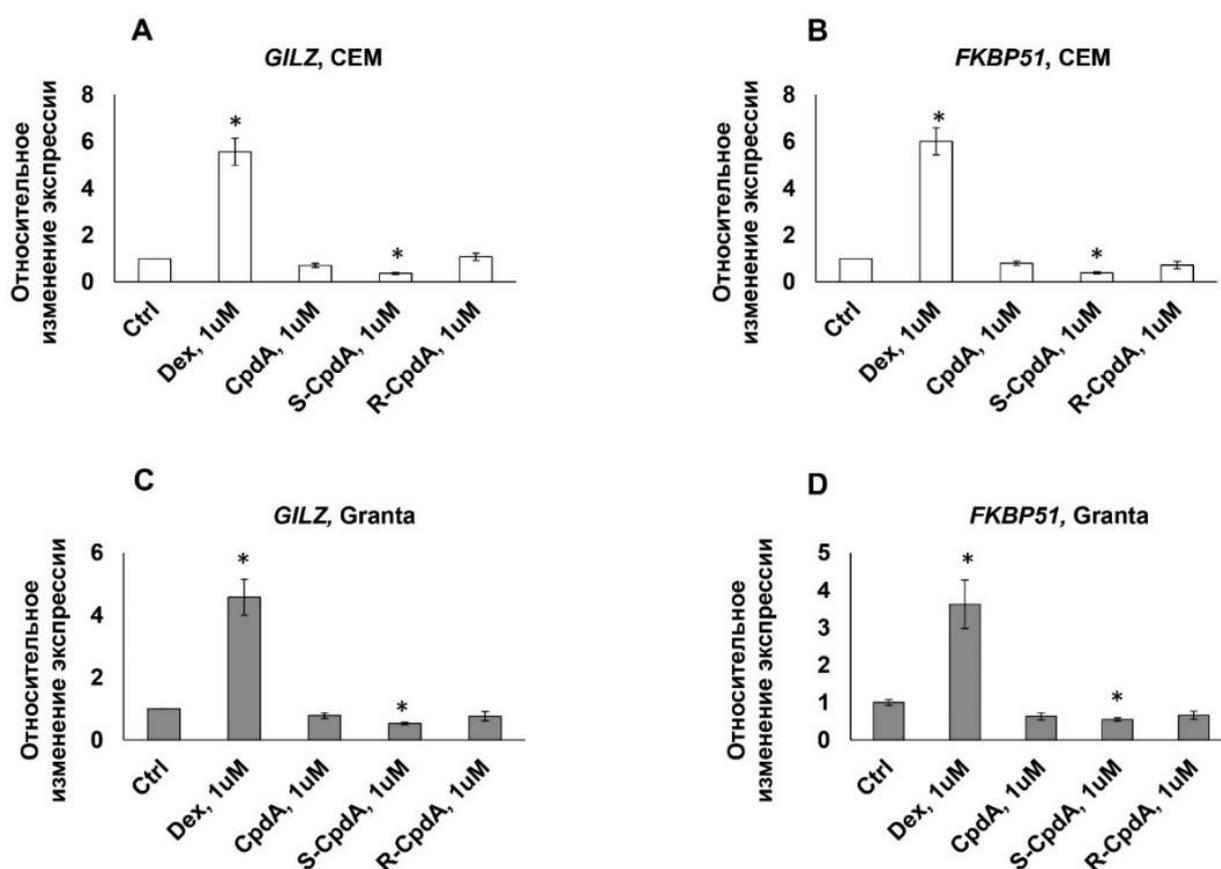


Рисунок 14 - Влияние энантиомеров CpдA на экспрессию генов-маркеров транс-активации. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA, S-CpдA, R-CpдA (все соединения в концентрации 1мкМ). Уровень экспрессии *FKPB51* и *GILZ* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена RPL27. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

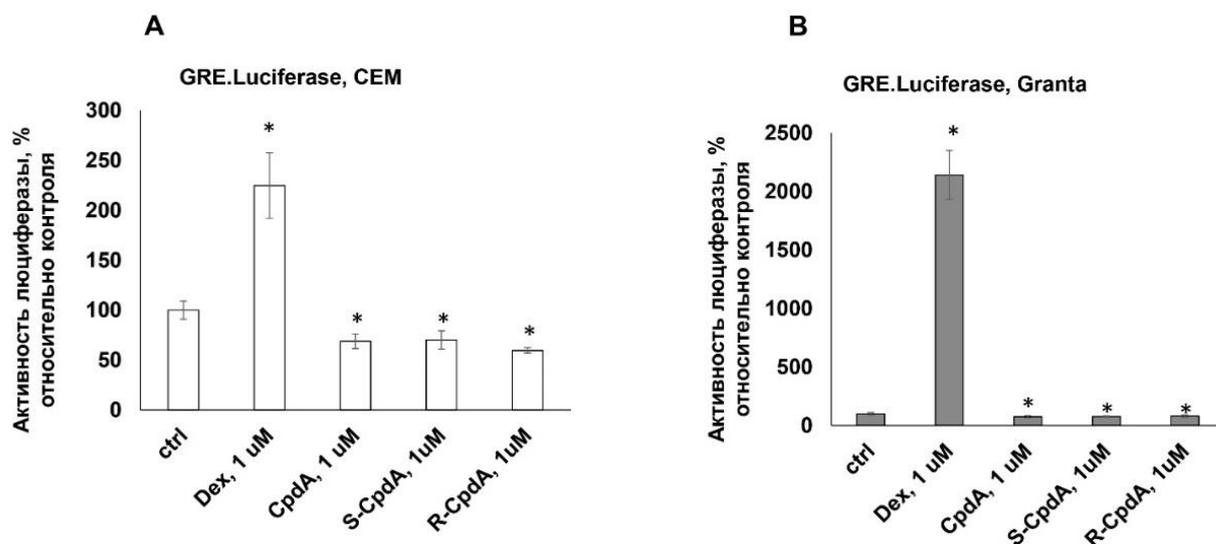


Рисунок 15 - Влияние энантиомеров CpdA на активность GR. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки CEM и Granta культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, S-CpdA, R-CpdA (все соединения в концентрации 1 мкМ). Затем определяли активность люциферазы. Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

Также для определения мутагенной активности энантиомеров CpdA нами был проведен мутационный тест на *Salmonella Typhimurium* по учету мутаций к прототрофности по гистидину при действии химических соединений или их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены основания или сдвига рамки считывания в геном бактериального организма. В контрольных образцах частота индуцируемых мутаций не превышала стандартного уровня, соответствующего генетическим особенностям каждого тестерного штамма. Активность фракции S9 была подтверждена: промутагены 2-АФ и БП индуцировали высокий уровень реверсий. Высокая специфичность мутагенного ответа была подтверждена испытаниями штамма TA98 с мутагеном ДДТДП (индуктор мутаций сдвига рамки считывания) и штамма TA100 с азидом натрия (индукция мутаций замены пар оснований). Изучение мутагенной активности энантиомеров CpdA показало, что слабую мутагенную активность в высоких дозах наблюдали у R-энантиомера CpdA на штамме TA98, что согласовалось с данными, полученными нами ранее по мутагенной активности в высоких дозах рацемической смеси.

Таким образом, был отработан синтез оптических изомеров CpdA и исследованы их биологические свойства. Было показано, что оба энантиомера CpdA проявляют GR-зависимые противоопухолевые эффекты *in vitro*, а также способны избирательно индуцировать транскрипционную репрессию. Гипотеза о том, что энантиомеры CpdA обладают различными биологическими свойствами, подтверждена не была, однако отработанный метод синтеза может служить основой для получения оптически чистых SEGRA на основе молекулы CpdA в будущем.

Исследование противоопухолевой активности химических производных CpдA

Как было упомянуто выше, CpдA является нестабильным в водных растворах соединением, распадающимся с образованием фенилазиридина, относящегося по классификации МАИР к канцерогенам класса 2Б. Аналоги CpдA с более стабильной структурой в литературе не описаны. В рамках данного исследования был синтезирован ряд ранее неизвестных химических производных CpдA. Для получения целевых соединений были разработаны два альтернативных подхода к их синтезу. **Первая синтетическая стратегия** включает четырех стадийный метод исходя из коммерчески доступных 1-арилэтанонов. **Второй синтетический протокол** базируется на подходе, где ключевой стадией является синтез аминоспиртов по реакции азометинового илида с ароматическими альдегидами [Moshkin et al, 2013]. Были оптимизированы методы получения промежуточных и целевых соединений, и получены 8 химических производных CpдA (Рисунок 16).

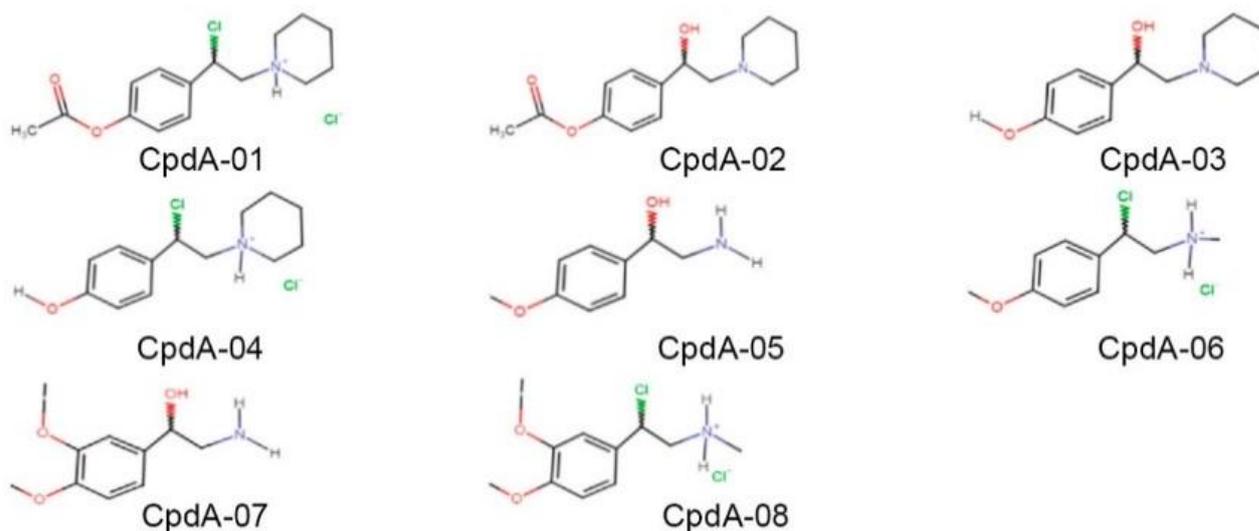


Рисунок 16 - Структуры полученных химических производных CpдA.

При обработке клеток исследуемыми соединениями в выбранных концентрациях наиболее сильный GR-зависимый антипролиферативный эффект на клетки линии СЕМ и Granta был показан для соединений CpдA-03, 04, и CpдA-05. Так, при инкубации клеток Granta с CpдA-03 в концентрации 1 мкМ доля жизнеспособных клеток составила 56,3% после 24 ч инкубации. При инкубации с этим же соединением клеток СЕМ количество живых клеток составляло 65,3% от контроля. Количество жизнеспособных клеток при обработке клеток СЕМ и Granta соединениями CpдA-04 и CpдA-05 было примерно в том же диапазоне (Рисунок 17). Данные по цитотоксичности согласовались с результатами анализа степени индукции апоптоза методом проточной цитофлуориметрии.

