

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н. Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
доктор биологических наук, доцент  
**Екатерина Андреевна Лесовая**

Москва – 2023 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	11
1.1. Общая характеристика и молекулярный патогенез злокачественных новообразований системы крови .....	11
1.1.1. Этиология злокачественных новообразований системы крови.....	11
1.1.2. Нарушения сигнальных путей при злокачественных новообразованиях системы крови ...	14
1.2. Использование глюкокортикоидов в терапии злокачественных новообразований системы крови.....	19
1.2.1. Механизм действия и биологические эффекты глюкокортикоидов .....	20
1.2.2. Роль глюкокортикоидов в терапии и их побочные эффекты.....	24
1.3. Ген <i>REDD1</i> как основной ген, индуцируемый глюкокортикоид-зависимой транс-активацией .....	33
1.3.1. Механизм действия <i>REDD1</i> как ингибитора сигнального пути PI3K/Akt/mTOR.....	36
1.3.2. Роль <i>REDD1</i> в патогенезе различных заболеваний .....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	52
2.1. Список используемых реактивов.....	52
2.2. Список используемых приборов.....	54
2.3. Клеточные линии.....	54
2.4. Определение цитотоксического эффекта .....	54
2.5. Проточная цитофлуориметрия.....	56
2.6. Выделение РНК и обратная транскрипция .....	56
2.7. Количественный ПЦР-анализ .....	57
2.8. Электрофорез ДНК в агарозном геле .....	58
2.9. Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS.....	58
2.10. Вестерн блоттинг.....	58
2.11. Трансформация бактериальных клеток .....	59
2.12. Выделение плазмидной ДНК .....	60
2.13. Приготовление сред и растворов для работы с бактериями .....	60
2.14. Используемые генетические конструкции.....	60
2.15. Трансдукция клеток лентивирусными векторами .....	61
2.16. Определение активности люциферазы .....	61

2.17. Оценка противоопухолевой активности <i>in vivo</i> на ксенографтах лимфомы у бестимусных мышей.....	61
2.18. Оценка атрофических и воспалительных процессов <i>in vivo</i> у мышей.....	62
2.19. Гистологический и иммуногистохимический анализ.....	62
2.20. Морфометрический анализ .....	63
2.21. Статистическая обработка данных .....	64
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	65
3.1. Анализ данных биоинформатического скрининга потенциальных ингибиторов экспрессии <i>REDD1</i> .....	65
3.2. Подбор оптимальных рабочих концентраций ингибиторов экспрессии <i>REDD1</i> .....	66
3.3. Оценка эффектов ингибиторов экспрессии <i>REDD1</i> на молекулярные механизмы функционирования ГР в клетках лейкозов и лимфом .....	68
3.3.1. Оценка влияния потенциальных ингибиторов экспрессии <i>REDD1</i> на уровень его экспрессии.....	68
3.3.2. Оценка эффектов ингибиторов экспрессии <i>REDD1</i> на сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR.....	69
3.3.3. Влияние ингибиторов экспрессии <i>REDD1</i> на запуск механизмов транс-репрессии и транс-активации .....	72
3.3.4. Оценка эффектов ингибиторов экспрессии <i>REDD1</i> на функциональную активность ГР...77	77
3.3.5. Определение совместного антипролиферативного и проапоптотического эффектов ингибиторов экспрессии <i>REDD1</i> и глюкокортикоидов.....	80
3.4. Оценка противоопухолевого эффекта ГК в комбинации с ингибиторами экспрессии <i>REDD1</i> .....	86
3.5. Исследование системного воздействия LY94002 на ГК-индуцированную атрофию .....	90
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	101
ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

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- $\kappa$ 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.

### Степень разработанности

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**

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

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 ГК 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 ГК (а) остеопороза и (б) атрофии кожного покрова.

### 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 Ser<sup>211</sup>; 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 работы

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.

