

ОСИПОВА АЛЕНА ВАЛЕРЬЕВНА

**ИНГИБИРОВАНИЕ REDD1 КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ПОВЫШЕНИЮ
ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ
ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Лесовая Екатерина Андреевна

Официальные оппоненты:

Григорьева Эльвира Витальевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории гликобиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Жданов Дмитрий Дмитриевич, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией медицинской биотехнологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «19» октября 2023 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2023 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Роль глюкокортикоидов (ГК) в современной онкологии переоценить невозможно. Они активно используются в различных протоколах комбинированной химиотерапии злокачественных новообразований (ЗНО), в том числе, в терапии опухолей системы крови (СК) в качестве противоопухолевого средства и терапии опухолей целого ряда нозологических форм в качестве модулятора эффектов основного цитотоксического препарата для увеличения терапевтического интервала, снижения токсического действия, подавления воспаления и т.д. Однако при длительном применении ГК высок риск развития побочных эффектов, которые значительно снижают качество жизни пациентов, а также способны влиять на рост и развитие пациентов детского и юношеского возраста. Такими наиболее значимыми и требующими особого внимания побочными эффектами являются остеонекроз, остеопороз, развитие сахарного диабета, синдром Кушинга, недостаточность надпочечников. Также терапия ГК неприменима при ЗНО СК у пациентов с ранее зарегистрированным сахарным диабетом в анамнезе.

Противоопухолевый эффект ГК обусловлен их специфическим цитотоксическим действием на клетки иммунной системы. Известно, что биологические эффекты ГК реализуются посредством их взаимодействия с рецептором глюкокортикоидов (ГР) и его дальнейшей активации. Активированный ГР регулирует процессы жизнедеятельности клетки посредством двух механизмов: (1) транс-активации, заключающейся в индукции транскрипции ГК-зависимых генов, ассоциированных с развитием побочных эффектов ГК, и (2) транс-репрессии, представляющей собой белок-белковое взаимодействие ГР с рядом про-пролиферативных факторов транскрипции, таких как NF- κ B, AP-1 и др. и являющейся основным путем осуществления терапевтического действия ГК. При этом ингибирование процессов транс-активации позволяет подойти к решению проблемы развития побочных эффектов ГК при длительном применении без снижения их терапевтического действия, обусловленного запуском транс-репрессии.

Одним из наиболее важных ГР-зависимых генов является ген *REDD1* (*Regulated in Development and DNA Damage response 1*) также известный как *DDIT4* (*DNA damage inducible transcript 4*), повышение экспрессии которого обуславливает многие побочные эффекты ГК.

Биоинформатический анализ влияния различных лекарственных средств позволил выявить препараты, уже используемые в медицинской практике, которые в значительной степени подавляют экспрессию гена *REDD1*. Потенциальная возможность использования этих

соединений с целью устранения побочных эффектов ГК путем подавления экспрессии гена *REDD1* свидетельствует об актуальности данного исследования для современной онкологии.

Возможность влияния на степень активации терапевтических и побочных эффектов ГК была установлена при изучении эффектов различных синтетических лигандов ГР. Около 10 лет назад впервые была показана «диссоциация» процессов ГР-зависимой транс-активации и транс-репрессии при использовании частичных агонистов ГР, селективно индуцирующих только транс-репрессию. Исследования последних лет показали, что одним из генов, наиболее сильно вовлеченных в сигнальные пути, которые ответственны за развитие ГК-зависимых побочных эффектов по механизму транс-активации, является ген *REDD1*. В частности, повышение экспрессии гена *REDD1* после применения стероидных гормонов ассоциировано с развитием остеопороза и асептического остеонекроза, сахарного диабета, нарушений водно-солевого баланса, атрофии скелетной мускулатуры и кожи, а мыши с нокаутированным геном *REDD1* устойчивы к развитию ГК-индуцированных атрофических побочных эффектов. Также было продемонстрировано, что повышение экспрессии *REDD1* связано с резистентностью к терапии при различных ЗНО. Кроме того, повышение уровня белка REDD1 связано с устойчивостью к ионизирующему излучению.

REDD1 является стресс-индуцируемым геном, а его белковый продукт ингибирует пролиферативный комплекс mTORC1, являющийся компонентом сигнального пути PI3K/Akt/mTOR. Данный сигнальный путь вовлечен в процесс поддержания гомеостаза клетки путем контроля как анаболических, так и катаболических процессов. Предполагается, что увеличение экспрессии *REDD1* при воздействии ГК приводит к ингибированию Akt посредством его дефосфорилирования, либо к разрушению комплекса TSC2/14-3-3, что влечет за собой значительное снижение передачи сигнала по каскаду mTOR. Данное нарушение является причиной снижения клеточной пролиферации и синтеза белка, это и объясняет развитие вышеупомянутых побочных эффектов ГК, ассоциированных с увеличением экспрессии *REDD1*. Также важной особенностью молекулярных механизмов действия REDD1 является его способность ингибировать ГК-индуцируемый апоптоз в клетках гемобластозов. Во многом это связано с тем, что REDD1 запускает процесс аутофагии, которая может защищать клетки кроветворной ткани от ГК-индуцированного апоптоза.

Фармакологические ингибиторы экспрессии *REDD1* в научной литературе не описаны. В то же время, совершенствование технологий транскриптомного анализа позволило провести биоинформатические исследования и выявить ряд потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* среди уже используемых в медицинской практике лекарственных средств, что создает основу для их перепрофилирования в качестве ингибиторов побочных эффектов ГК.

Перепрофилирование зарегистрированных лекарственных препаратов является перспективным подходом в современной фармакологии, который позволяет значительно уменьшить перечень требуемых исследований при введении новых протоколов лечения различных патологий, что способствует более быстрому введению препарата в клиническую практику согласно новому назначению, а также является экономически выгодным.

Основываясь на вышеприведенных данных, можно сделать вывод о том, что изучение эффектов потенциальных ингибиторов экспрессии гена *REDD1* на функционирование ГР, позволяющее провести перепрофилирование уже известных лекарственных препаратов для использования в клинической онкологической практике, является хорошо обоснованным современным перспективным направлением исследований в области экспериментальной онкологии.

Цель исследования

Целью данного исследования являлось изучение молекулярных механизмов действия ингибиторов экспрессии гена *REDD1* на моделях злокачественных новообразований системы крови (ЗНО СК).

Задачи исследования

1. Изучить цитотоксические эффекты ингибиторов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR - вортманнина, AZD8055 и LY294002 на моделях лейкозов и лимфом и сравнить с цитотоксическим эффектом данных соединений на лимфоциты здоровых доноров.

2. Оценить эффекты ингибиторов экспрессии *REDD1* вортманнина, AZD8055 и LY294002 на функционирование ГР в клетках лимфом и лейкозов *in vivo*:

- оценить влияние потенциальных ингибиторов *REDD1* на базальный и ГК-индуцированный уровень экспрессии *REDD1*;

- исследовать эффекты ингибиторов *REDD1* на уровень экспрессии ГР и его функциональную активность по уровню фосфорилирования рецептора, его ядерной транслокации, степени запуска механизмов транс-репрессии и транс-активации;

- оценить влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на антипролиферативный и проапоптотический эффекты ГК на клетках лейкозов и лимфом.

3. Изучить эффекты ингибиторов экспрессии *REDD1* на противоопухолевое действие глюкокортикоидов на моделях лейкозов и лимфом *in vivo* на модели ксенографтов у бестимусных мышей.

4. Проанализировать влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на развитие побочных эффектов ГК *in vivo*, на моделях индуцированных у мышей длительным введением глюкокортикоидов (а) остеопороза и (б) атрофии кожного покрова.