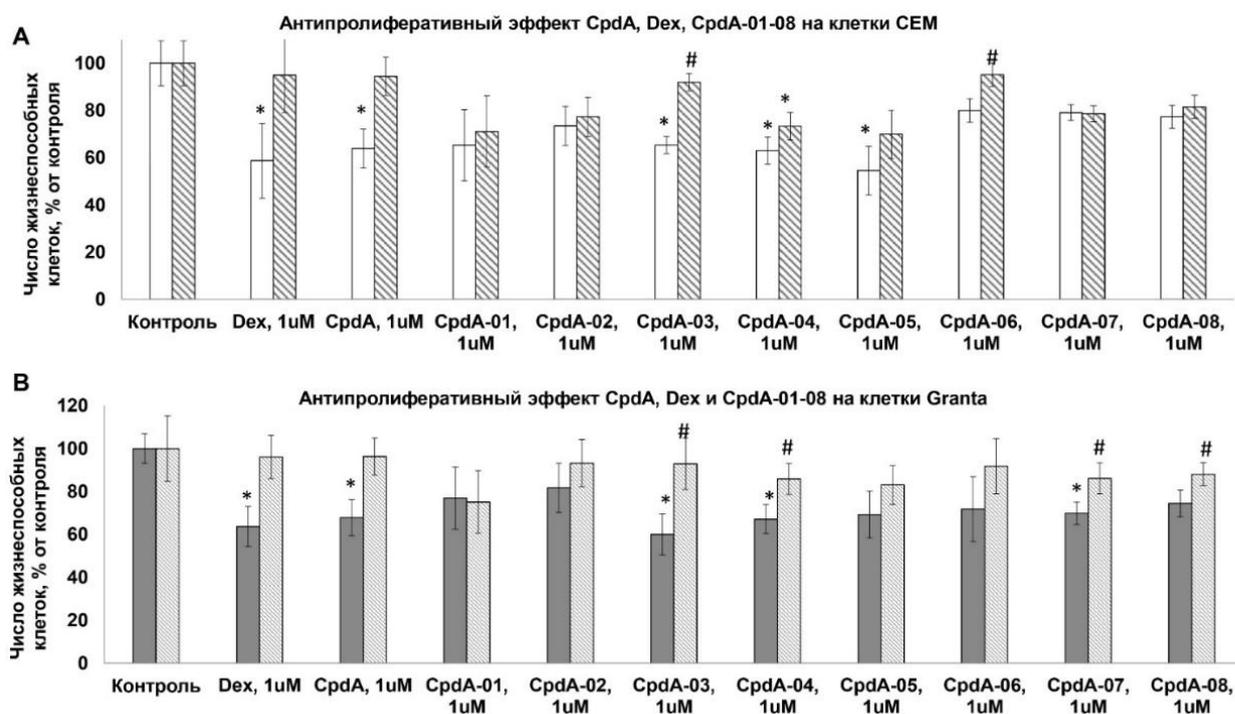


Рисунок 17 - Антипролиферативный эффект химических производных Cpda на клетки CEM, CEM-shGR (A), Granta, Granta-shGR (B). Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex, Cpda или Cpda-01-08 (все соединения в концентрации 1μM). Подсчет количества живых клеток проводили с помощью прямого подсчета клеток. На рисунке представлено количество живых клеток после обработки Dex, Cpda или Cpda-01-08 в процентах от контроля, обработанного растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие между числом жизнеспособных клеток, трансдуцированных вектором shGR и контрольным вектором pGIPZ, $p < 0.05$.

Одной из наиболее важных задач представленной работы является прямое доказательство физического взаимодействия химических производных Cpda с рецептором. Для анализа связывания производных Cpda с GR были выбраны наиболее цитотоксичные соединения, цитотоксический эффект которых определялся уровнем рецептора в клетках: Cpda-03-06. Соединение Cpda-01 было использовано как контрольное соединение со слабыми цитотоксическими свойствами и реализацией цитотоксического эффекта на GR-регулируемые сигнальные пути. При исследовании связывания нами был использован метод определения аффинности потенциального лиганда к рецептору по изменению поляризации конкурентного флуоресцентно меченого лиганда. За концентрацию, при которой наблюдалось 50% ингибирование связывания конкурентного флуоресцентно-меченого лиганда Fluormone GS1 (IC_{50}), принимали ту концентрацию, при которой наблюдалось уменьшение поляризации комплекса GR с Fluormone GS1 в 2 раза относительно максимума. Было показано, что IC_{50} для Dex, который использовали в качестве положительного контроля, составила 22 нМ, что совпадает с данными литературы [Brandon et al, 1995]. IC_{50} для исходного соединения Cpda

составила 2,2 мкМ, что также совпадает с данными литературы. IC₅₀ для СpdА-03 лежала в том же диапазоне и составила 1,8 мкМ, в отличие от СpdА-04, IC₅₀ которого была в 10 раз выше и составила 21,3 мкМ (Таблица 2). Для СpdА-05, -06 и 01 не было показано существенное изменение поляризации флуоресценции при инкубации с GR и Fluormone GS1.

Таблица 2 - Концентрации Dex, СpdА, СpdА-01-08, при которых наблюдали подавление связывания флуоресцентно меченого лиганда GR, Fluormone GS1, на 50%.

Вещество	log IC ₅₀ , нМ	±	±, %	IC ₅₀ , нМ	±
Dex	1,35	0,48	3,6	22,3	7,99
СpdА	3,36	0,27	8%	229,1 (0,23 мкМ)	18,4
СpdА-01	5,33	0,44	8%	>100мкМ	-
СpdА-02	8,34	0,71	8,5%	>100мкМ	-
СpdА-03	3,26	0,22	7%	183,5 (0,18 мкМ)	12,3
СpdА-04	4,33	0,34	8%	21163 (21,2 мкМ)	1686
СpdА-05	5,67	0,51	9%	>100мкМ	-
СpdА-06	9,13	1,78	19%	>100мкМ	-
СpdА-07	8,61	1,62	9%	>100мкМ	-
СpdА-08	7,93	0,94	12%	>100мкМ	-

Исследование транс-активационного и транс-репрессорного потенциала исследуемых соединений проводили по отработанной схеме с использованием анализа экспрессии специфических GR- и NF-κB-зависимых генов и репортерного анализа с использованием клеток СЕМ и Granta, стабильно экспрессирующих люциферазу светлячка под контролем GR- и NF-κB-зависимых промоторов. При изучении изменений экспрессии генов *CCND1* и *CCND2*, являющихся маркерами транс-репрессии, при обработке исследуемыми соединениями СpdА-01-08, СpdА и Dex, было показано, что СpdА-03, -05, -07 и -08 оказывают наибольший ингибирующий эффект на экспрессию данных генов. В частности, экспрессия гена *CCND2* в клетках СЕМ снизилась на 46% в случае соединения СpdА-03, на 23% - при обработке СpdА-05, на 24% и на 44% при обработке клеток СpdА-07 и -08, соответственно. В клетках линии Granta, где в качестве маркеров транс-репрессии использовали гены *IL-6β* и *IL-1β*, их экспрессия падала при обработке СpdА-03 38% и 39%, аналогичные показатели для СpdА-04 составили 4,3% и 8,6% (Рисунки 18 и 19). Эти данные подтверждали с помощью люциферазного репортерного анализа, где было показано, что снижение активности NF-κB происходит в случае СpdА-02 в 1,5 раза, СpdА-03 – в 2,5 раза, СpdА-05 – в 1,7 раза, в случае остальных соединений подавление активности люциферазы было статистически незначимым (Рисунок 18).

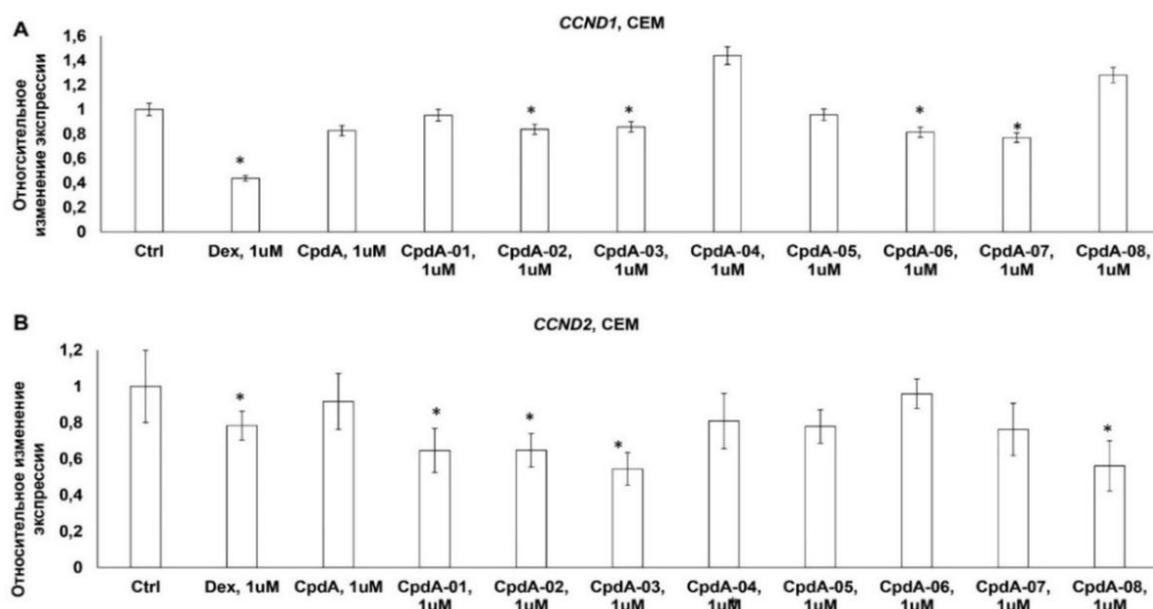


Рисунок 18 - Влияние химических производных CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-репрессии *CCND1* (A) и *CCND2* (B) в клетках CEM. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1мкМ). Уровень экспрессии генов *CCND1* и *CCND2* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена RPL27. Данные представлены как M±SD (n=3), * - статистически значимое отличие от контроля, p<0.05.

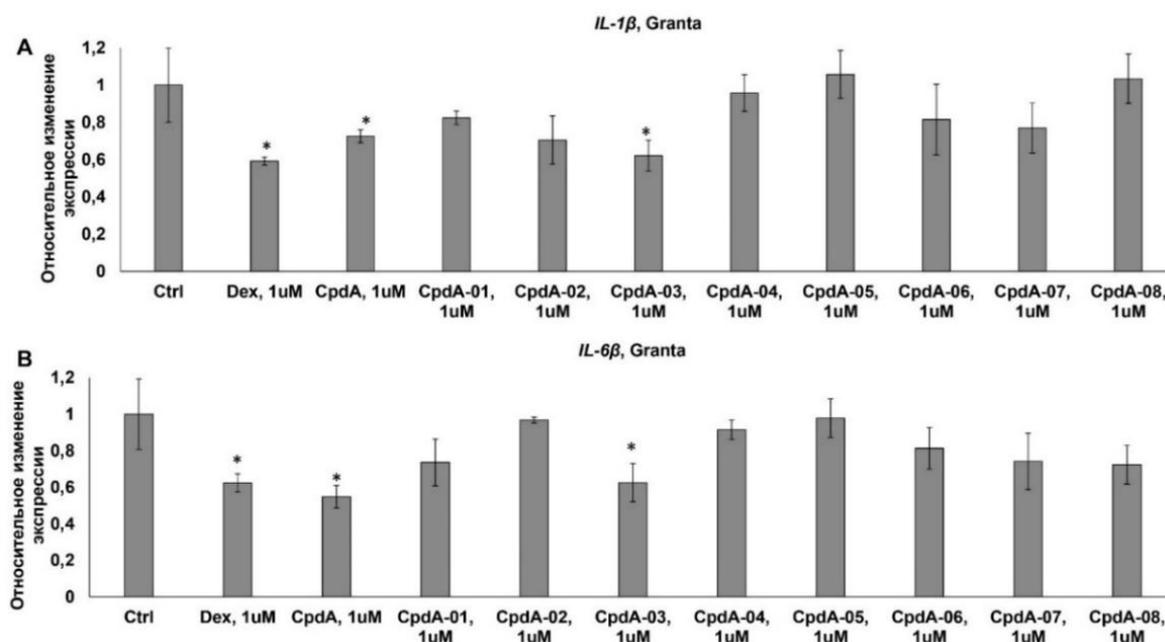


Рисунок 19 - Влияние химических производных CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-репрессии *IL-6β* (A) и *IL-1β* (B) в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1мкМ). Уровень экспрессии генов *IL-6β* и *IL-1β* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена RPL27. Данные представлены как M±SD (n=3), * - статистически значимое отличие от контроля, p<0.05.