### **Методология и методы 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-kB- и GRE-зависимого промотора, соответственно; в качестве исследований для подтверждения полученных результатов проведены вестерн блоттинг и количественная ПЦР ГР- и NF-kB-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.

### **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 Ser<sup>211</sup> 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.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

В работе использованы современные методы молекулярно-биологических исследований как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*, их выбор адекватен поставленным в работе задачам с включением всех необходимых контролей, что обеспечивает высокую достоверность полученных результатов. Полученные данные обработаны с использованием современных методов математической статистики. Таким образом, достоверность полученных результатов основана на корректном выборе и корректном использовании в исследовании современных методов анализа и обработки экспериментальных данных. Полученные в исследовании результаты согласуются с отдельными опубликованными данными по изучению биологических свойств ксенобиотиков, используемых в данном исследовании в качестве потенциальных ингибиторов экспрессии гена *REDD1*.

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК. 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая характеристика и молекулярный патогенез злокачественных новообразований системы крови

Злокачественные новообразования системы крови (ЗНО СК) включают в себя обширную группу злокачественных новообразований клеток лимфатической и кроветворной систем, а также дендритных клеток. Согласно действующей в настоящее время Международной классификации болезней (МКБ-11) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в раздел «Злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей» входит более десяти нозологических форм, классификация которых основана на комплексе морфологических и иммунофенотипических особенностей, генетических нарушений и клинических проявлений (<https://icd.who.int/ru>).

Данная гетерогенная группа ЗНО СК включает следующие подгруппы:

- системные ЗНО СК – лейкозы, в зависимости от степени распространенности могут быть лейкемическими, сублейкемическими, лейкопеническими и алейкемическими, а также по степени дифференцировки – острыми (или бластными) и хроническими (или цитарными);
- регионарные – гематосаркомы, или лимфомы, первичный рост которых происходит вне костного мозга. При этом из локальной они способны переходить в генерализованную форму, т.е. в лейкоз, также возможен обратный переход [6].

#### 1.1.1. Этиология злокачественных новообразований системы крови

Согласно экспериментальным и эпидемиологическим данным выделяют следующие эндо- и экзогенные факторы, способствующие возникновению и развитию вышеперечисленных заболеваний:

##### 1) *Химические канцерогены*

Известно, что химические канцерогены вызывают до 90% всех злокачественных новообразований у человека [2]. Например, бензол обладает миелотоксичным действием, способствуя развитию ЗНО СК, в том числе лейкозов; 2,3,7,8-тетрахлородибензодиоксин также вызывает рост злокачественных новообразований кроветворной системы. Такие цитостатические и цитотоксические препараты, как циклофосфамид, хлорамбуцил, этопозид и др., применяемые в высокодозированной терапии, в долгосрочной перспективе (2–10 лет) способны вызвать развитие лейкозов с частотой до 15% [13].

##### 2) *Физические канцерогены*

Физические канцерогены могут оказывать влияние как при постоянном воздействии, так и при периодическом, и даже однократном (в том числе, в медицинских целях). Лица, которые были подвергнуты какому-либо из ионизирующих воздействий, входят в группу риска развития ЗНО СК. В частности, у пациентов, получавших лучевую терапию, или у медицинского персонала, работающего в рентгенологических кабинетах, а также у населения, пострадавшего, например, в результате аварии на Чернобыльской атомной электростанции, в 5-10% случаев развиваются злокачественные новообразования лимфатической и кроветворной систем [13].

### *3) Онкогенные вирусные и бактериальные инфекции.*

Онкогенными являются вирусы, которые способны вызывать у животных и человека как злокачественные, так и доброкачественные новообразования различных локализаций. В настоящее время известны различные ДНК- и РНК-содержащие вирусы человека, запускающие или повышающие риск неопластической трансформации клеток в организме.