Методы и методология исследования

В качестве методологической основы исследования были использованы комплексный и системный подходы к изучению функционирования ГР в нормальных и опухолевых клетках с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования. В представленной работе были использованы клетки линии Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) СЕМ и В-клеточной мантийноклеточной лимфомы (МКЛ) Granta-519 в качестве модельной системы *in vitro*. В качестве метода для определения антипролиферативного эффекта был выбран прямой подсчет клеток в камере Горяева. Активацию апоптоза оценивали методом проточной цитофлуориметрии после окраски йодистым пропидием. Определение концентраций нуклеиновых кислот и белков проводили с помощью абсорбционной спектроскопии. Уровень экспрессии и фосфорилирования ГР исследовали посредством вестерн блоттинга. Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. Для исследования уровня запуска механизмов транс-репрессии и транс-активации ингибиторов экспрессии *REDD1* был использован метод люциферазного репортерного анализа путем получения модифицированных сублиний клеток СЕМ и Granta-519, стабильно экспрессирующих люциферазу светлячка под контролем NF-κB- и GRE-зависимого промотора, соответственно; в качестве исследований для подтверждения полученных результатов проведены вестерн блоттинг и количественная ПЦР ГР- и NF-κB-зависимых генов. Для оценки противоопухолевой активности ингибиторов экспрессии *REDD1 in vivo* была использована модель лимфомы в виде подкожных ксенографтов бестимусных мышей (nu/nu) В-клеточной МКЛ Granta-519. Для исследования влияния ингибиторов экспрессии *REDD1* на атрофическое действие ГК были использована модель ГК-индуцированного остеопороза мышей Balb/c. Обработку данных проводили с использованием современных методов математической статистики.

Научная новизна

Научная новизна представленного исследования обусловлена тем, что впервые экспериментально изучены ГР-опосредованные эффекты ряда лекарственных препаратов, включая вортманнин (WM), AZD8055 и LY294002, которые были отобраны в качестве потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* на основании биоинформатического анализа данных базы изменений транскриптома опухолевых клеток при действии различных лекарственных препаратов базы данных Library of Integrated Cellular Signatures (LINCS, <https://lincsproject.org/LINCS/>). Также впервые было продемонстрировано, что все исследуемые соединения в разной степени предотвращали Dex-индуцированное фосфорилирование ГР по Ser²¹¹; 2 из 3 протестированных ингибиторов фармакологического класса PI3K/Akt/mTOR,

LY294002 и AZD8055, значительно снижали ядерный импорт ГР. Впервые было показано, что применение выбранных ингибиторов *REDD1* снижает как базальный, так и ГК-индуцированный уровень экспрессии генов, ассоциированных с запуском транс-активации, при этом сохраняя или увеличивая уровень экспрессии генов, ассоциированных с транс-репрессией, за счет которой осуществляется основной терапевтический эффект ГК. Также было установлено на моделях ЗНО СК *in vitro* и *in vivo*, что LY294002 в комбинации с Dex обладает синергическим противоопухолевым эффектом. Более того, используя две разные модели стероидной атрофии *in vivo* (атрофию кожи и остеопороз), впервые было показано, что LY294002 эффективен в качестве протектора при длительной терапии ГК.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе проведенного исследования были расширены представления о механизмах функционирования ГР. Так, было показано ингибирование как базальной, так и ГК-индуцированной экспрессии *REDD1* с помощью 3 отобранных ранее в ходе биоинформатического скрининга модуляторов сигнального пути PI3K/Akt/mTOR – WM, AZD8055 и LY294002. Наиболее эффективный ингибитор экспрессии гена *REDD1* LY294002 модулировал функциональную активность ГР, снижая степень транслокации ГР в ядро и его фосфорилирования, и ингибируя запуск транс-активации, не затрагивая эффективность механизма транс-репрессии ГР. В работе был продемонстрирован кооперативный противоопухолевый эффект всех исследуемых ингибиторов экспрессии *REDD1* и Dex на модели ОЛЛ и мантийноклеточной лимфомы МКЛ *in vitro*. Было показано, что наиболее активное соединение LY294002 и дексаметазон обладают синергическим противоопухолевым эффектом *in vivo* на перевиваемой модели МКЛ. Также продемонстрировано, что при комбинированном как системном, так и местном использовании *in vivo* LY294002 способен предотвращать развитие ГК-опосредованной атрофии кожного покрова и костной ткани. Полученные результаты свидетельствуют об их высокой теоретической значимости, а изученные эффекты ингибиторов *REDD1* на ГР-зависимые сигнальные пути имеют важное значение для дальнейших исследований механизма данного взаимодействия. Также полученные данные демонстрируют высокий трансляционный потенциал для разработки и оптимизации протоколов комбинированной терапии ЗНО СК с использованием ГК с повышенной терапевтической эффективностью и снижением риска развития побочных эффектов.

Личный вклад

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 3.1.6. Онкология, лучевая терапия («Биологические науки») и направлениям исследований п.2. «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)» и п.5. «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

Положения, выносимые на защиту

1. Ингибиторы сигнального пути PI3K/Akt/mTOR, выбранные в результате биоинформатического скрининга как потенциальные ингибиторы *REDD1*, подавляют как базальный, так и ГК-индуцированный уровень экспрессии *REDD1* в клетках ОЛЛ и МКЛ, культивируемых *in vitro*.

2. Ингибиторы экспрессии *REDD1* воздействуют на функциональную активность ГР, снижая уровень ГК-индуцированного фосфорилирования ГР по остатку Ser²¹¹ и его транслокацию в ядро, вызывая снижение ГК-индуцированной транс-активации, но не влияя или усиливая процесс транс-репрессии в культивируемых *in vitro* клетках ОЛЛ и МКЛ.

3. WM, AZD8055 и LY294002 обладают противоопухолевой активностью в отношении культивируемых *in vitro* клеток ОЛЛ и МКЛ.

4. LY294002 и Dex при комбинированном применении обладают синергическим противоопухолевым эффектом в отношении перевиваемой МКЛ *in vivo*.

5. LY294002 подавляет ГК-индуцированную атрофию кожного покрова и костной ткани.

Внедрение результатов исследования

Результаты, полученные в ходе проведения данного исследования позволят осуществить оптимизацию комбинированной химиотерапии злокачественных новообразований системы крови посредством включения в протокол ингибиторов экспрессии гена *REDD1*.

Методические подходы, разработанные в ходе выполнения работы, используются в научно-практической деятельности отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Результаты данного исследования были представлены и обсуждены на конференциях: I-V 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., 16-18 декабря 2019 г., Москва, Россия), научная школа «Сигнальные пути ядерных рецепторов» (27 августа – 1 сентября 2017 г., о. Спетцес, Греция), III, IV Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (22-24 июня 2016 г., 23–24 июня 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), конгресс Европейского общества онкологов EACR (30 июня – 3 июля 2018 г., Амстердам, Нидерланды), VI Съезд физиологов СНГ (1-6 октября 2019 г., Дагомыс, Россия), X, XI Съезд онкологов и радиологов СНГ и Евразии (23-25 апреля 2018 г., Сочи, Россия, 23-25 апреля 2020 г., Казань, Россия).

Апробация диссертации состоялась 20 декабря 2022 г. на совместной конференции лаборатории механизмов химического канцерогенеза отдела химического канцерогенеза, лаборатории генетики опухолевых клеток, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток, лаборатории механизмов канцерогенеза, отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза, лаборатории комбинированной терапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей.

Публикации

Результаты диссертационного исследования изложены в 9 научных публикациях, из которых 5 научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Диссертация написана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 235 источников, в том числе 211 зарубежных. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В качестве модельной системы *in vitro* были выбраны клеточные линии ОЛЛ СЕМ и МКЛ Granta-519, широко используемые для скрининга новых химиотерапевтических препаратов для терапии ЗНО СК. Клетки предварительно обрабатывали растворителем

(контроль), LY294002 (50 мкМ), WM (10 мкМ) и AZD8055 (1 мкМ) в течение 6 ч и обрабатывали либо растворителем, либо глюкокортикоидом Dex (1 мкМ) в течение 24 ч.

Эксперименты по сравнению цитотоксического эффекта на клетки ЗНО СК и моноциты человека проводили путем прямого подсчета живых клеток с помощью камеры Горяева. Исследования по оценке цитотоксического эффекта для определения концентраций исследуемых соединений, при которых количество жизнеспособных клеток составляет 80% (IC20) и 50% (IC50), проводили с помощью МТТ-теста. Измерения оптической плотности проводили с помощью мультилучного спектрофотометра MultiScan MCC 340 при длине волны 570 нм. Построение графиков производили с помощью коммерческого пакета программ Origin Pro 8.1 (OriginLab, США).