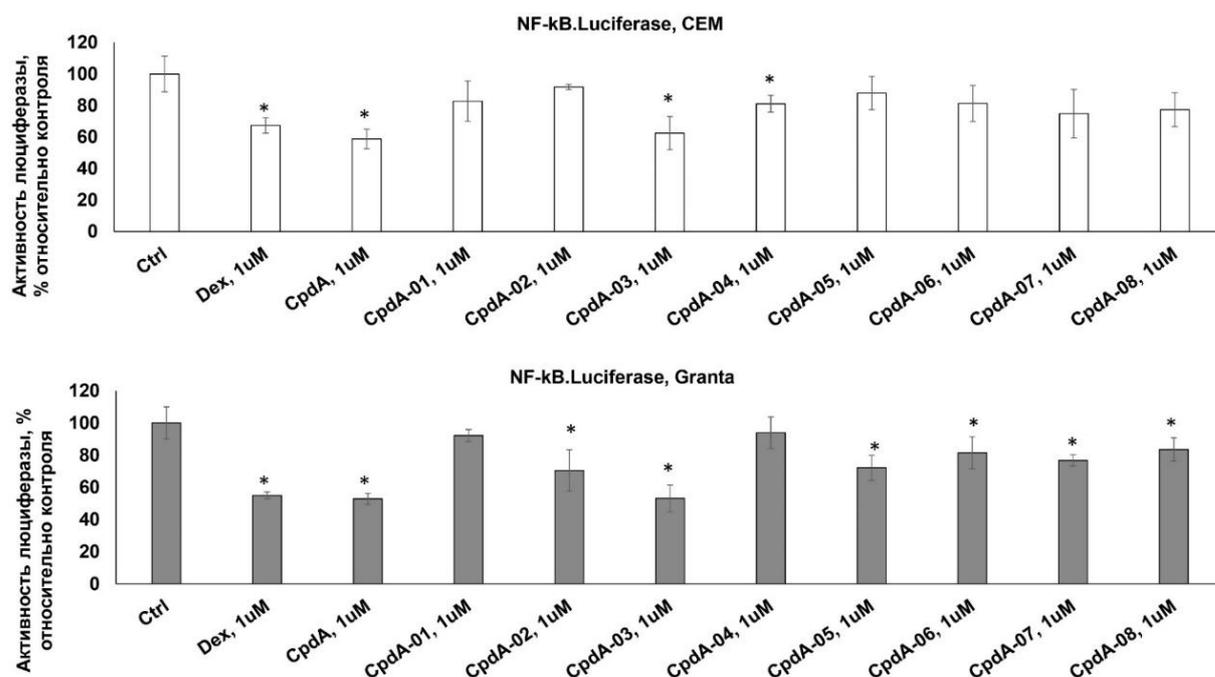


Рисунок 20 - Влияние химических производных CpdA на активность NF-kB. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-NF-kB клетки CEM (A) и Granta (B) культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08. Затем определяли активность люциферазы. Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

С помощью количественной ПЦР GR-зависимых генов *FKBP51* и *GILZ*, являющихся маркерами транс-активации, было продемонстрировано, что новые синтезированные аналоги CpdA преимущественно не вызывают увеличения экспрессии данных генов. Наиболее оптимальные результаты показали соединения CpdA-03 и CpdA-05, которые стабильно не увеличивали экспрессию данных генов в обеих клеточных линиях. Более того, в клетках линии Granta после обработки их CpdA-03 в концентрации 1 мкМ экспрессия гена *FKBP51* падала в 1,5 раза, экспрессия гена *GILZ* - в 1,3 раза относительно контроля (Рисунки 21-22). Данные количественной ПЦР были подтверждены данными люциферазного репортерного анализа. Было показано увеличение активности люциферазы после обработки клеток Dex в 24,8 раза в случае клеток Granta-GRE.Luc и в 3,5 раза в случае клеток CEM-GRE.Luc (Рисунок 23). Незначительное увеличение активности люциферазы также было показано для соединения CpdA-02 в клетках Granta и CpdA-04 в клетках CEM, что может быть связано с его действием на активацию GR по альтернативным механизмам. Остальные химические производные CpdA либо не оказывали влияние на активность люциферазы, либо вызывали незначительное снижение на 10-20%.

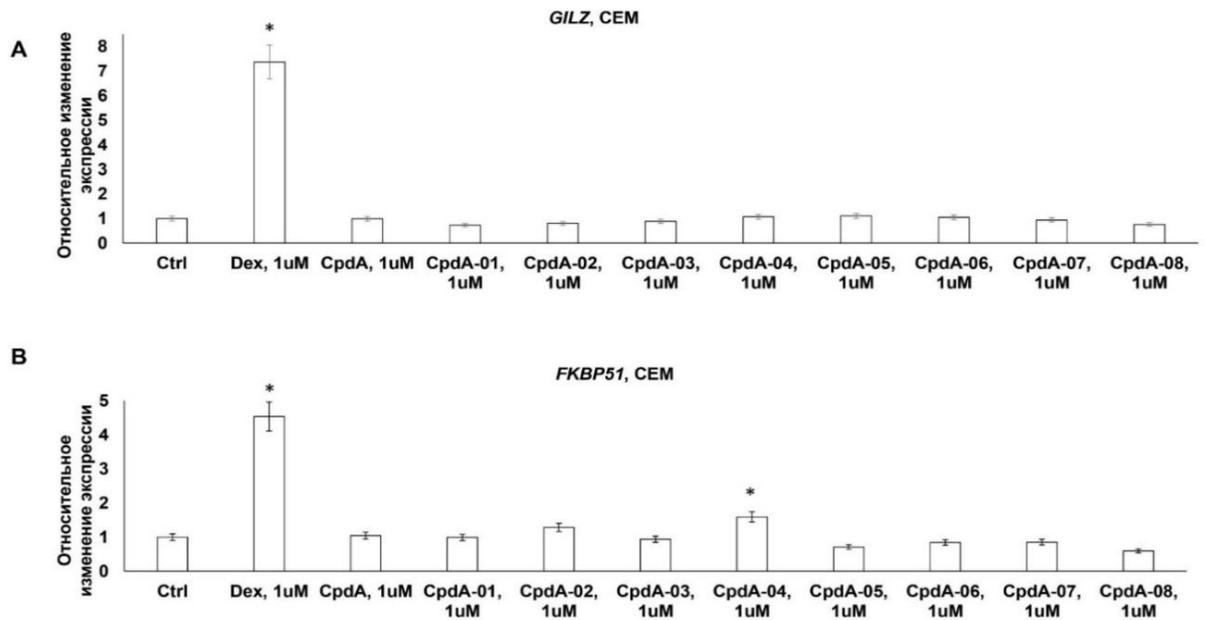


Рисунок 21 - Влияние химических производных CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-активации *GILZ* (A) и *FKBP51* (B) в клетках CEM. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08. Уровень экспрессии генов *FKBP51* и *GILZ* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

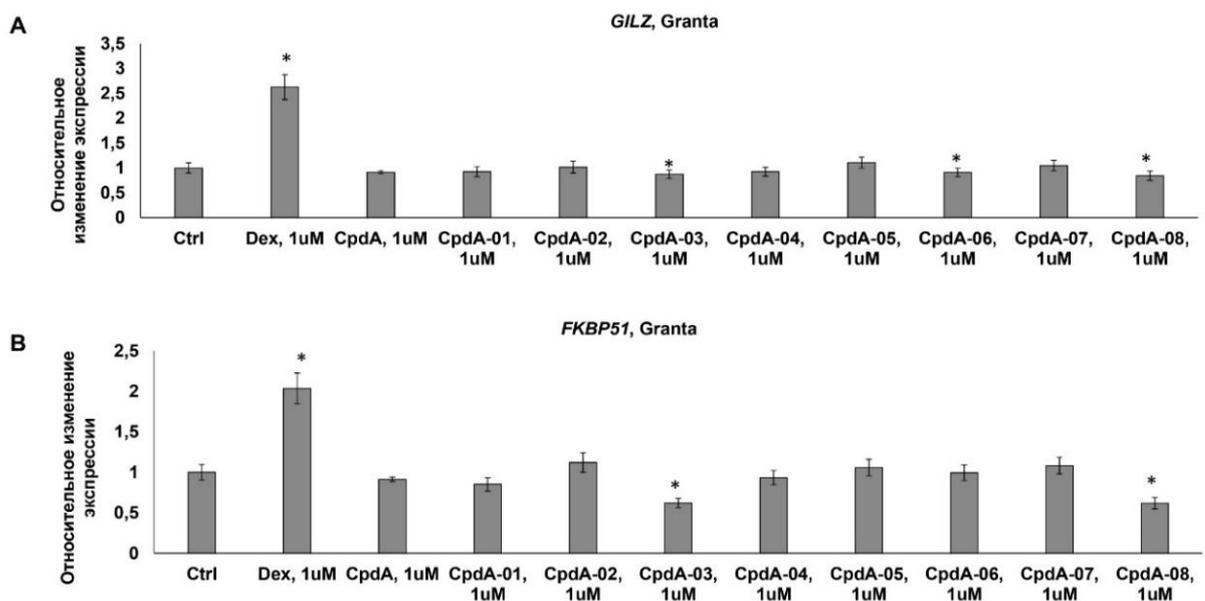


Рисунок 22 - Влияние химических производных CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-активации *GILZ* (A) и *FKBP51* (B) в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08. Уровень экспрессии генов *FKBP51* и *GILZ* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

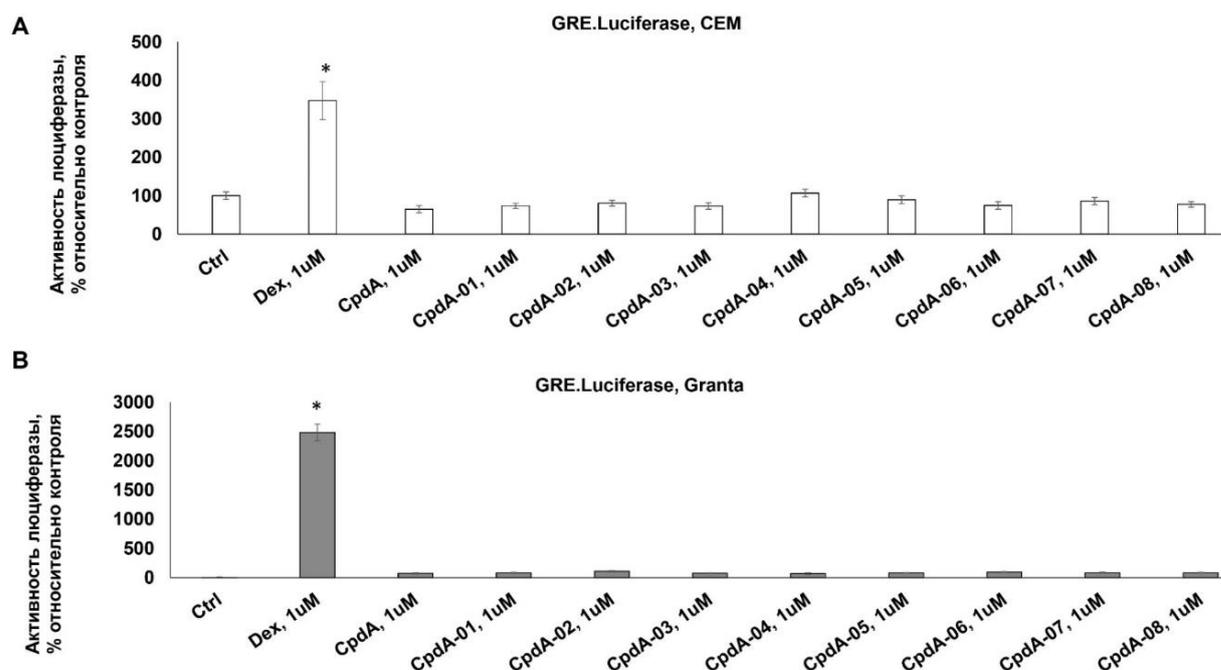


Рисунок 23 - Влияние химических производных CpdA на активность GR. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки CEM (A) и Granta (B) культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1µM). Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

Для исследования мутагенной активности химических производных CpdA был использован мутационный тест на *Salmonella Typhimurium*. В контроле частота индуцируемых мутаций не превышала стандартного уровня. Активность фракции S9 была подтверждена: промутагены 2-АФ и БП индуцировали высокий уровень реверсий. Высокая специфичность мутагенного ответа была подтверждена испытаниями штамма TA98 с мутагеном ДДТДП и штамма TA100 с азидом натрия. Изучение мутагенной активности производных CpdA показало, что исследуемые соединения не обладают мутагенной активностью.