Одним из наиболее распространенных и высококонтагиозных онкогенных вирусов является вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ, EBV) – вирус герпеса человека 4 типа (ВГЧ-4, HHV-4). ВЭБ - ДНК-содержащий вирус, ассоциированный с развитием различных как неонкологических заболеваний (герпес, болезнь Филатова (инфекционный мононуклеоз), синдром хронической усталости и др.), так и онкологических. К последним относятся различные типы ЗНО СК: лимфома Беркитта (ЛБ), посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания, экстранодальная НК-/Т-клеточная лимфома [119].

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, HIV) также является фактором риска, связанным с возникновением различных злокачественных новообразований. Такими ВИЧ-ассоциированными ЗНО СК являются В-клеточные неходжкинские лимфомы (НХЛ), в том числе первичная лимфома центральной нервной системы (ПЛЦНС), диффузная В-крупноклеточная лимфома, ЛБ. Основным критерий вероятности развития ЗНО при ВИЧ — это уровень иммуносупрессии, а не сам факт инфицирования данным вирусом, т.е. существует зависимость между уровнем иммуносупрессии и риском развития ЗНО СК при ВИЧ. Было обнаружено, что с началом применения антиретровирусной терапии показатель заболеваемости ВИЧ-ассоциированными ЗНО СК значительно снизился [17].

Следует отметить, что ВИЧ-инфекция, вызывающая патологические изменения в иммунной системе человека, способствует развитию сопутствующих инфекций. Например, за счет утраты антител к онкогенным вирусам, ВИЧ может способствовать инфицированию ВЭБ. По статистике ВЭБ связан с ~60% всех ВИЧ-ассоциированных лимфом (ЛБ, плазмобластными лимфомами, ПЛЦНС, ЛХ). Роль ВЭБ в патогенезе ВИЧ-ассоциированных лимфом активно обсуждается в литературе [17].

Вирус герпеса человека 8 типа (ВГЧ-8, HHV-8) ассоциирован с развитием первичной

выпотной лимфомы (серозных полостей) и некоторых разновидностей болезни Кастлемана, характеризующейся высоким риском трансформации в лимфому [3, 10].

Т-лимфотропный вирус человека типа I (HTLV-1) инфицирует в первую очередь CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты и вызывает тяжелые заболевания, преимущественно Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых и связанную с HTLV-1 миелопатию, или тропический спастический парапарез. Также было показано, что другой тип данного вируса - HTLV-2 может быть причиной развития кожной Т-клеточной лимфомы [163].

Инфицирование *Helicobacter pylori*, как один из патогенетических факторов, в настоящее время связывают не только с развитием аденокарциномы желудка, одной из самых распространенных причин смертности от онкологических заболеваний, но и с развитием неходжкинской MALT-лимфомы желудка (mucosaassociated lymphoid tissue — опухоли лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками), или мальтомы. Данный патогенный фактор (*H. pylori*) увеличивает риск развития вышеуказанной НХЛ, поскольку вызывает хроническую стимуляцию иммунной системы и постоянную активацию лимфоцитов [118].

Существуют также другие бактериальные агенты, способные вызвать хроническую стимуляцию иммунной системы, являющейся в последствии причиной развития различных НХЛ. К примеру, *Campylobacter jejuni* – вид бактерий, обычно вызывающий заболевания пищевого происхождения, ассоциирован с малой интестинальной неходжкинской MALT-лимфомой; *Chlamidia psittaci* – вид хламидий, вызывающих пситтакоз, острое инфекционное заболевание, переносчиками которого являются птицы, ассоциирован с неходжкинской MALT-лимфомой придатков глаза, а *Borrelia burgdorferi* – возбудитель болезни Лайма, или клещевого боррелиоза, в свою очередь – с кожной неходжкинской MALT-лимфомой [7].

#### 4) Генетическая предрасположенность.

По данным эпидемиологических исследований около 20% пациентов, страдающих различными ЗНО СК, имеютотягощенный ЗНО семейный анамнез. Тем не менее, лишь 5–10% ЗНО СК являются наследственными формами заболеваний.