Относительное изменение экспрессии исследуемой мРНК вычисляли методом $\Delta\Delta C_t$, где $\Delta\Delta C_t$ определяли путем вычитания среднего ΔC_t контроля из среднего ΔC_t экспериментальных образцов. В качестве контроля использовали ген рибосомального белка L27 (Rpl27). Праймеры для амплификации кДНК были сконструированы с помощью баз данных Primer-Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) и Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Последовательности праймеров указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности праймеров для ПЦР анализа

Ген		Последовательность (прямой праймер 5`-3`/обратный праймер 5`-3`)
Мышь	Человек	
<i>Opg</i>		ACCCAGAAACTGGTCATCAGC CTGCAATACACACACTCATCACT
<i>Rankl</i>		CAGCATCGCTCTGTTCCCTGTA CTGCGTTTTTCATGGAGTCTCA
<i>Rpl27</i>		GCCCTGGTGGCTGGAATTGACC TTGCGCTTCAAAGCTGGGTCCC
	<i>REDD1</i>	TAGCCTTTGGGACCGCTTCTCGT CAGGTAAGCCGTGTCTTCCTCCG
	<i>RPL27</i>	ACCGCTACCCCGCAAAGTG CCCGTCGGGCCTTGCGTTTA

Тип совместного воздействия исследуемых соединений оценивали с помощью комбинационного индекса (combination index, CI) по формуле:

$$CI = D1/D501 + D2/D502 + (D1 * D2) / (D501 * D502),$$

где D1 и D2 – величины воздействий (концентрации препаратов), дающие 50% эффект в комбинации, а D501 и D502 – величины воздействий, требуемые для достижения такого же эффекта при отдельном применении данных воздействий.

Комбинационный индекс позволяет оценить тип совместного действия, т.е. синергизм (CI<1), аддитивность (CI=1) или антагонизм (CI>1).

Метод проточной цитофлуориметрии после окраски пропидием йодидом (PI) использовали для исследования клеточного цикла, а именно для оценки количества клеток, находящихся в sub-G₀/G₁ фазе.

Для проведения вестерн блоттинга тотальные клеточные лизаты выделяли, используя RIPA буфер; цитоплазматическую и ядерную фракции белков выделяли, используя буфер для выделения цитоплазматической и ядерной фракций соответственно. Концентрацию белка определяли с помощью реагента Bio-Rad Protein Assay. Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для иммуноблоттинга использовали антитела к GR- α , расщепленной PARP, p-rpS6, p-4EBP1, p-r70S6K, p-GR (Ser211), REDD1. В качестве контроля использовали антитела к GAPDH. Визуализацию сигнала проводили с помощью прибора для гель-документирования ImageQuant LAS4000. Количественный анализ изображений проводили с помощью открыто распространяемого пакета программ ImageJ.

Для получения трансформированных клеток, экспрессирующих ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора, содержащего сайты связывания NF- κ B и GR, использовали лентивирусный вектор («System Bioscience», США). Вирусные стоки высокого титра получали путем ко-трансфекции клеток линии 293T лентивирусными векторами. Трансформированные клетки МКЛ и ОЛЛ культивировали на селективной среде, содержащей антибиотик пурамицин. Активность люциферазы определяли, смешивая 10 мкл тотального клеточного лизата с 60 мкл буфера, содержащего субстрат для люциферазы, и измеряя люминесценцию на люминометре «Turner Biosystems 20/20» (США).

Для оценки противоопухолевой активности бестимусных мышей в возрасте 7-ми недель (самки, nu/nu, «Taconic», США) делили на группы по 10 голов в каждой. Клетки линии Granta-519 вводили подкожно в правый бок по 10 млн в 200 мкл формообразующей матрицы Matrigel (BD Biosciences, США), использованной в качестве жидкой фазы (находящейся в жидком состоянии при температуре от 0°C до 4°C, а при повышении температуры полимеризуется и образует гель). Также данная матрица выполняет функцию питательной среды, поскольку в ней содержатся необходимые для роста клеток аминокислоты, соли и другие компоненты. Введение препаратов начинали по достижению опухолевыми узелками размера 50 мм³ и проводили до достижения опухолью размера в 1500 мм³. Dex (1 мг/кг) или растворитель (30% PEG3350, 4% ДМСО, 5% Tween 20 в PBS) вводили внутрибрюшинно каждые 48 ч, LY294002 (20 мг/кг) или Rara (5 мг/кг), выбранного в качестве препарата сравнения, вводили за 6 ч до введения Dex. Размер опухоли измеряли дважды в неделю с помощью цифровых штангенциркулей. Критерием оценки противоопухолевого эффекта являлось торможение роста опухолевого узла, определяемое по изменению объема опухоли. Через 27 дней после начала эксперимента

опухоли были извлечены, часть опухолевого материала была использована для гистологического и иммуногистохимического анализа. Также из полученного опухолевого материала была выделена тотальная РНК для проведения количественной ПЦР.

Для оценки атрофических и воспалительных процессов самок мышей Balb/c в возрасте 12-ти недель (филиал "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) делили на группы по 10 голов в каждой. Моделировали глюкокортикоид-индуцированный остеопороз. Животным вводили внутривенно каждые 48 ч LY294002 (20 мг/кг), Рапа (5 мг/кг), выбранного в качестве препарата сравнения, или растворитель (30% PEG3350, 4% ДМСО, 5% Tween 20 в PBS), через 6 ч вводили Dex в дозе 10 мг/кг в течение 5 недель. После окончания эксперимента через 24 ч после последнего введения собирали образцы кожного покрова и больших берцовых костей. Количественный анализ проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином. Было проанализировано как минимум 30 независимых микрофотографий на каждую группу. Далее проводили гистологический и иммуногистохимический анализ. Визуализацию и микроскопический анализ изображений проводили с использованием микроскопа Zeiss Axioplan2. Количественный анализ толщины эпидермиса, количество Casp3- и Ki67-положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином. Было проанализировано как минимум 30 независимых микрофотографий на каждую группу.

Результаты экспериментов указывали в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку данных проводили с использованием коммерческого пакета программ GrafPad Prism v.9.1.1 (GraphPad Software, США). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова и критерия Шапиро-Уилка. Также были использованы t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Анализ данных биоинформатического скрининга и подбор оптимальных рабочих концентраций потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1*

На первом этапе исследования совместно с И.В. Будуновой (Северо-Западный университет, Чикаго, США) и Дж.Т. Дадли (медицинская школа Икан, госпиталь Маунт Синай, Нью Йорк, США) был проведен биоинформатический поиск потенциальных ингибиторов *REDD1* с помощью базы данных Library of Integrated Cellular Signatures (LINCS, <https://lincsproject.org/LINCS/>), которая содержит данные по эффектам более чем 20 000 препаратов в культивируемых *in vitro* клетках 50 линий опухолей человека. Сравнительный анализ эффектов соединений с учетом количества экспериментов, в которых экспрессия *REDD1*

была значительно снижена, показал, что *REDD1* входит в 100 наиболее подавляемых генов при действии ингибиторов PI3K/Akt/mTOR. В представленном исследовании с целью анализа модулирующего влияния ингибиторов экспрессии *REDD1* на эффекты ГК были выбраны следующие препараты (таблица 1): вортманнин (WM), LY294002 и AZD8055 – соединения класса ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), ключевой составляющей сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, контролирующего рост и жизнеспособность клеток.

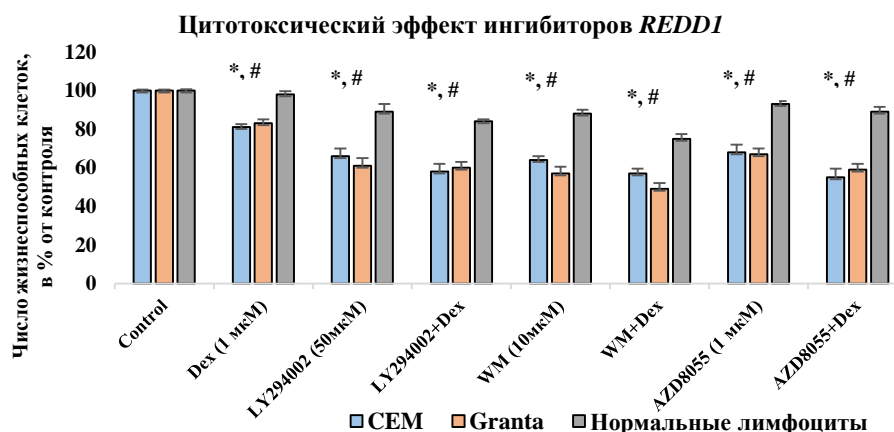
Для подбора оптимальных рабочих концентраций выбранных соединений был проведен МТТ-тест в диапазонах: LY294002 1-500 мкМ, WM 0,1-25 мкМ и AZD8055 0,05-5 мкМ, в следующем режиме обработки клеток: предварительная обработка ингибиторами экспрессии *REDD1* в течение 6 ч с последующей обработкой Dex в течение 24 ч, выбранном в соответствии с ранее проведенными исследованиями. Моноциты, полученные от здоровых доноров, были использованы для осуществления контроля действия ингибиторов на нормальные клетки.