По результатам исследований было показано, что наиболее выраженными свойствами SEGRA обладает соединение CpdA-03. В дальнейших исследованиях CpdA-03 была определена его противоопухолевая активность *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей. Инъекции CpdA-03, CpdA и Dex были начаты на 11 сутки после перевивки, после формирования первых узелков. Сравнительный анализ данных показал, что на 21 сутки после начала эксперимента отмечали статистически значимое торможение роста опухолевого узла на 57% у животных, получавших Dex, на 66% – у животных, получавших CpdA и на 78% – у животных, получавших CpdA-03 (Рисунок 24).

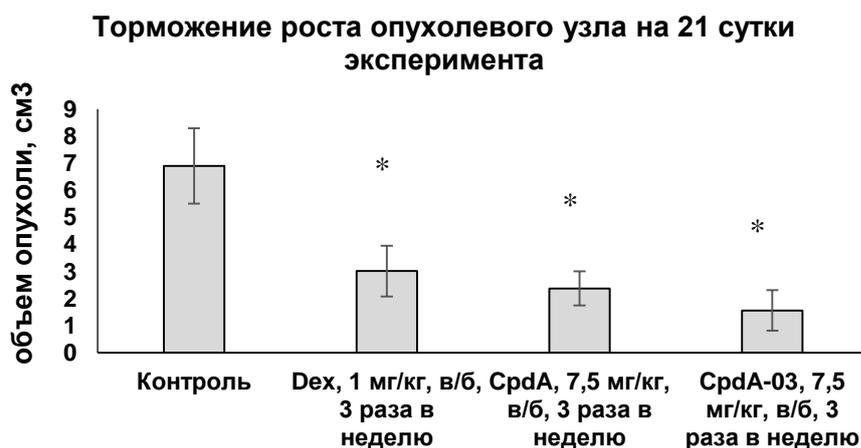


Рисунок 24 - Эффективность терапевтического действия Dex, CpдA и CpдA-03 на объем аллогraftов лимфомы P388. Перевивку лимфомы мыши P388 производили путем введения асцитной жидкости подкожно мышам DBA/2 в количестве 1 млн клеток на мышь. После формирования опухолевых узелков начинали внутрибрюшинное введение растворов Dex, 1мг/кг, CpдA, 7,5 мг/кг, CpдA-03, 7,5 мг/кг, на 1, 3, 5 дни недели. Критерием противоопухолевой активности исследуемых соединений являлась динамика торможения роста опухолевого узла. На рис. представлен средний объем аллогraftов на 21 день эксперимента. Данные представлены как $M \pm m$, * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$.

Модулирование функции глюкокортикоидного рецептора с использованием направленной регуляции GR-зависимых генов

Анализ профилей экспрессии генов с целью поиска ключевых генов, регулирующих развитие побочных эффектов глюкокортикоидов

При проведении исследований в области молекулярных механизмов действия GC, SEGRA и других лигандов глюкокортикоидного рецептора нами и другими исследователями был проведен анализ профилей экспрессии генов после воздействия данных лигандов на клетках лейкоза, лимфомы, рака предстательной железы и др. Среди генов, экспрессия которых повышалась после воздействия GC, и которые вовлечены в развитие побочных эффектов GC, был отмечен ген *REDD1*, повышенную экспрессию которого отмечали при стероид-индуцированной атрофии. *REDD1* является GR-зависимым геном, индуцируемым стрессом ингибитором mTOR [Baida et al, 2015; Shimizu et al, 2011]. Нами было показано, что мыши, нокаутные по *REDD1*, устойчивы к воздействию GC: в отличие от животных дикого типа, у мышей с нокаутом *REDD1* не наблюдали снижения толщины эпидермиса. В коже здоровых добровольцев, наносивших на кожу клобетазола пропионат хронически в течение 14 дней ежедневно (Рисунок 25, V1-V3) и однократно (Рисунок 25, V4 и V5) наблюдали значительное повышение экспрессии *REDD1*. Таким образом, было показано, что экспрессия *REDD1* увеличивается под действием GC. Оценка влияния ингибирования *REDD1* на фармакологический и молекулярный профиль действия GC представляется актуальной.

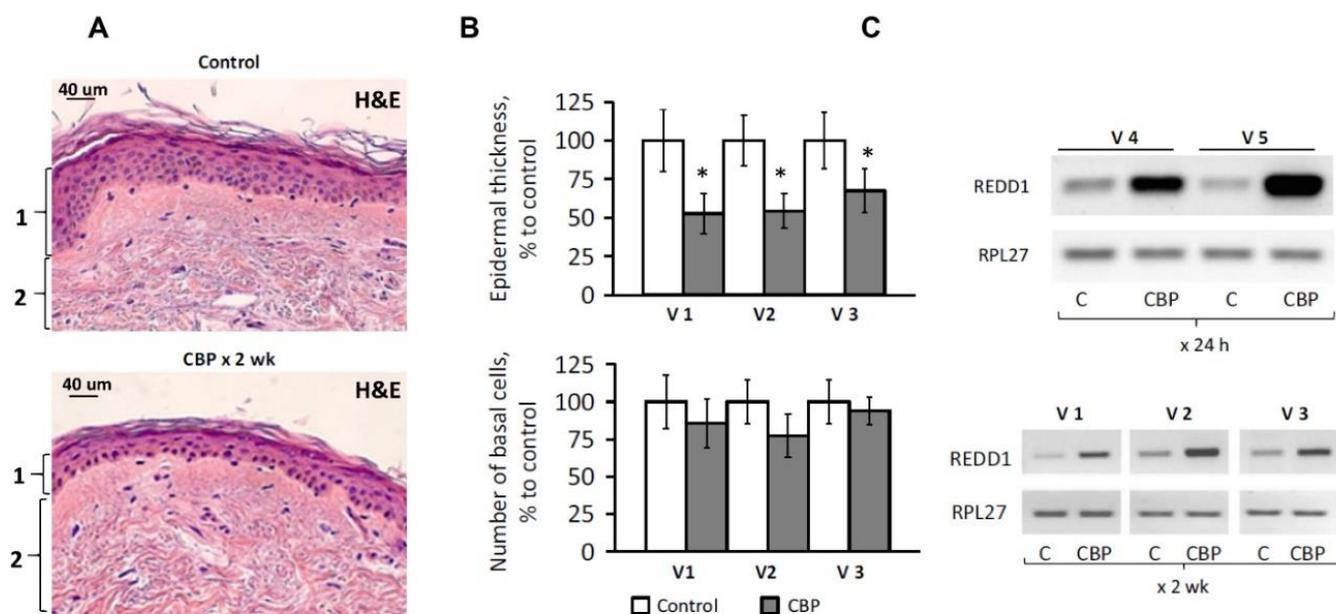


Рисунок 25 - Эффект местных накожных GC на толщину эпидермиса и на экспрессию *REDD1*. А-С. Кожу здоровых добровольцев обрабатывали ежедневно в течение 14 суток (V1-V3) или однократно (V4 и V5) клобетазола пропионатом. А. Гистологические срезы кожного покрова человека. В. Морфометрический анализ толщины эпидермиса и число кератиноцитов в базальном слое (проанализировано 30 микрофотографий на группу). С. Полуколичественный ПЦР-анализ экспрессии *REDD1*. В качестве контроля загрузки использовали количество ПЦР-продукта *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. Условные обозначения: 1 – эпидермис, 2 – дерма.

Биоинформатический скрининг баз данных для поиска потенциальных ингибиторов

REDD1 и предварительный скрининг биологических свойств *in vitro*

Поскольку фармакологические ингибиторы *REDD1* в литературе не описаны, в сотрудничестве с лабораторией Дж. Т. Дадли (госпиталь Маунт Синай, Нью Йорк, США) нами был проведен отбор препаратов с помощью баз данных «карта взаимодействий» (Connectivity Map, CMap). Было отобрано 9 соединений с предсказанной способностью ингибировать *REDD1 in silico*: антипротозойное средство эметин (Eme), ингибитор протеинкиназы С CGP-60474, ингибиторы mTOR рапамицин (Rapa) и OSI-027, противопротозойный и противомикробный препарат метронидазол (Met), антигельминтное средство левамизол (Leva), ингибитор холинэстеразы физостигмин (Phys), противоопухолевые препараты доксорубицин (Dox) и митоксантрон (Mito) и др. Для отобранных препаратов нами было оценено их влияние на экспрессию гена *REDD1*. Данные, представленные на рисунке 26А, свидетельствуют о том, что *REDD1* действительно является GC-индуцируемым геном: его экспрессия возрастала в клетках СЕМ после обработки Dex в 10,8 раз и в клетках Granta в 6 раз. Значительное снижение базальной и Dex-индуцированной экспрессии *REDD1* наблюдали для рапамицина, OSI-027, физостигмина и эметина: в частности, в случае эметина экспрессия *REDD1* в необработанных

Дех клетках СЕМ снижалась в 2,2 раза относительно контроля, а GC-индуцированная экспрессия *REDD1* снижалась в 1,2 раза относительно контроля и в 12 раз относительно Дех-индуцированного уровня. Рапамицин проявил наиболее высокую способность ингибировать экспрессию *REDD1* в клетках обеих линий (Рисунок 26B). В дальнейших исследованиях был определен цитотоксический эффект наиболее активных препаратов, Rapa, Eme, Phys и OSI-027, на клетки Granta и СЕМ в сочетании с GC. Было показано, что синергизмом действия на обеих клеточных линиях обладает рапамицин: расчетное значение CI для комбинации с Дех составило 0,763 на клетках СЕМ и 0,837 на клетках Granta (Таблица 3). Тенденцией к синергическому цитотоксическому эффекту также обладала комбинация Дех с OSI-027.

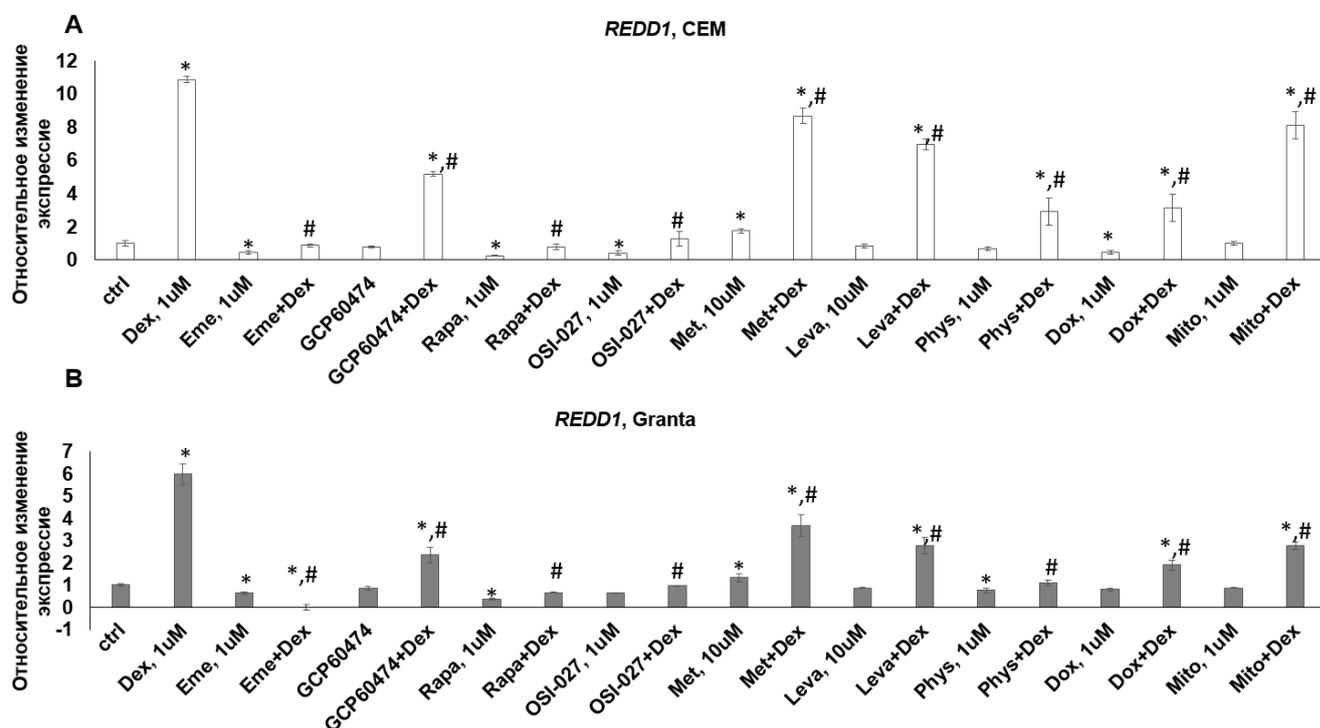


Рисунок 26 - Эффект ингибиторов *REDD1* на базальную и GC-индуцированную экспрессию *REDD1* в клетках СЕМ (А) и Granta (В). Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии растворителя или Дех, затем добавляли препараты и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *REDD1* определяли методом количественной ПЦР. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Дех, $p < 0.05$.