Наследственные ЗНО СК имеют в семейном анамнезе различные хромосомные дефекты и значимое увеличение случаев развития ЗНО СК [23]. К таким синдромам с различными генетическими нарушениями относятся:

- синдром Дауна (трисомия по хромосоме 21);
- синдром Блума (аутосомно-рецессивное заболевание, при котором отмечена значительная геномная нестабильность; например, гомологичная рекомбинация);
- синдром де Тони-Дебре-Фанкони (глюкозо-фосфат-аминовый диабет, почечная недостаточность, нарушение тубулярной реабсорбции);

– синдром Клайнфельтера (дополнительная половая X-хромосома у лиц мужского пола в следствие нерасхождения хромосом в процессе родительского гаметогенеза);

– синдром Шерешевского – Тернера (моносомия по X-хромосоме, а также могут быть структурные изменения в одной X-хромосоме; возможны различные хромосомные aberrации).

### **1.1.2. Нарушения сигнальных путей при злокачественных новообразованиях системы крови**

Описан целый ряд генетических нарушений, характерных для конкретных типов ЗНО СК. Значительная часть таких нарушений зафиксирована в соответствующих разделах действующей на данный момент МКБ-11 и дополнениях к ней.

В основе формирования и развития ЗНО СК лежат два типа генетических нарушений: мутации в генах и хромосомные транслокации, приводящие к образованию химерных генов и белков. Эти генетические нарушения могут быть причиной ингибирования генов супрессоров опухолевого роста, а также активации экспрессии онкогенов, что приводит к неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток [22].

#### *1) Молекулярный патогенез миелоидных новообразований*

Согласно действующей на данный момент Международной классификации онкологических заболеваний (МКБ-О) 2017г. в группу миелоидных заболеваний входят: миелопролиферативные новообразования (МПН), миелоидные и лимфоидные новообразования с эозинофилией, миелодиспластические/миелопролиферативные новообразования (МД/МПН), миелодиспластические синдромы (МДС), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) и миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна. (<https://www.niioncologii.ru/science/mkb-o>)

Миелопролиферативные новообразования (МПН) представляют собой нарушения гемопоэтических стволовых клеток, имеющих общие мутации, которые активируют пути передачи сигналов, ответственные за кроветворение. Эти новообразования проявляют фенотипическую мимикрию между собой, а также с другими миелоидными новообразованиями и даже с доброкачественными гемопоэтическими нарушениями. Данные проявления значительно затрудняют диагностику, оценку риска и выбор терапии. Характерными нарушениями для миелопролиферативных новообразований являются соматические мутации в генах киназы Janus2 *JAK2* (наиболее часто встречающаяся *JAK2V617F*), кальретикулина *CALR* (экзон 9) и рецептора тромбопоэтина *MPL* (*MPLW515L/K*), а также в гене рецептора тирозинкиназ *c-KIT* (*D816V*) [104]. Генетические изменения в вышеперечисленных генах являются причиной индукции сигнального пути *JAK/STAT* [194].

Другим частым генетическим нарушением является Филадельфийская хромосома (Ph)

t(9;22)(q34;q11) – цитогенетическая аномалия, хроматидная aberrация, являющаяся последствием возникновения реципрокной транслокации между длинными плечами хромосом 9 и 22. Обычно разрыв хромосомы 9 происходит в точке q34 на 3'-конце протоонкогена, кодирующего тирозинкиназу ABL, и переносится на хромосому 22. Разрыв в хромосоме 22 происходит в точке q11, относящейся к участку 5'-конца гена В-клеточного рецептора BCR. Оставшийся 3'-конец данного гена переходит на хромосому 9, чтобы завершить реципрокность транслокации (9q+). Таким образом, вышеописанная аномалия приводит к образованию химерного гена BCR-ABL1 [134]. Данное изменение кариотипа наблюдается в 95–98% случаях у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ), в 25% ОЛЛ, в 2% ОМЛ. Продуктом химерного гена BCR-ABL1 является тирозинкиназа, обуславливающая избыточную клеточную пролиферацию [11].