Выбранные соединения при концентрациях, не превышающих IC20 (Таблица 2), (50 мкМ для LY294002, 1 мкМ для AZD8055 и 10 мкМ для WM) снижали выживаемость клеток линии СЕМ и Granta-519 как при индивидуальном применении, так и при комбинации с Dex (1 мкМ, IC20), концентрация которого также была выбрана в соответствии с ранее проведенными исследованиями. При этом наблюдалась тенденция к кооперативному действию ингибиторов и Dex.

Таблица 2 – Количество жизнеспособных клеток при обработке вортманнином (WM), LY294002, AZD8055; значение после инкубации в течение 24 ч, %

Соединение/концентрация	СЕМ, % жизнеспособных клеток	Granta, % жизнеспособных клеток
Вортманнин (WM), 10 мкМ	82,4 ± 6,0%	80,95 ± 3,9%
LY294002, 50 мкМ	86,41 ± 5,2%	83,02 ± 3,6%
AZD8055, 1 мкМ	81,79 ± 4,3%	82,09 ± 5,6%

В то же время нормальные лимфоциты, полученные от здоровых доноров, были значительно более устойчивы к цитотоксическим эффектам комбинированной обработки. В частности, при комбинированной обработке LY294002+Dex число жизнеспособных клеток линии СЕМ составило 58,1%, клеток линии Granta-519 – 60,0%, нормальных лимфоцитов – 84% (Рисунок 1).



Клетки предварительно обрабатывали растворителем (контроль), LY294002 (50 мкМ), WM (10 мкМ) и AZD8055 (1 мкМ) в течение 6 ч и обрабатывали либо растворителем, либо глюкокортикоидом Dex (1 мкМ) в течение 24 ч. Число жизнеспособных клеток оценивали с помощью камеры Горяева. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от клеток линии CEM, # - статистически значимое отличие от клеток линии Granta-519, $p < 0,05$

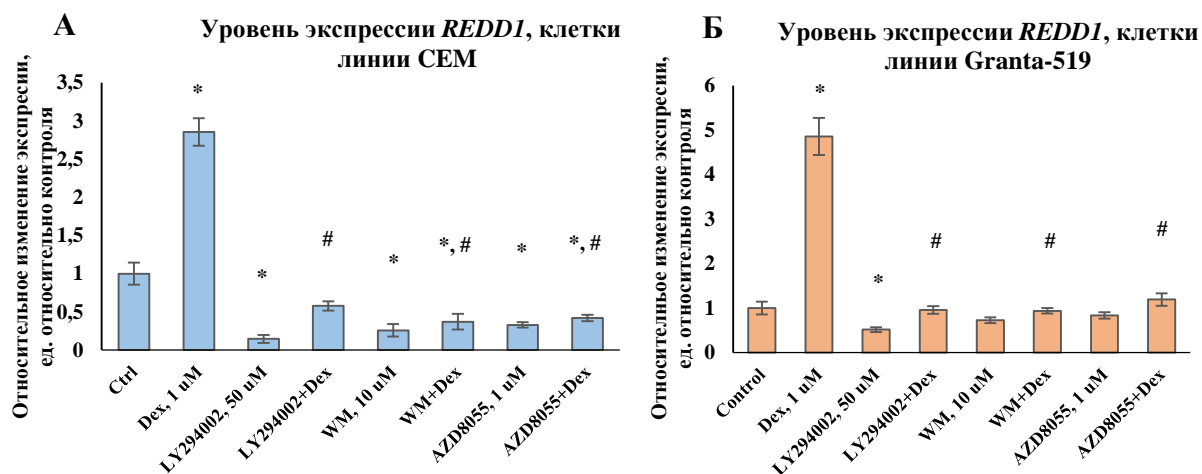
Рисунок 1 – Сравнение цитотоксических эффектов потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* на клетки линии CEM, Granta-519 и моноциты здоровых доноров

Оценка эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на молекулярные механизмы функционирования ГР в клетках лейкозов и лимфом

Оценка влияния потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* на уровень его экспрессии

На рисунке 2 А, Б представлены данные, полученные при культивировании клеток CEM и Granta-519 в присутствии растворителя, Dex, потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* (AZD8055, WM, LY294002), либо комбинации Dex и одного из ингибиторов.

При обработке Dex уровень экспрессии *REDD1* в клетках CEM и Granta-519 возрастал в 2,9 и 4,9 раза по отношению к контролю соответственно. LY294002 при индивидуальной обработке снижал экспрессию *REDD1* в 6,7 раза в клетках линии CEM и 1,9 раза в клетках линии Granta-519, WM – в 3,4 и 1,4 раза, AZD8055 – в 3,0 и 1,2 раза по отношению к контролю соответственно. При комбинированной обработке с Dex LY294002 подавлял ГК-индуцированную экспрессию *REDD1* в клетках линии CEM в 4,8 раза и в 5,4 раза в клетках Granta-519, WM – в 9,7 и 5,4 раза, AZD8055 – в 7,3 и 4,1 раза соответственно по отношению к уровню экспрессии *REDD1* при индивидуальном применении Dex. Таким образом, было показано, что *REDD1* действительно является ГК-зависимым геном. В клеточных линиях CEM и Granta-519 выбранные препараты ингибируют как базальный, так и ГК-индуцированный уровень экспрессии *REDD1* на уровне мРНК.



Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1 мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *REDD1* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Изменение количества ПЦР-продуктов оценивали 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 2 – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на базальную и ГК-индуцированную экспрессию *REDD1* в клетках CEM (А) и Granta-519 (Б)

Оценка эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на сигнальный путь *PI3K/Akt/mTOR*

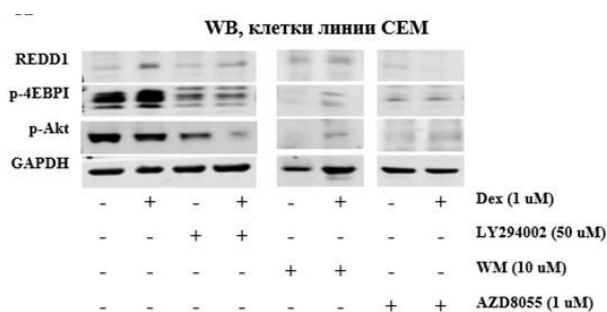
Для определения уровня экспрессии *REDD1* на уровне белка и оценки влияния ингибиторов на функциональную активность ГР был проведен вестерн блоттинг тотальных клеточных лизатов клеток линий CEM и Granta-519.

Было показано, что выбранные режим обработки и концентрации ингибиторов экспрессии *REDD1* ингибировали сигнальный путь *PI3K/Akt/mTOR*, о чем судили по снижению фосфорилирования субстрата *mTOR* 4E-ВР1 (эукариотический фактор инициации 4E, связывающий белок 1) по Ser⁸³ и киназы Akt по Ser⁴⁷³, основном сайте связывания, регулирующем его активность. В клетках линии CEM и Granta-519 фосфорилирование 4E-ВР1 при комбинированном действии LY294002+Dex снижалось в 1,8 и 1,5 раза по отношению к индивидуальному действию Dex, при применении WM+Dex – в 5,6 и 9,2 раза, AZD8055+Dex – в 3,5 и 4,7 раза соответственно. В клетках линии Granta-519 фосфорилирование Akt по Ser⁴⁷³ при комбинированном действии LY294002+Dex было подавлено в 2,3 раза, WM+Dex – в 14,3 раза, AZD8055+Dex – в 3,4 раза по отношению к индивидуальному действию Dex (Рисунок 3).