Таблица 3 - Комбинационный индекс (combination index, CI), характеризующий эффективность совместного действия Дех и наиболее активных ингибиторов *REDD1*.

Комбинация препаратов	CI, СЕМ	CI, Granta
Rapa+Dex	0,763	0,837
Eme+Dex	0,898	0,974
OSI-027+Dex	0,813	0,919
Phys+Dex	0,964	0,971

Примечание: $CI < 1$, $CI = 1$ и $CI > 1$ показывают соответственно синергизм, аддитивный эффект или антагонизм рассматриваемых воздействий.

Оценка влияния рапамицина на GR-зависимую экспрессию гена REDD1

По результатам оценки влияния отобранных соединений на экспрессию REDD1 и по цитотоксическому эффекту наиболее активным соединением оказался иммуносупрессор рапамицин. При скрининге *in silico* было показано, что данный препарат был протестирован в наибольшем количестве молекулярно-биологических тестов: для Rapa их число составило 40, в то время как для остальных препаратов - 2-6 теста. Rapa был выбран нами в качестве основного препарата для дальнейших исследований. Был отработан оптимальный режим обработки клеток, включающий в себя 6-часовую предобработку Rapa и дальнейшую инкубацию в течение 24 ч с Dex. Активность Rapa оценивали по степени фосфорилирования эфферентных мишеней пролиферативного комплекса mTOR белка связывания 1 фактора инициации 4E эукариот (4E-ВР1) и рибосомного белка S6 (rpS6) (Рисунок 27). Уровень фосфорилирования данных белков был значительно подавлен, что свидетельствует о снижении активности mTOR.

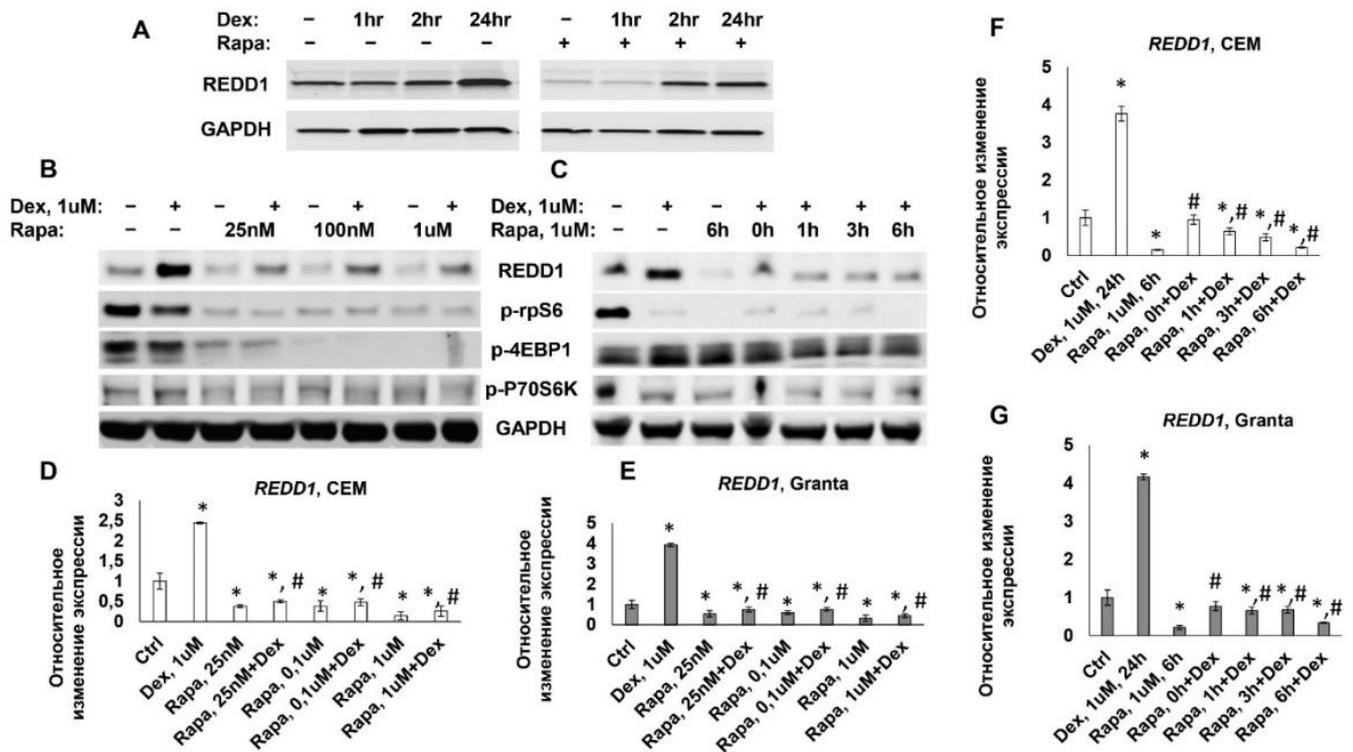


Рисунок 27 - Зависимость подавления экспрессии REDD1 от концентрации Rapa и от времени обработки. **А.** Клетки обрабатывали Rapa в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex и инкубировали в течение указанного времени. **В, D, Е.** Клетки обрабатывали Rapa в указанных концентрациях в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex, и инкубировали в течение 24 ч. **С, F, G.** Клетки обрабатывали Rapa в течение указанного времени, затем в среду добавляли Dex, и инкубировали в течение 24 ч. Экспрессию REDD1 анализировали методом Вестерн блоттинга и количественной ПЦР, p-rpS6, p-4EBP1 и p-p70S6K - методом Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов использовали антитела к GAPDH. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$.

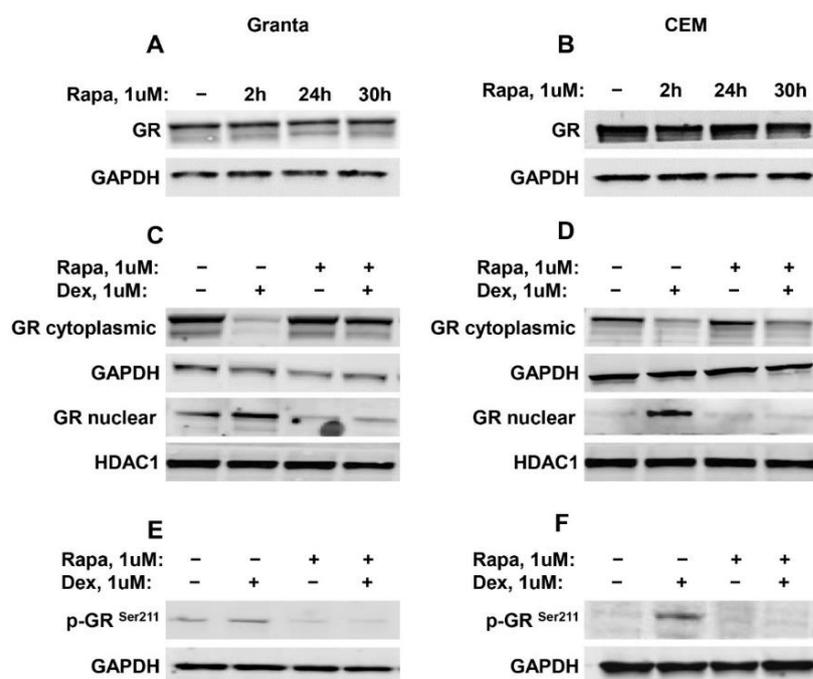


Рисунок 28 - Эффекты Рапа на фосфорилирование GR и его ядерную транслокацию в клетках Granta и CEM. Клетки обрабатывали Рапа (1 мкМ) в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Экспрессию GR в тотальном клеточном лизате (**A, B**), цитоплазматической и ядерной фракциях (**C, D**), p-GR в тотальном клеточном лизате (**E, F**) анализировали методом Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали антитела к GAPDH и HDAC1.

REDD1 является GR-зависимым геном. В связи с этим, нами было изучено влияние рапамицина на запуск процесс транс-активации GR с помощью люциферазного репортерного анализа. Клетки исследуемых линий были трансдуцированы лентивирусным репортером, несущим ген люциферазы светлячка по контролю промотора, содержащего множественные GRE. Нами было продемонстрировано, что рапамицин значительно снижает активность люциферазы при обработке клеток Dex в клетках всех исследуемых линий (Рисунок 29). Далее нами был проведен анализ влияния рапамицина на транс-репрессию GR также с помощью люциферазного репортерного анализа с использованием NF-κB-зависимого репортера. Было показано, что как Dex, так и рапамицин снижали активность NF-κB, более того, при использовании данных препаратов в комбинации наблюдался кооперативный эффект подавления активности NF-κB (Рисунок 30).

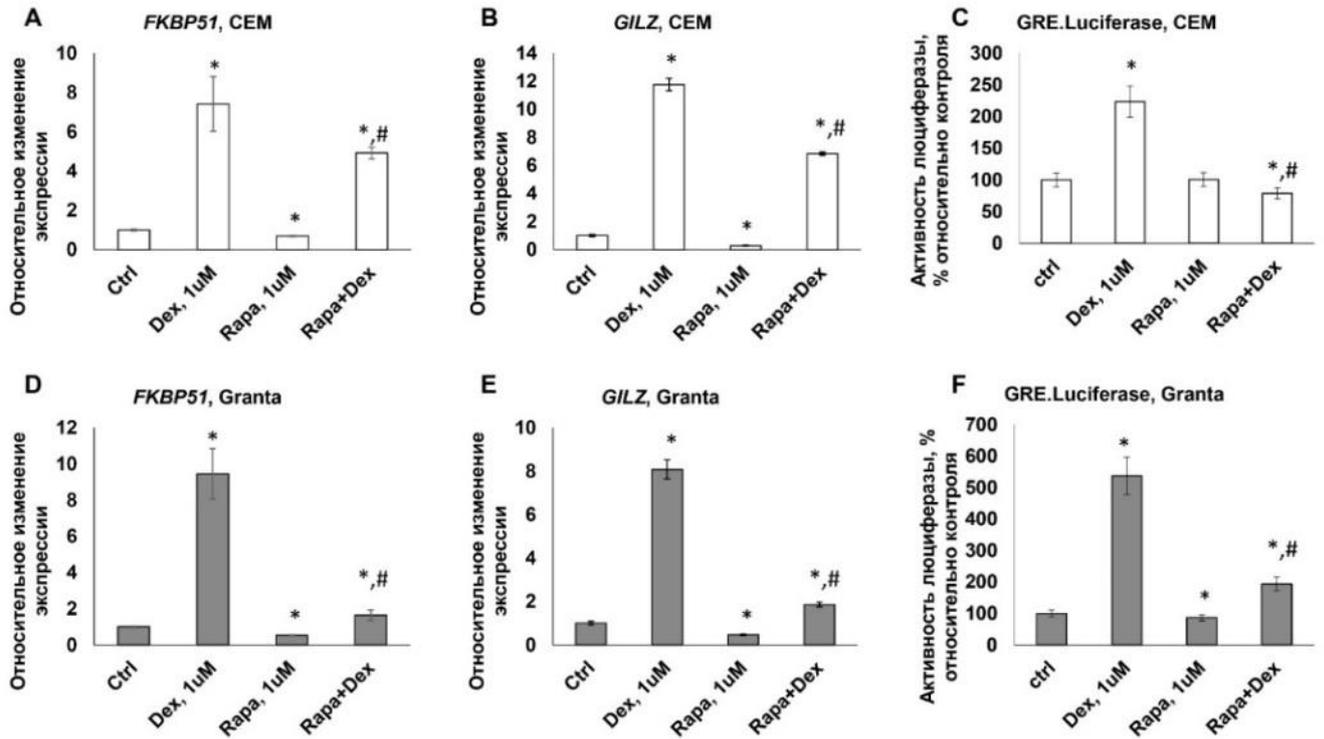


Рисунок 29 - Влияние Rapa на транс-активацию GR в клетках CEM (A, B, C) и Granta (D, E, F). A, B, D, E. Клетки обрабатывали Rapa или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *FKBP51* и *GILZ* определяли методом количественной ПЦР. Количество ПЦР-продуктов нормализовали по количеству продукта гена *RPL27*. C, F. После трансдукции вектора pGF1-GRE клетки обрабатывали Rapa или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 8 ч. Затем определяли активность люциферазы. Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные контрольным CMV-вектором. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$.