Подгруппа миелоидных и лимфоидных новообразований с эозинофилией характеризуется наличием различных изменений в генах рецепторов тромбоцитарного фактора роста PDGFRA, PDGFRB и фактора роста фибробластов FGFR1. Наиболее часто встречаются делеции в локусе 4q12 с образованием химерного гена FIP1L1-PDGFRB и транслокация t(5;12)(q32;p13.2) с образованием ETV6-PDGFRB [204]. Транслокация 8p11.2 приводит к образованию химерного гена FGFR1 с различными генами-партнерами, при этом у пациентов отсутствует ответ на терапию ингибиторами тирозинкиназы. В этой подгруппе также выделяют нозологическую форму с транслокацией t(8;9)(p22;p24.1) и образованием гена PCMI-JAK2, при обнаружении данного генетического изменения у пациентов возможен положительный ответ на терапию ингибиторами JAK2 [4, 30].

В отдельную подгруппу выделяют миелодиспластические синдромы (МДС), характеризующиеся клональной пролиферацией гемопоэтических стволовых клеток, рецидивирующими генетическими аномалиями, миелодисплазией, нарушениями миелопоэза, цитопенией периферической крови, которые нельзя однозначно отнести к злокачественным новообразованиям. Однако МДС обладают высоким риском трансформации в ОМЛ (около 30-40%), поэтому их также называют «предлейкозом». В 20-70% случаев у пациентов с МДС обнаруживают различные цитогенетические аномалии [49]. Такие аномалии хромосом 3, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 17, 19 указывают на предположительный диагноз МДС. Однако, несмотря на так же часто встречающиеся изменения в хромосомах 8, 20 и Y, они не рассматриваются как доказательства МДС из-за их присутствия в других миелоидных новообразованиях. В ~80% случаев обнаруживают различные соматические мутации в генах, которые кодируют белки сигнальной трансдукции (NRAS, FLT3-ITD, CBL, JAK2, KIT), факторов транскрипции (RUNX1, TP53, ETV6), супрессоров опухолевого роста (TP53, WT1), эпигенетических модификаторов (TET2, ASXL1, IDH1, IDH2, EZH2, DNMT3A), аппарата сплайсинга РНК (SF3B1, U2AF1, SRSF2,

ZRSR2) и компонентов когезинового комплекса (STAG2, RAD21, SMC3, SMC1A) [85, 200].

Миелодиспластические/миелопролиферативные новообразования (МД/МПН) - клональные гемопоэтические новообразования, которые на момент постановки первоначального диагноза имеют некоторые клинические, лабораторные и морфологические особенности, которые подтверждают как диагноз МДС, так и данные, которые больше соответствуют МПН. К этой подгруппе относятся: хронический миеломоноцитарный лейкоз, атипичный хронический миелоидный лейкоз (BCR-ABL<sup>-</sup>) и ювенильный миеломоноцитарный лейкоз. Для вышеперечисленных заболеваний характерна пролиферация нейтрофилов с моноцитозом или без него, цитопения с участием одного или нескольких клеточных клонов, а также спленомегалия. Единый патогенез этой группы заболеваний не определен. Повторяющиеся хромосомные аномалии встречаются у 30-40% пациентов, но ни одна из них не является полностью специфичной для МД/МПН. Эта гетерогенная группа характеризуется высокой частотой мутаций в гене *RAS* (20-40%), ассоциированной с нарушениями в путях передачи сигнала, и, как следствие, вызывает увеличение пролиферации [53, 81]. Кроме того, наиболее часто встречаются аномалии хромосомы 5, которые приводят к перестройкам и образованию химерных генов *ETV1-PDGFRB* t(5;12)(q31;p12) и *H4-D10S170-PDGFRB* t(5;10)(q33;q11). Такие транслокации приводят к активации соответствующей рецепторной тирозинкиназы и пролиферации [204].