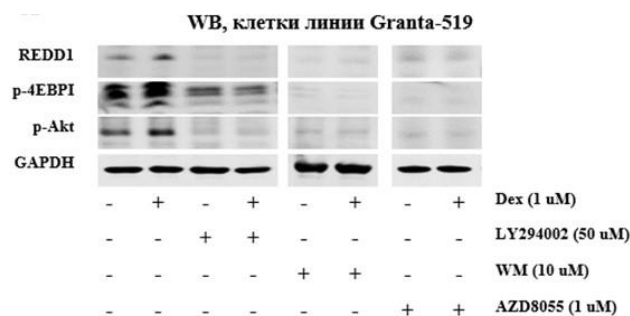
Ингибиторы сигнального пути *PI3K/Akt/mTOR* также значительно снижали как базальную, так и ГК-индуцированную экспрессию *REDD1* на уровне белка. Наиболее выраженный эффект наблюдался в клетках линии Granta-519: при индивидуальном применении

LY294002 снижал уровень экспрессии белка REDD1 в 6,25 раза, WM – в 5,7 раза и AZD8055 – в 2,8 раза по отношению к контролю; при комбинированной обработке с LY294002+Dex – в 10,7 раза, WM+Dex – в 9,1 раза, AZD8055+Dex – в 5,6 раза по отношению к индивидуальному действию Dex.

А



Б



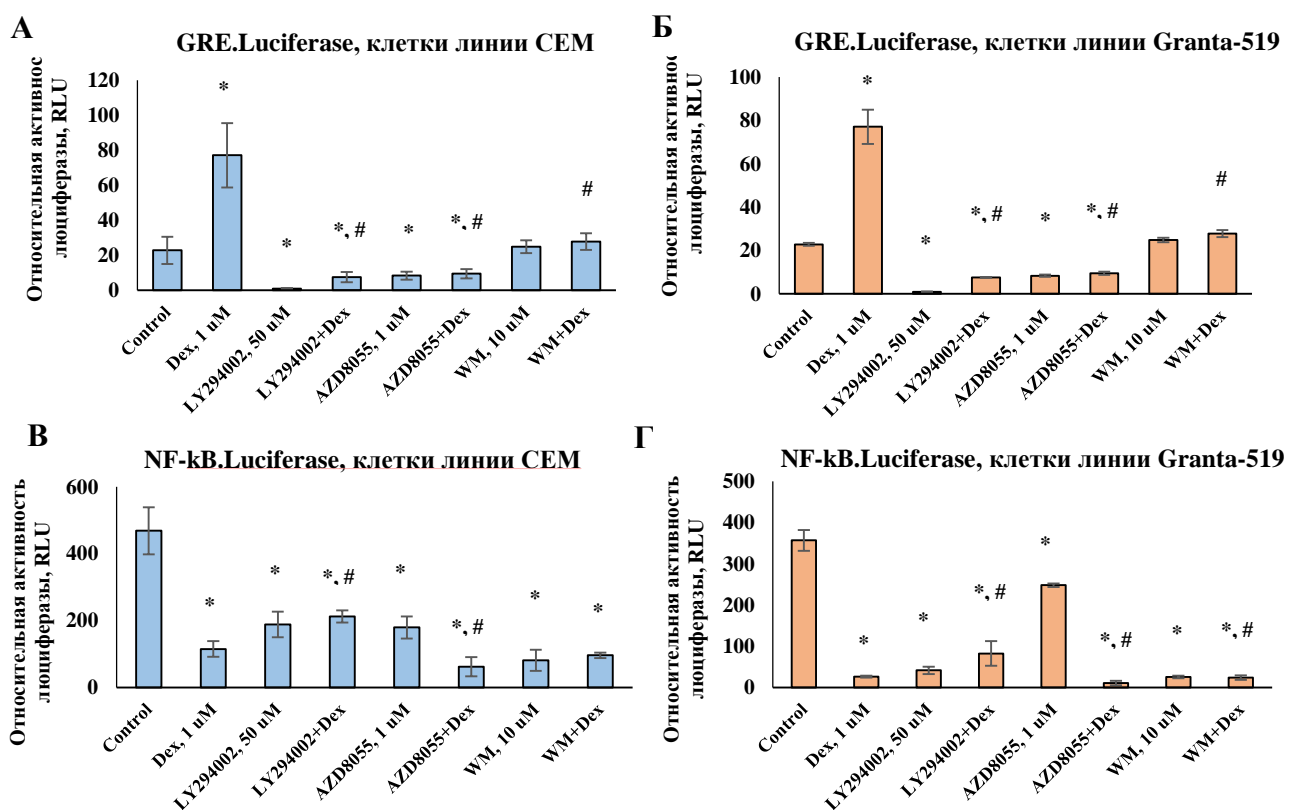
Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1 мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. (А) Экспрессию REDD1, p4EBP1, p-Akt анализировали методом вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали антитела к GAPDH

Рисунок 3 – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на функциональную активность ГР в клетках СЕМ (А) и Granta-519 (Б)

Влияние ингибиторов экспрессии REDD1 на запуск механизмов транс-репрессии и транс-активации

Было проведено исследование эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на транс-активацию ГР, с помощью трансдукции лентивирусных конструкций GRE.Luc в клетках линий СЕМ и Granta-519 (Рисунок 4). Все выбранные соединения (WM, AZD8055 и LY294002) ингибировали Dex-индуцированную активность люциферазы ГРЭ (в 2,8-10,1 раза). Следует отметить, что как при индивидуальном применении, так и в комбинации с Dex, эффект подавления активности люциферазы был особенно выражен при обработке соединением LY294002.

Исследование эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на механизм транс-репрессии было проведено с помощью трансдукции лентивирусных конструкций NF-κB.Luc в клетках линий СЕМ и Granta-519. Активность NF-κB.Luc была сильно снижена при обработке Dex и ингибиторами экспрессии *REDD1* при индивидуальном применении (в клетках линии СЕМ в 2,6-5,8 раза, в клетках линии Granta-519 – в 1,4-13,9 раза), а в случае комбинации Dex с AZD8055 или WM наблюдали аддитивный ингибирующий эффект в обеих клеточных линиях.

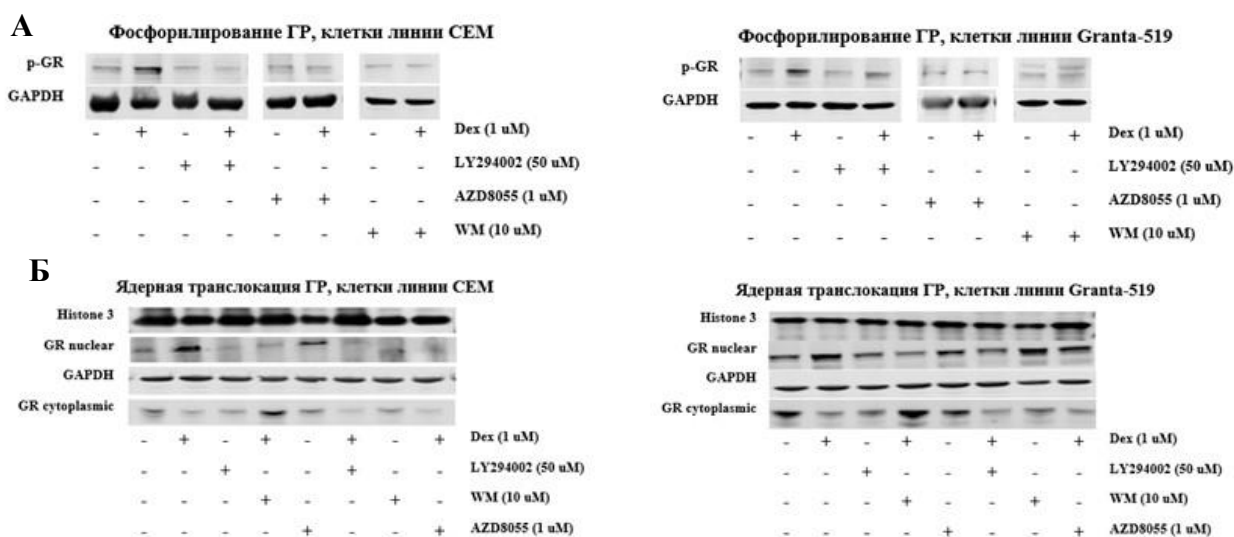


После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE (А, Б) и pGF1-NF-kB (В, Г) клетки CEM и Granta-519 культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов REDD1 (AZD8055 (1мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Для нормализации 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, $p < 0,05$

Рисунок 4 - Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на активность ГР (А, Б) и NF-kB (В, Г) в клетках CEM и Granta-519

Оценка эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на функциональную активность ГР

Чтобы изучить молекулярные механизмы, лежащие в основе функциональных изменений ГР, обусловленных применением ингибиторов экспрессии *REDD1*, было исследовано, как эти соединения влияют на основные этапы активации ГР: фосфорилирование ГР по Ser²¹¹ и его ядерную транслокацию, которые имеют решающее значение для индукции механизма транс-активации (Рисунок 5). Все исследуемые соединения в разной степени предотвращали Dex-индуцированное фосфорилирование ГР в обеих клеточных линиях (CEM – в 4,1-7,3 раза, Granta – в 1,7-2,8 раза по отношению к индивидуальному применению Dex). Более того, из 3-х протестированных ингибиторов PI3K два - LY294002 и AZD8055, значительно предотвращали ядерный импорт ГР (CEM – в 4,3 и 5,6 раза, Granta – в 1,8 и 2,0 раза соответственно по отношению к индивидуальному применению Dex).