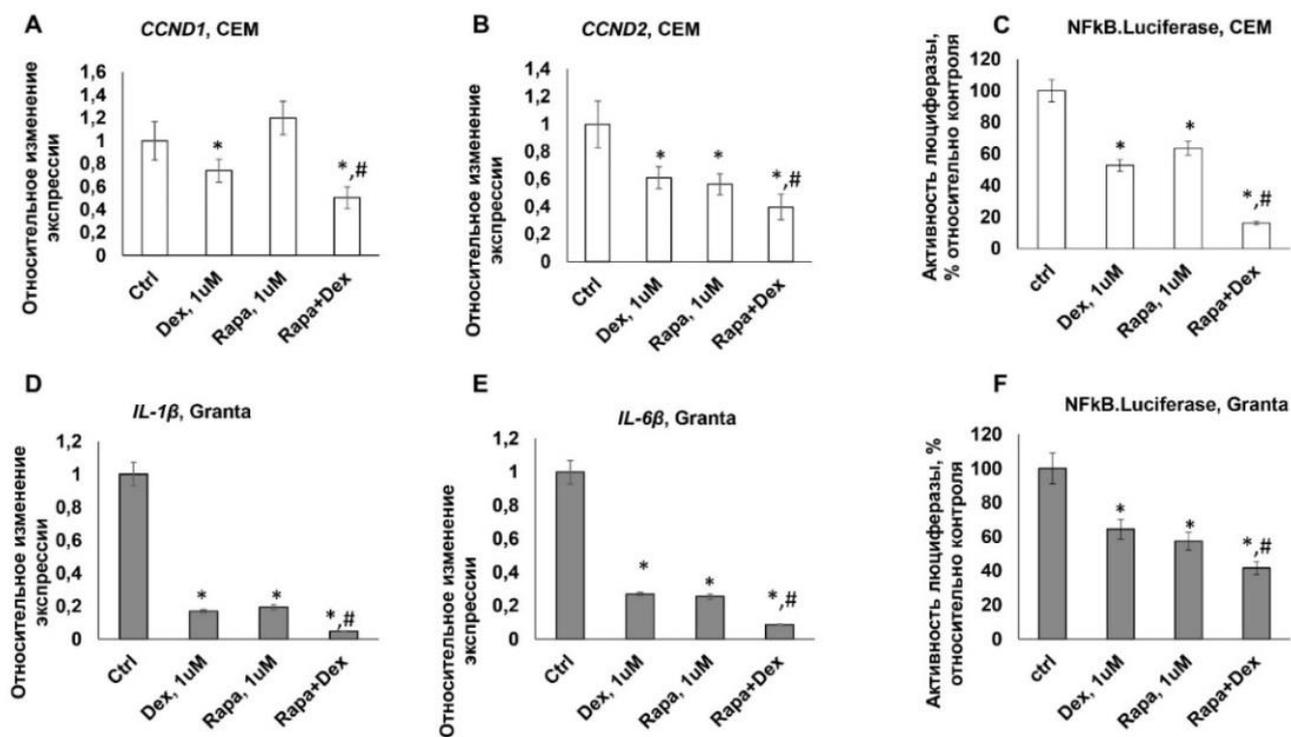


Рисунок 30 - Влияние Rapa на транс-репрессию GR в клетках CEM (A, B, C) и Granta (D, E, F). A, B, D, E. Клетки обрабатывали Rapa или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *CCND1*, *CCND2*, *IL-1β*, *IL-6β* определяли методом количественной ПЦР. Количество ПЦР-продуктов нормализовали по количеству продукта гена *RPL27*. C, F. После трансдукции вектора pGF1-NF-κB клетки обрабатывали Rapa или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 8 ч. Затем определяли активность люциферазы. Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные контрольным CMV-вектором. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$.

Исследование влияния рапамицина на эффекты глюкокортикоидов *in vivo*

Также необходимо было оценить взаимное влияние рапамицина и Dex на противоопухолевые эффекты друг друга на модели ксенографтов лимфомы *in vivo*. Препараты вводили в следующих дозировках: Dex (1 мг/кг), контроль (физиологический раствор), рапамицин (5 мг/кг) вводили внутривентриально, на 1, 3 и 5 дни недели. Рапамицин вводили за 6 ч до введения Dex. На 30 день лечения наблюдали кооперативный противоопухолевый эффект рапамицина и Dex: объем опухоли в группе животных, получавших дексаметазон, уменьшился в 2 раза, в группе животных, получавших рапамицин – в 4 раза, а в группе животных, получавших комбинацию рапамицина с Dex – в 5 раз (Рисунок 31). Далее мы оценили влияние рапамицина на индукцию REDD1 глюкокортикоидами *in vivo* в мышцах-гибридах F1 C57Bl x 129. Глюкокортикоид флуоцинолона ацетонид (FA) значительно повышал уровень экспрессии REDD1 в эпидермисе. Рапамицин подавлял индукцию REDD1 как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Хроническое применение GC вызывало значительную атрофию кожного

покрова. Рапамицин предотвращал FA-индуцированную атрофию эпидермиса (Рисунок 32).

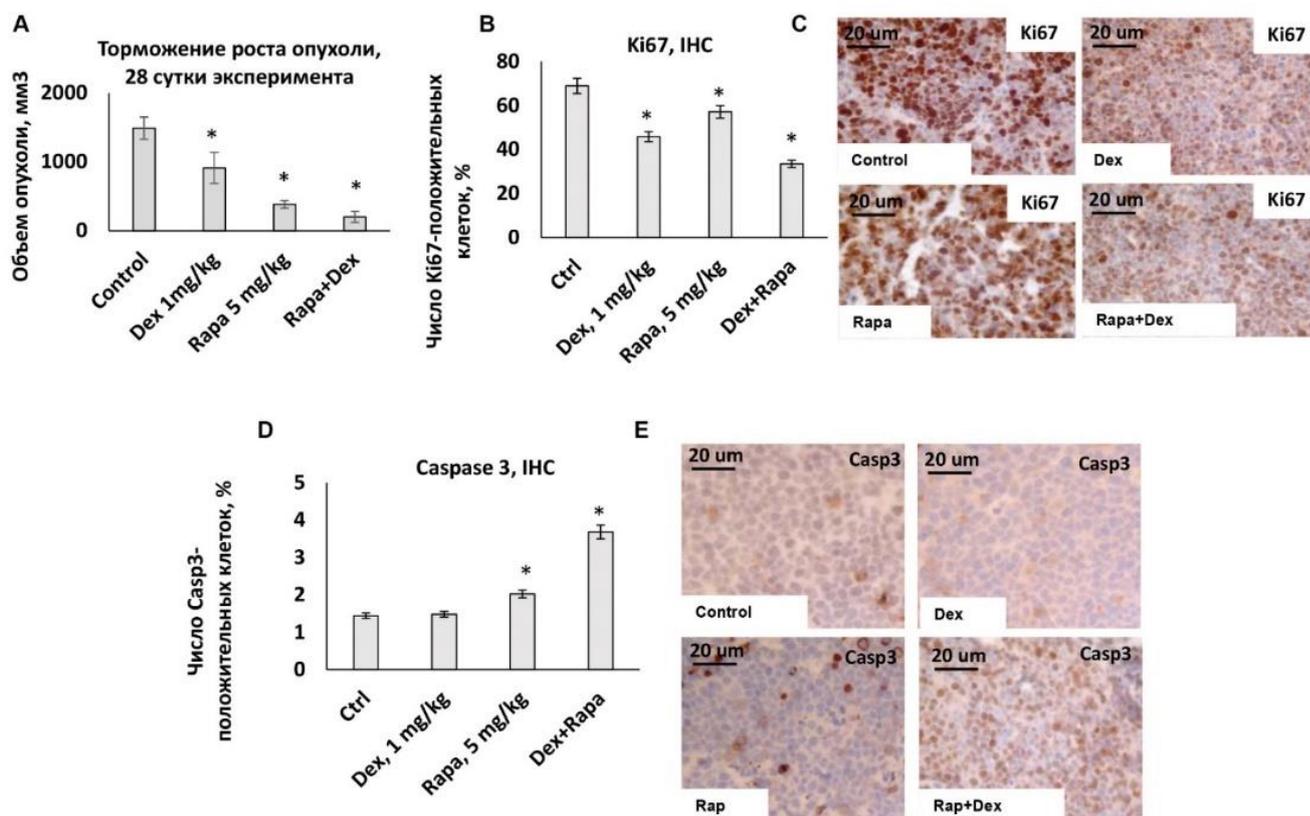


Рисунок 31 - Эффективность терапевтического действия рапамицина и Dex на объем ксенографтов лимфомы. А. Средний объем ксенографтов на 30 день эксперимента. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=10$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. В, С, D. Количественный анализ плотности клеток в опухоли (В), Ki67- (С) и Casp3- (D) положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином или специфическими антителами к TUNEL и Casp3. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. Е, F. Характеристическое иммуногистохимическое окрашивание Ki67 (E) и Casp3 (F).

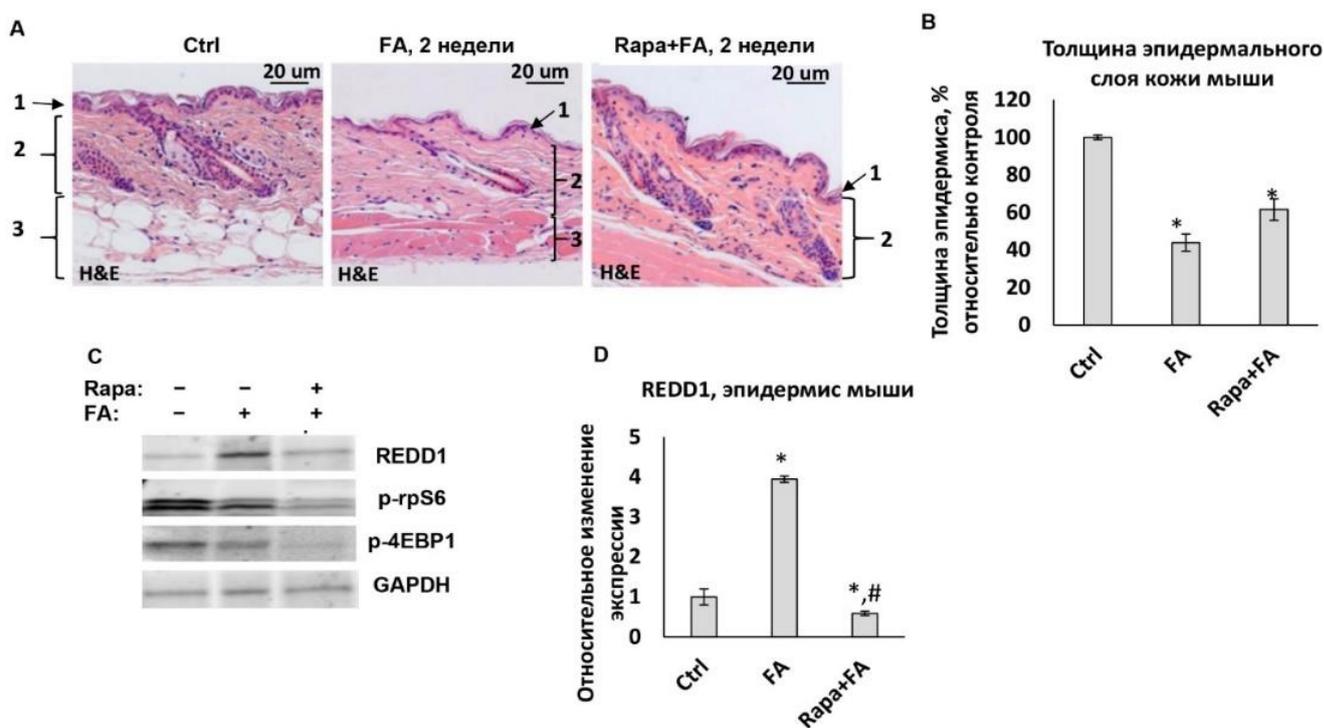


Рисунок 32 - Влияние Rapam на стероид-индуцированную атрофию кожного покрова. Кожный покров животных обрабатывали растворителем или FA (2 мкг) +/- Rapam (0.5 мг) в течение 2 недель каждые 72 ч. А. Окрашивание гематоксилином-эозином. В. Толщина кожного покрова, изменения по отношению к контролю. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. С, D. Экспрессию REDD1 анализировали с помощью Вестерн блоттинга и количественной ПЦР. Ген/белок Rpl27 использовали в качестве контроля загрузки. Тотальную мРНК и белковую фракцию выделяли из эпидермиса. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных FA, $p < 0.05$. Условные обозначения: 1 – эпидермис, 2 – дерма, 3 – подкожная жировая клетчатка.