Уровень экспрессии ГР (GR) и ф-ГР (p-GR) в клетках СЕМ после обработки ингибиторами *REDD1* и Dex анализировали с помощью вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали Вестерн блоттинг с антителами к GAPDH

Рисунок 5 – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на уровень (А) фосфорилирования и (Б) степень транслокации ГР в клетках СЕМ и Granta-519

Определение совместного антипролиферативного и проапоптотического эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* и глюкокортикоидов

Чтобы определить, как эффекты ингибиторов PI3K/Akt/mTOR взаимодействуют с эффектами Dex на выбранных клеточных линиях, была оценена эффективность комбинированной обработки *in vitro*, используя такие показатели, как % жизнеспособных клеток (прямой подсчет в камере Горяева), индукция клеточной гибели (гиподиплоидный пик sub-G0/G1) и индукция апоптоза (расщепление PARP).

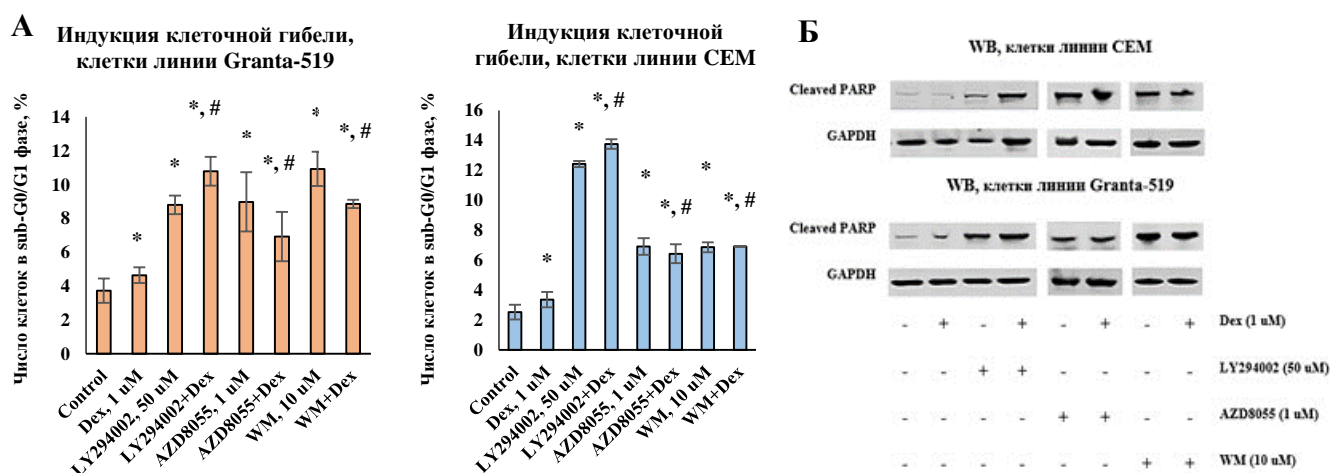
Все выбранные соединения демонстрировали антипролиферативное действие как на клетках линии СЕМ, так и на клетках линии Granta-519. Для оценки типа взаимодействия между Dex и ингибиторами PI3K/Akt/mTOR при их совместном воздействии на клетки использовали значения IC50 для данных соединений и Dex после 48 часов обработки (Таблица 4).

Таблица 4 – Цитотоксический эффект вортманнина (WM), LY294002, AZD8055; значение IC50 после инкубации 48 ч, мкМ

Соединение	IC50, СЕМ, мкМ	IC50, Granta-519, мкМ
Вортманнин (WM)	9,145	11,944
LY294002	61,969	77,588
AZD8055	1,358	2,015

При расчете CI для определения типа взаимодействия (синергизма, аддитивности или антагонизма) был выявлен синергизм в антипролиферативных эффектах Dex и LY294002 в обеих типах клеток (CEM - CI=0,81, Granta-519 - CI=0,86). Эффекты комбинации обработки Dex и AZD8055/WM на выживаемость лимфоидных клеток были в основном аддитивными (Granta-519 – CI(WM)=1,03, CI(AZD)=1,08; CEM – CI(WM)=0,95), однако в случае применения комбинации Dex и AZD8055 на клеточной линии CEM был выявлен синергический эффект (CI=0,90). Ранее синергизм был также определен для Dex и эталонного ингибитора экспрессии *REDD1* Rapa.

Затем было исследовано влияние Dex в сочетании с LY294002, AZD8055, WM на индукцию клеточной гибели (Рисунок 6).



(А) Число клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием окраски пропидий йодидом по гиподиплоидному пику sub-G0/G1. Клетки CEM и Granta-519 культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1μM), WM (10 μM), LY294002 (50 μM) и Rapa (1μM), используемого в качестве положительного контроля), затем добавляли растворитель или Dex (1μM) и инкубировали в течение 24 ч. Данные представлены как M±SD (n=3), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, p<0,05. (Б) Проапоптотический эффект определяли с помощью Вестерн блоттинга по расщеплению PARP

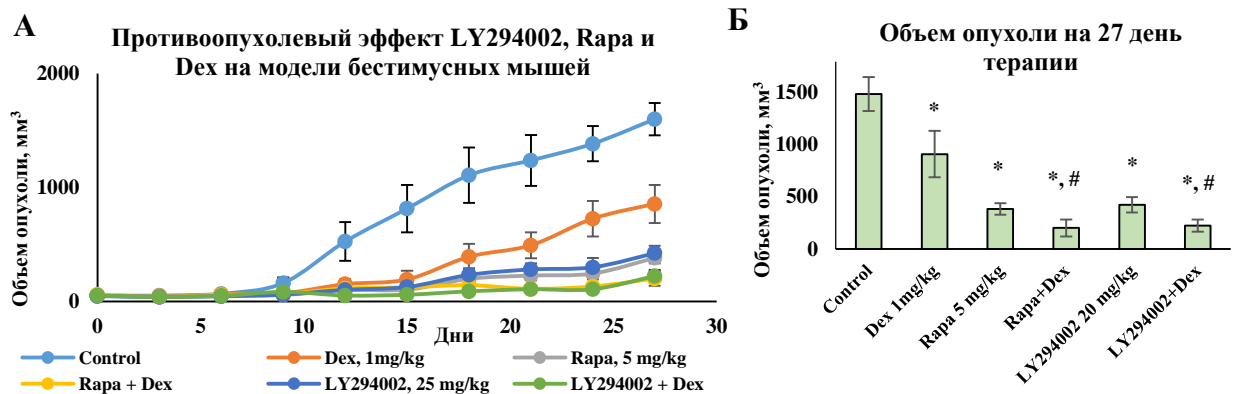
Рисунок 6 – Индукция клеточной гибели (А) и проапоптотический эффект (Б) ингибиторов экспрессии *REDD1*

При индивидуальной обработке Dex и все выбранные для исследования ингибиторы *REDD1*, а также Rapa индуцировали клеточную гибель в обеих клеточных линиях, что оценивали по увеличению гиподиплоидного пика sub-G0/G1. Особенно эффективно действовала комбинация LY294002+Dex, увеличивая количество клеток в sub-G0/G1 фазе на 10,0% (CEM) и 6,2% (Granta-519) по сравнению с индивидуальным применением Dex. Данный эффект ингибиторов на клетки CEM и Granta-519 коррелировал со степенью подавления роста и жизнеспособности данных клеток при инкубации с ингибиторами экспрессии *REDD1*.

Проапоптотический эффект был подтвержден при анализе расщепления PARP методом вестерн блоттинга, в частности, были показаны кооперативные проапоптотические эффекты между LY294002 и Dex. Комбинированное применение данных препаратов увеличивало количество расщепленного PARP в 2,2 раза в клетках линии СЕМ и в 3,3 раза в клетках линии Granta-519. Вышеуказанные эффекты также коррелировали с эффектами, полученными для соединения Rapa, используемого в качестве положительного контроля.

Оценка противоопухолевого эффекта ГК в комбинации с ингибиторами экспрессии *REDD1*

Для оценки степени взаимодействия противоопухолевых эффектов Dex и ингибиторов экспрессии *REDD1* на модели *in vivo* самкам бестимусных мышей nu/nu подкожно перевивали клетки линии мантийноклеточной лимфомы Granta-519 как описано в материалах и методах. В качестве препарата для проведения терапии был выбран LY294002, который показал синергический антилимфомный эффект с Dex *in vitro*. Ранее Rapa был охарактеризован как ингибитор экспрессии *REDD1* и тканевый протектор против атрофических эффектов местных ГК на коже. Препараты вводили внутривентриально в следующих дозировках: Dex (1 мг/кг), LY294002 (20 мг/кг), Rapa (5 мг/кг). Dex вводили каждые 48 ч. Rapa и LY294002 вводили за 6 ч до введения Dex (Рисунок 7).



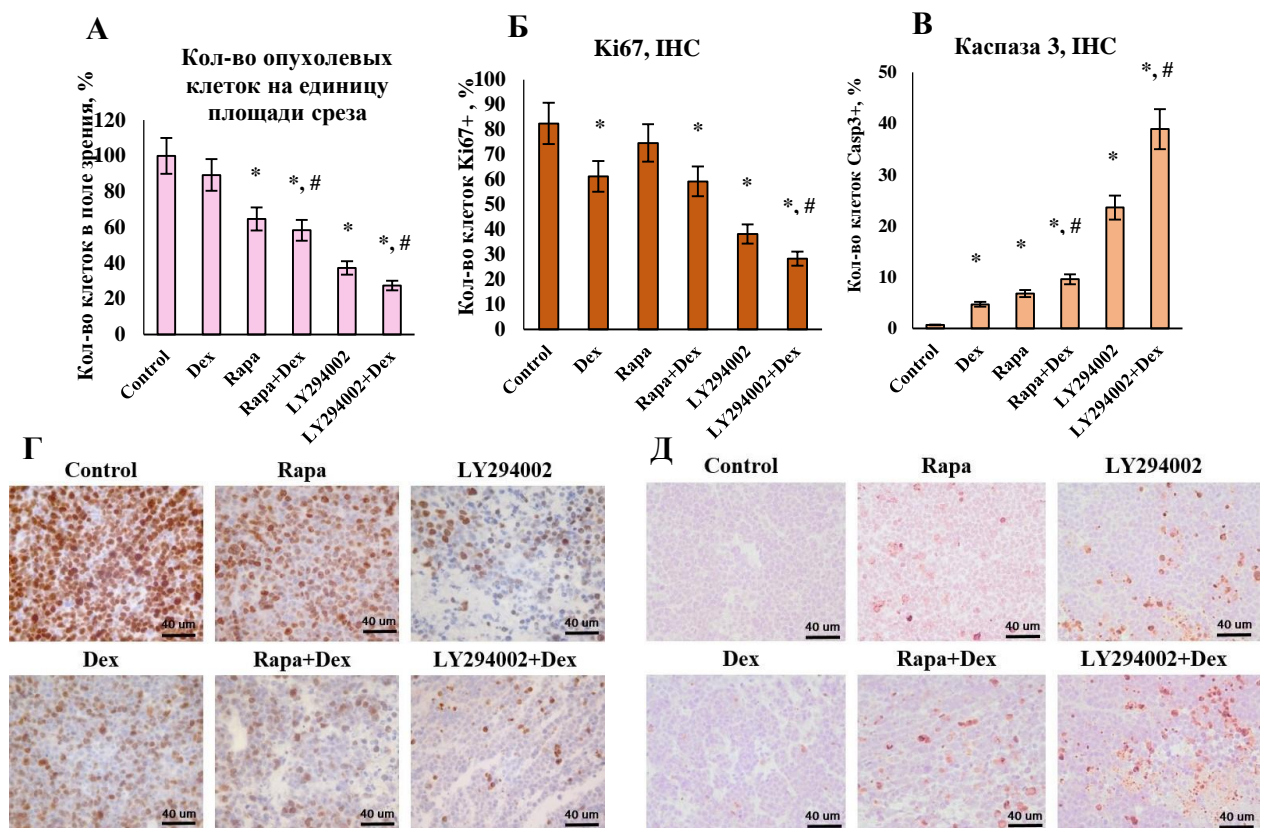
Животным вводили внутривентриально Dex (1 мг/кг) каждые 48 ч, LY294002 (20 мг/кг) и Rapa (5 мг/кг), вводили за 6 ч до введения Dex. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=10$)

Рисунок 7 – (А) Противоопухолевый эффект LY294002, Rapa и Dex на модели бестимусных мышей, (Б) торможение роста опухолевого узла на 27 день терапии

На 27-й день эксперимента средний объем опухоли в контрольной группе составил $1489 \pm 161,3$ мм³. В группах, получавших индивидуально Dex или LY294002, объем опухоли уменьшился на ~ 40% и ~ 70% соответственно. Было продемонстрировано заметное уменьшение объема опухоли на 85% в группе LY294002+Dex. Аналогичное противоллимфомное действие наблюдалось для групп положительного контроля, получавших Rapa и Dex (~ 75%

уменьшение объема опухоли в группе, получающей Rapa, и ~ 85% в группе, получающей Rapa+Dex). Таким образом, был показан кооперативный противоопухолевый эффект при применении комбинации препаратов LY294002 и Dex. Также был исследован тип комбинированного взаимодействия Dex и LY294002. Для данного исследования был использован подход определения комбинированного индекса (CI), основанный на разнице между ожидаемым и наблюдаемым средними объемами опухоли в группах Dex+LY294002 по сравнению с контролем. Расчетное значение $CI=0,87$ для Dex+LY294002 указывает на синергический тип взаимодействия.

Уменьшение объема также коррелировало со снижением количества опухолевых клеток в поле зрения (Рисунок 8).



Количественный анализ плотности клеток в опухоли (А), Ki67- (Б, Г) и Casp3- (В, Д) положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином или специфическими антителами к Casp3. Животным вводили внутривенно Dex (1 мг/кг) каждые 48 ч, LY294002 (20 мг/кг) и Rapa (5 мг/кг), вводили за 6 ч до введения Dex. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0,05$

Рисунок 8 – Оценка эффективности терапии ингибиторами экспрессии *REDD1* и Dex

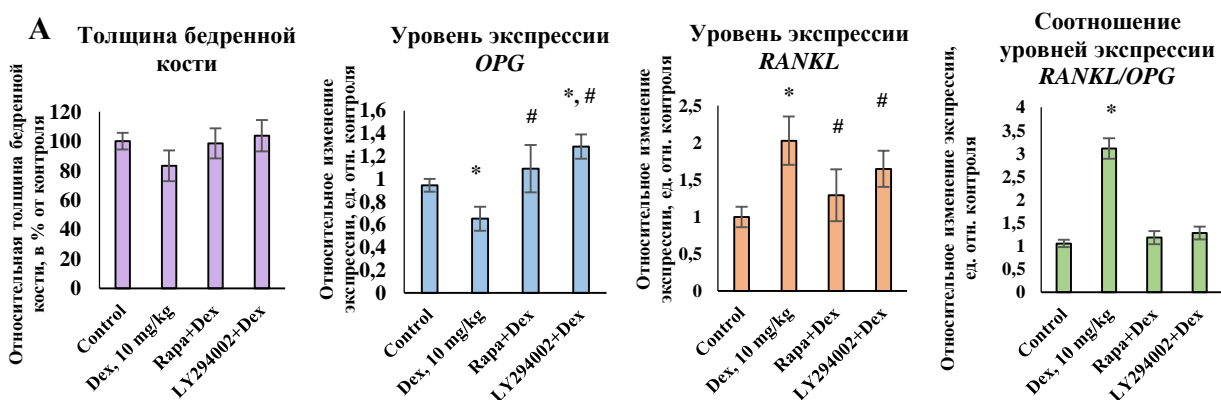
В группах, получающих комбинацию препаратов Dex+LY294002, значение количества клеток в сравнении контролем составило 27,4%. Таким образом, уменьшение количества опухолевых клеток в группе с комбинированным лечением Dex+LY294002 было значительно