Эффект рапамицина на действие GC был оценен с помощью двух моделей *in vivo*: модель острого воспаления, вызванного кротоновым маслом, на ушах, и хронический контактный дерматит, вызванный 12-*O*-тетрадеcanoилацетатом форболовой кислоты (TPA). Оба местнораздражающих агента вызвали воспаление, которое приводило к развитию отека и увеличению объема и массы. FA полностью предотвращал развитие острого воспаления (Рисунок 33). FA значительно степень развития воспаления, оцениваемой морфологически, а также с помощью количественного ПЦР-анализа экспрессии провоспалительных и пропролиферативных генов IL-1 β , IL-22, S100 кальций связывающие белки 8 и 9; MMP3, p65/RelA и p50. Предобработка рапамицином не повлияла на противовоспалительный эффект глюкокортикоидов в обеих моделях.

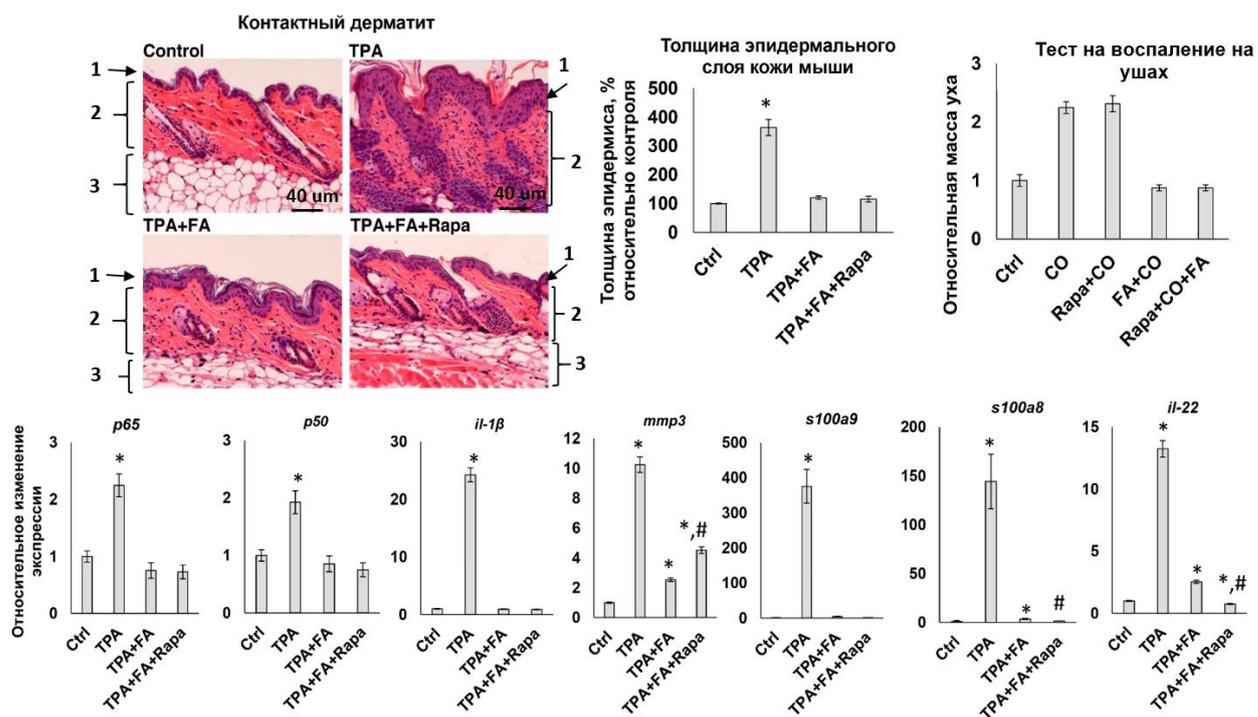


Рисунок 33 - Влияние Rapa на противовоспалительные свойства глюкокортикоидов. Животных обрабатывали Rapa (0.5 мг), через 6 ч обрабатывали TPA (4 мкг/мышь)+/-FA (1 мкг/мышь) каждые 72 ч в течение 2 недель. Образцы кожного покрова собирали через 24 ч после последней обработки. А. Окрашивание гематоксилином-эозином. В. Толщина кожного покрова. С. Тест на воспаление на ушах. Воспаление индуцировали с помощью СО после обработки растворителем, рапамицином или FA+/-рапамицин. Далее из каждого уха отбирали образцы кожи 4 мм диаметром. Масса образцов служила одним из критериев развития воспаления. D. Эффект Rapa на экспрессию провоспалительных генов. Результаты количественного ПЦР-анализа нормализовали на уровень экспрессии гена *Rpl27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных FA, $p < 0.05$. Условные обозначения: TPA - 12-0-тетра-деcanoилфорбол-13-ацетат, СО - кротоновое масло, 1 - эпидермис; 2 - дерма; 3 - подкожная жировая клетчатка.

Способность рапамицина модулировать функциональную активность GR была также подтверждена с помощью анализа профилей экспрессии генов на ДНК-микрочипах. Были идентифицированы 130 дифференциально регулируемых генов, на которые воздействовал FA: экспрессия 78 из них повышалась, а 52 - снижалась. При анализе данных наблюдали изменения в большом количестве GC-регулируемых биологических процессов: воспаление, синтез стероидных гормонов, клеточная адгезия, дифференцировка и апоптоз [Wu et al, 2004; Alvarez et al, 2006; Sarkar et al, 2017]. 90% генов, регулируемых FA, также изменяли свою экспрессию после комбинированной обработки клеток FA с рапамицином. Необходимо отметить, что после комбинированной обработки клеток степень изменения генов, регулируемых FA, менялась сильнее, чем при индивидуальной обработке, в случае генов, экспрессия которых подавляется. В то же время рапамицин снижал запуск транс-активации (Рисунок 34).

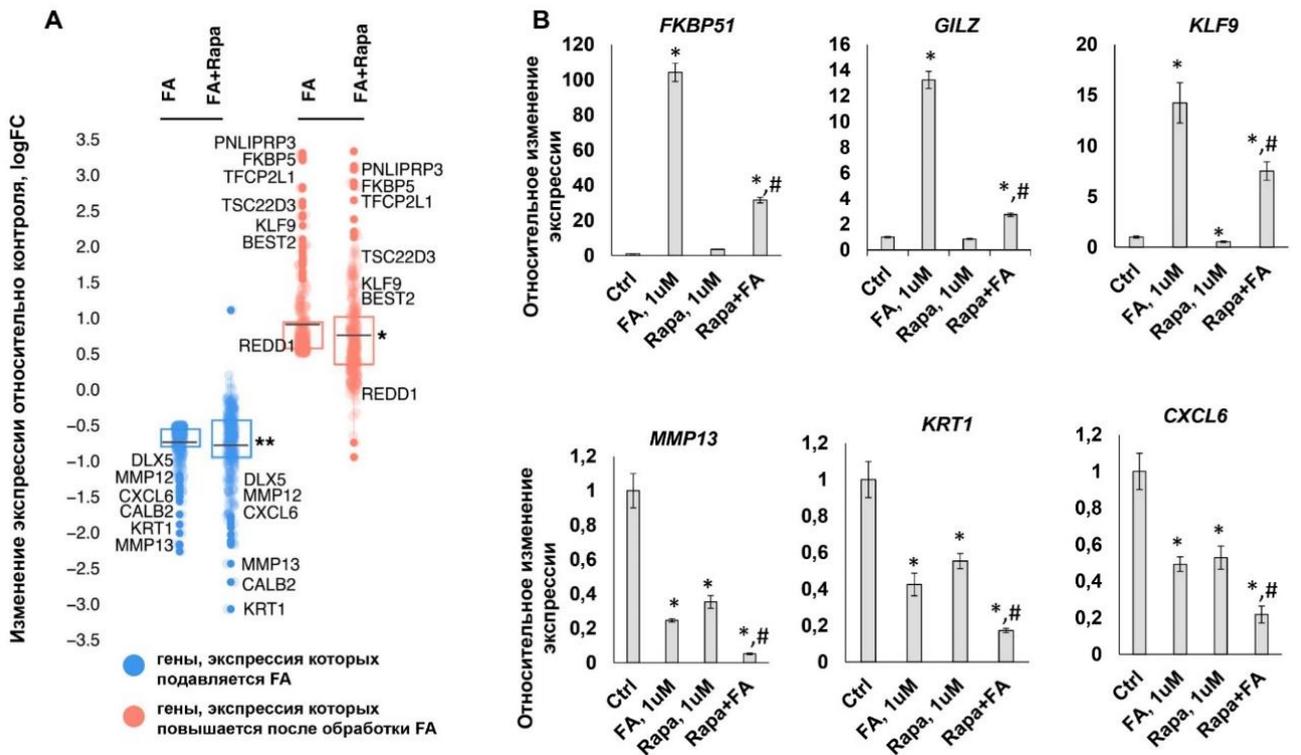


Рисунок 34 - Анализ изменений профилей экспрессии GR-зависимых генов при обработке immortalized кератиноцитов человека линии HaCaT Rapa и FA. А. Клетки HaCaT обрабатывали растворителем, Rapa, FA и их комбинацией. Затем из клеток выделяли тотальную мРНК и использовали для анализа на ДНК-микрочипах HT-12 Illumina. В. Валидация с помощью количественной ПЦР. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных FA, $p < 0.05$.

Также нами было показано атрофическое действие Dex на слой эпидермиса и дермы при системном применении (Рисунок 35). При добавлении в протокол обработки животных рапамицина наблюдали существенное снижение степени атрофии кожного покрова как на уровне дермы, так и на уровне эпидермиса. При изучении влияния рапамицина на GC-индуцированный остеопороз у мышей не было продемонстрировано значимой разницы между толщиной бедренных костей у контрольной группы животных и экспериментальной группы, получавшей дексаметазон. Однако при исследовании молекулярных маркеров остеопороза было выявлено существенное различие. В частности, повышенное соотношение RANKL/OPG, ассоциированное со способностью поддерживать формирование и активацию остеокластов, наблюдали в образцах от животных получавших дексаметазон. Рапамицин способствовал снижению этого показателя до контрольного уровня.