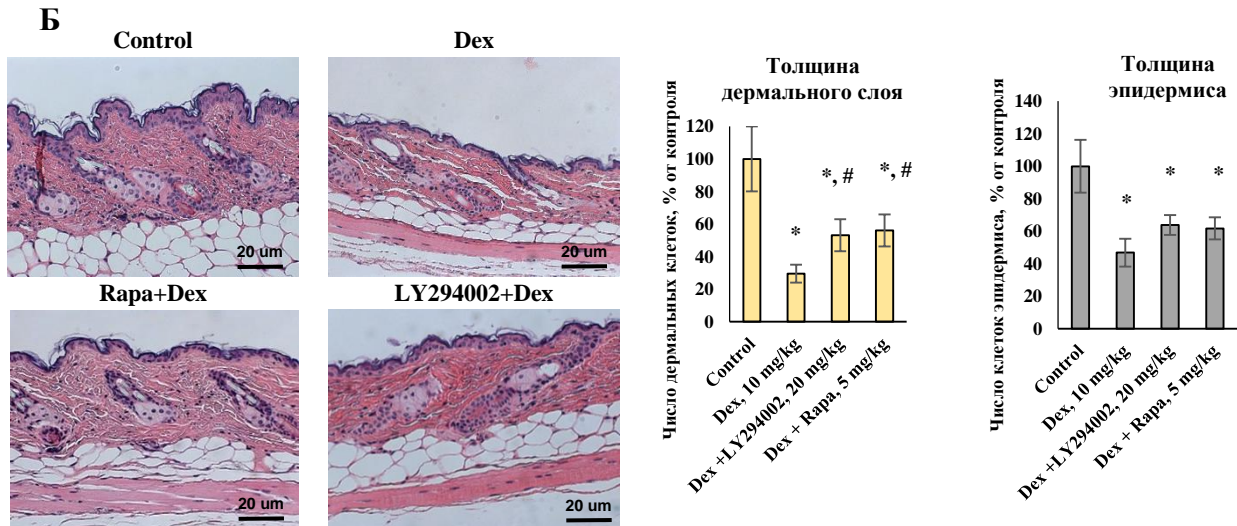
более эффективным, чем в группе положительного контроля, получающей Dex+Rapa (58,3%), и снизило данный показатель на 72,6% и 61,9% по сравнению с контролем и с группой, получающей только Dex, соответственно. Также была оценена степень жизнеспособности клеток и запуска апоптоза путем иммуноокрашивания маркеров пролиферации (Ki67) и апоптоза (каспазы 3). Было показано, что наименьшее количество Ki67-позитивных клеток и наибольший процент апоптотических клеток в ксенотрансплантатах из группы, было у получавших комбинацию LY294002+Dex, что также подтвердило результаты предыдущих опытов о том, что совместное действие LY294009 усиливает противолимфомные эффекты Dex.

Исследование системного воздействия LY94002 на ГК-индуцированную атрофию

Чтобы оценить способность ингибиторов экспрессии *REDD1* снижать системные атрофические эффекты ГК, была использована ранее описанная модель ГК-индуцированного остеопороза у самок мышей Balb/c. Также оценили атрофию как костей, так и кожи, вызванную инъекциями высоких доз Dex (10 мг/кг) каждые 48 ч в течение 5 недель. LY294002 (20 мг/кг) и Rapa (5 мг/кг) вводили за 6 ч до введения Dex.

При исследовании влияния выбранных соединений на развитие ГК-индуцированных побочных эффектов была выявлена тенденция к уменьшению толщины бедренной кости между контрольной группой животных и группой, получавшей Dex, однако наблюдаемое изменение не было статистически значимым (Рисунок 9). Также были изучены изменения уровней экспрессии широко распространенных маркеров развития остеопороза: гена мембранного белка, цитокина семейства факторов некроза опухоли *RANKL*, связанного с резорбцией кости, и остеопротегерина *OPG*, осуществляющего защитные функции против резорбции кости. Их соотношение (*RANKL/OPG*) показало, что в группе, получавшей Dex, кости бедренной кости начали подвергаться остеопорозу, поскольку соотношение *RANKL/OPG* значительно увеличилось после 5 недель лечения. Напротив, LY294002 способствовал подавлению экспрессии *RANKL* и повышению экспрессии *OPG*, что значительно снижало соотношение *RANKL/OPG* к базальному уровню.





Животным вводили внутрибрюшинно Dex (10 мг/кг) каждые 48 ч. LY294002 (20 мг/кг) и Rapa (5 мг/кг), вводили за 6 ч до введения Dex. Данные представлены как (А) $M \pm SD$ ($n=3$) и (Б) $M \pm SD$ ($n=10$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от группы, получавшей Dex, $p < 0,05$

Рисунок 9 – (А) Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на экспрессию *OPG* и *RANKL* в бедренной кости самок мышей Balb/c, (Б) Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на толщину эпидермального и дермального слоев кожи самок мышей Balb/c

ВЫВОДЫ

1. Ингибиторы сигнального пути PI3K/Akt/mTOR – вортманнин, AZD8055 и LY294002 обладают цитотоксическим действием в отношении клеток острого лимфобластного лейкоза СЕМ и мантийноклеточной лимфомы Granta-519 *in vitro*, при этом лимфоциты здоровых доноров более устойчивы к их действию.

2. Вортманнин, AZD8055 и LY294002 подавляют как базальный, так и глюкокортикоид-индуцированный уровень экспрессии *REDD1* в клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ и мантийноклеточной лимфомы Granta-519, культивируемых *in vitro*.

3. Ингибиторы экспрессии *REDD1* модулируют функциональную активность рецептора глюкокортикоидов, снижая степень глюкокортикоид-индуцированного фосфорилирования рецептора глюкокортикоидов по остатку Ser²¹¹ и его транслокацию в ядро, а также подавляют запуск глюкокортикоид-индуцированной транс-активации, и при этом не влияют на запуск транс-репрессии в культивируемых *in vitro* клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ и мантийноклеточной лимфомы Granta-519 или усиливают его.

4. Вортманнин, AZD8055 и LY294002 обладают противоопухолевой активностью (антипролиферативной и проапоптотической) в отношении культивируемых *in vitro* клеток острого лимфобластного лейкоза и мантийноклеточной лимфомы.

5. При комбинированном использовании LY294002 и дексаметазон проявляют синергический противоопухолевый эффект в отношении ксенографтов мантийноклеточной лимфомы Granta-519.

6. LY294002 подавляет глюкокортикоид-индуцированную атрофию кожного покрова и костной ткани при моделировании этих процессов *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Lesovaya, E.A. A novel approach to safer glucocorticoid receptor-targeted anti-lymphoma therapy via REDD1 (Regulated in Development and DNA Damage 1) inhibition / E.A. Lesovaya, **A.V. Osipova**, O.V. Morozova, E.S. Lylova, E.M. Zhidkova, E.P. Kulikov, K.I. Kirsanov, A. Klopot, G. Baida, M.G. Yakubovskaya, L.I. Gordon, B. Readhead, J.T. Dudley, I. Budunova // *Molecular Cancer Therapeutics*. — 2020. — Т.19. — №9. — С. 1898-1908.

2. Zhidkova, E.M. Nutritional sensor REDD1 in cancer and inflammation: friend or foe? / E.M. Zhidkova, E.S. Lylova, D.D. Grigoreva, K.I. Kirsanov, **A.V. Osipova**, E.P. Kulikov, S.A. Mertsalov, G.A. Belitsky, I. Budunova, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — Т.23. — №17. — С. 9686-9699.

3. Zhidkova, E.M. A brief overview of the paradoxical role of glucocorticoids in breast cancer / E.M. Zhidkova, E.S. Lylova, **A.V. Savinkova**, S.A. Mertsalov, K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. — 2020. — Т.2. — С. 1-6.

4. **Савинкова, А.В.** Противоопухолевый эффект энантиомеров CpdA *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, И.В. Будунова, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // *Российский биотерапевтический журнал*. — 2017. — Т. 16. — №1. — С. 61-69.

5. Тилова, Л.Р. Синтез нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора и оценка его противоопухолевой активности на модели 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. (Электронный журнал)*. — 2016.— №6. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=25648>