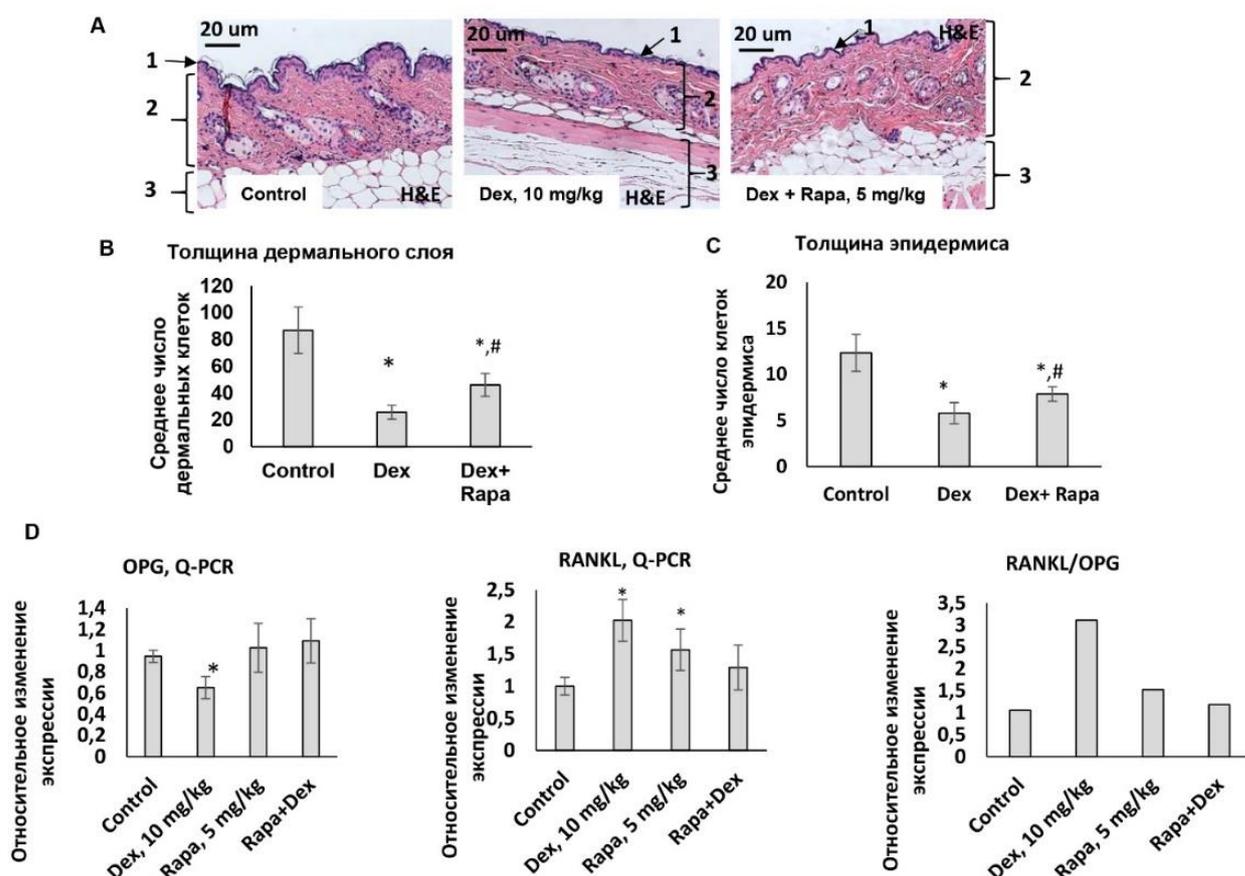


Рисунок 35 – Влияние рапамицина на GC-индуцированную атрофию кожного покрова и костной ткани А, В. Гистологическое исследование образцов кожного покрова (А) и количественный анализ толщины дермального (В) и эпидермального (С) слоев. D-F. ПЦР анализ экспрессии генов RANKL (D) и OPG (E), и их соотношение (F). Данные представлены как $M \pm SD$, * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$. Условные обозначения: 1 – эпидермис, 2 – дерма, 3 – подкожная жировая клетчатка

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были охарактеризованы биологические эффекты нового селективного агониста GR, CpдA, на клетки лейкозов и лимфом, продемонстрировано синергическое противоопухолевое действие CpдA в сочетании с протеасомным ингибитором бортезомибом *in vitro* и *in vivo*. Были разработаны стратегии получения новых SEGRA на основе синтеза химических производных CpдA, его энантиомеров или оптимизации его доставки за счет загрузки в наночастицы. Противоопухолевый эффект оптических изомеров CpдA *in vitro*, а также их влияние на механизмы транс-репрессии и транс-активации были сопоставимы с эффектами GC и исходным рацематом. При исследовании биологических эффектов 8 химических производных CpдA для наиболее активного соединения аналога синефрина CpдA-03 было показано, что он обладает аффинностью к GR, сопоставимой с аффинностью CpдA. Эффекты на жизнеспособность клеток лейкозов и лимфом, индукцию в них апоптоза, транс-

активации и транс-репрессии были схожи с эффектами GC и CpдA. Противоопухолевая активность CpдA-03 была показана *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей, что позволяет рекомендовать его к доклиническим исследованиям как препарат для терапии гемобластозов. Также был отработан подход к снижению степени развития побочных эффектов GC с помощью ингибирования «генов побочных эффектов». В качестве гена интереса был выбран ген *REDD1*, опосредующий атрофические эффекты GC. Поиск ингибиторов экспрессии *REDD1* был осуществлен биоинформатическими методами. Было идентифицировано 9 ингибиторов *REDD1*, среди которых наиболее активным оказался иммуносупрессор рапамицин. Было показано, что рапамицин подавляет базальную и GC-индуцированную экспрессию *REDD1* в клетках лейкоза и лимфомы. Более того, рапамицин модулирует функциональную активность GR: подавлял транслокацию GR в ядро, снижал степень его фосфорилирования, а также запуск транс-активации, в то время как транс-репрессия была не затронута или даже более выражена, чем при обработке клеток GC индивидуально. При обработке клеток рапамицином и GC наблюдали синергический противоопухолевый эффект *in vitro* и *in vivo*, а также было показано, что рапамицин препятствует истончению кожного покрова у мышей после длительной обработки GC. Таким образом, на примере рапамицина были получены данные, свидетельствующие о перспективности исследования эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на терапевтические и побочные эффекты GC. Результаты проведенного исследования позволяют сделать выводы, изложенные ниже.

ВЫВОДЫ

1. Селективный агонист глюкокортикоидного рецептора CpдA проявляет противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* на моделях лейкозов и лимфом.
2. Совместное применение CpдA и цитостатических препаратов, узкобороздочных лигандов и ингибиторов УПС, вызывает кооперативные противоопухолевые эффекты *in vitro* на клетках гемобластозов. При сочетании ингибитора протеасом бортезомиба с CpдA наблюдали синергический противоопухолевый эффект *in vitro* и *in vivo*.
3. R- и S-энантиомеры хирального соединения CpдA, являются селективными агонистами GR, действующими преимущественно по механизму активации транс-репрессии, причем их противоопухолевые эффекты *in vitro*, а также влияние на запуск транс-репрессии и транс-активации сопоставимы с действием рацемической смеси.
4. Среди производных CpдA соединение CpдA-03 обладает наиболее высокой аффинностью к глюкокортикоидному рецептору, сопоставимой с аффинностью исходного соединения, и проявляет наиболее выраженное противоопухолевое действие на моделях гемобластозов *in vitro* и *in vivo*.
5. Противоопухолевый и проапоптотический эффекты ряда новосинтезированных

химических производных СpdA преимущественно опосредованы активацией глюкокортикоидного рецептора по механизму транс-репрессии.

6. 9 зарегистрированных лекарственных препаратов, отобранных в качестве потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* с помощью биоинформатического скрининга, подавляют как базальную, так и GC-индуцированную экспрессию *REDD1*, из которых наиболее активным является рапамицин.

7. Рапамицин влияет на функциональную активность GR, снижая GC-индуцированное фосфорилирование GR по остатку Ser211 и GC-зависимую транслокацию GR в ядро, а также подавляя запуск GC-индуцированной транс-активации; при этом степень запуска транс-репрессии либо не изменяется, либо усиливается.

8. Рапамицин в комбинации с дексаметазоном обладает синергическим противоопухолевым эффектом *in vitro* и *in vivo*, а также снижает степень атрофии кожного покрова и костной ткани, развивающуюся при длительном применении GC *in vivo*.

9. Модулирование функций GR при развитии гемобластозов позволяет провести диссоциацию терапевтических и побочных эффектов на основе селективной активации механизма транс-репрессии путем использования препаратов класса SEGRA или на основе избирательного ингибирования транс-активации путем подавления экспрессии его эфферентных генов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тилова, Л.Р. Синтез нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора, и оценка его противоопухолевой активности на моделях гемобластозов *in vitro* / Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, А.К. Бочаров, К.А.Кузин, О.И. Борисова, Е.М. Жидкова, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Л.В. Яминова, В.З. Ширинян, Е.А. Лесовая. // Современные проблемы науки и образования. – 2016.- №6-. – С.110.

2. Тилова, Л.Р. Молекулярно-генетические нарушения, лежащие в основе гемобластозов, и соответствующие им изменения сигнальных систем клетки / Л.Р. Тилова, Е.М. Жидкова, А.В. Савинкова, О.И. Борисова, К.А. Кузин, О.А. Власова, А.С. Антипова, О.Ю. Баранова, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая. // Клиническая онкогематология — 2017. - №2– С. 235-247.

3. Савинкова, А.В. Противоопухолевый эффект оптических изомеров СpdA *in vitro* на модели острого лимфобластного лейкоза / А.В. Савинкова, Л.Р. Тилова, О.И. Борисова, Е.М. Жидкова, К.А. Кузин, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // Российский биотерапевтический журнал – 2017. -№1 — С. 61-69.

4. Жидкова, Е.М. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора СpdA на клеточные линии рака молочной железы различных

молекулярных подтипов / Е.М. Жидкова, К.А. Кузин, Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, О.И. Борисова, М.Д. Лаврова, В.П. Максимова, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // Сибирский онкологический журнал — 2017. - Т. 16 – №6– С. 41–46.

5. Lesovaya, E. Rapamycin modulates the glucocorticoid receptor functions, blocks atrophogene REDD1 expression, and protects skin against steroid-induced atrophy / E. Lesovaya, S. Agarwal, B. Readhead, E. Vinokour, G. Baida, P. Bhalla, K. Kirsanov, M. Yakubovskaya, L.C. Platanius, J.T. Dudley, I. Budunova // *J Invest Dermatol.* – 2018. – V. 138 – N 9– P. 1935-1944.

6. Савинкова, А.В. Варианты и перспективы перепрофилирования лекарственных препаратов для использования в терапии онкологических заболеваний / А.В. Савинкова, Е.М. Жидкова, Л.Р. Тилова, М.Д. Лаврова, Е.С. Лылова, К.А. Кузин, А.Ю. Портянникова, В.П. Максимова, А.В. Холодова, О.А. Власова, Т.И. Фетисов, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // Сибирский онкологический журнал – 2018. – Том 17 - №3 – С. 77–87.

7. Lesovaya, E. Discovery of Compound A – a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity / E. Lesovaya, A. Yemelyanov, A.C. Swart, G. Haegeman, P. Swart, I. Budunova // *Oncotarget* – 2015. – V. 6. – N 31. – P. 30730-44.

8. Lesovaya, E. Effect of Rapatar on experimentally induced benign prostate hyperplasia in rats / E. Lesovaya, K. Kirsanov, E. Antoshina, L. Trukhanova, T. Gorkova, E. Shipaeva, R. Salimov, E. Andrianova, G. Belitsky, M. Blagosklonny, M. Yakubovskaya, O. Chernova // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6 – N 12– P. 9718-27.

9. Baida, G. REDD1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids / G. Baida, P. Bhalla, K. Kirsanov, E. Lesovaya, M. Yakubovskaya, K. Yuen, S. Guo, O. Volpert, R.M. Lavker, B. Readhead, J. Dudley, I. Budunova // *EMBO Molecular Medicine.* – 2014. – V. 7. – N. 1.– P. 42-58.

10. Lesovaya, E. Combination of a selective activator of the glucocorticoid receptor Compound A with a proteasome inhibitor as a novel strategy for chemotherapy of hematologic malignancies / E. Lesovaya, A. Yemelyanov, K. Kirsanov, A. Popa, G. Belitsky, M. Yakubovskaya, L. Gordon, S. Rosen, I. Budunova // *Cell Cycle.* – 2013. – V. 12. – N 1. – P. 133–144.

11. Лесовая, Е.А. Новые лиганды глюкокортикоидного рецептора: модифицированные стероиды и нестероидные селективные агонисты / Е.А. Лесовая, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, И.В. Будунова, М.Г. Якубовская // *Технология живых систем.* – 2012.– №9 – С. 27-32.

12. Лесовая, Е.А. Противоопухолевое действие нестероидного лиганда глюкокортикоидного рецептора, CpdA , на клетки линий Т-клеточного лейкоза / Е.А. Лесовая, А.Ю. Емельянов, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская, И.В. Будунова // *Биохимия (Москва)* – 2011. – Том 76. – №11. – С. 1242-52.