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой группу ЗНО СК клональной природы, характеризующихся генетическими нарушениями, возникающими в клетках гемопоэтического ростка на этапе созревания. Эти нарушения приводят к изменению в сигнальных путях, определяющих процессы пролиферации и дифференцировки клеток гемопоэтического ростка, и, соответственно, сниженным уровнем генеза одного или нескольких различных видов зрелых клеток крови. Активно пролиферирующие незрелые клетки гемопоэтического ростка замещают нормальные клетки крови, приводя к цитопении. Накопление незрелых клеток начинается в костном мозге, но в большинстве случаев процесс быстро распространяется на периферическую кровь и затрагивает лимфатические узлы, селезенку, печень и др. ОМЛ может возникнуть у пациентов с другими гематологическими заболеваниями, однако в большинстве случаев проявляется как злокачественное новообразование *de novo*. При ОМЛ обнаруживаются различные изменения в хромосомах 3, 5, 6, 7, 8, 9 и др. Генетические мутации выявляют более чем в 97% случаев, часто при отсутствии каких-либо хромосомных аномалий. Согласно модели лейкемогенеза, которая предлагает концептуальную основу для классификации различных мутаций, вызывающих ОМЛ, мутации класса I, которые приводят к активации пролиферативных путей, должны происходить в сочетании с мутациями класса II, которые нарушают нормальную гемопоэтическую дифференцировку. К классу I относят мутации в генах *FLT3*, *K/NRAS*, *TP53* и *c-KIT*, (~ 28, 12, 8 и



4 % случаев, соответственно). Известные мутации класса II включают NPM1 и СЕВРА, которые обнаруживают в ~ 27% и 6% случаев, соответственно. Изменения в генах, участвующих в эпигенетической регуляции, недавно выделили как III класс мутаций с последующим влиянием как на клеточную дифференцировку, так и на пролиферацию. К ним относят мутации в генах, связанных с метилированием ДНК, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH-1* и *IDH-2,6,7*, которые обнаруживают более чем в 40% случаев ОМЛ [117, 166].

Миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна (СД), встречаются с высокой частотой у пациентов младше 4 лет. Характерным нарушением для этого заболевания являются соматические мутации в GATA-связывающем факторе 1 (*GATA1*), который играет важную роль в процессе развития эритроцитов. Однако эти мутации не характерны для ОМЛ у пациентов без СД [141].

## 2) Молекулярный патогенез лимфоидных новообразований

Данная группа заболеваний включает в себя острый лейкоз неуточненного клеточного типа (ОЛНКТ), лимфоидные новообразования из клеток-предшественников, новообразования из зрелых В-лимфоцитов, а также из зрелых Т- и НК-клеток, лимфому Ходжкина (ЛХ), новообразования из гистиоцитов и дендритных клеток, посттрансплантационные лимфопрролиферативные заболевания.

Авторами отмечено, что для ОЛНКТ характерны некоторые особенности, которые заключаются в присутствии в периферической крови и костном мозге недифференцированных бластных клеток, обладающих одновременно свойствами миелоидных и В-/Т-лимфоидных клеток. Однако встречается и тройной ОЛНКТ, т. е. одновременно миелоидной, В- и Т-лимфоидной гемопозитической линейности. Наиболее часто встречающимися хромосомными аномалиями при ОЛНКТ являются  $t(v;11q23)$  с перестройкой гена *MLL* и  $t(9,22)(q34;q11.2)$  с образованием химерного гена *BCR-ABL1*. К соматическим мутациям в данной группе заболеваний можно отнести мутации в генах эпигенетической регуляции *DNMT3A*, *IDH2*, *EZH2*, передачи сигнала *RAS*, гене-супрессоре опухолевого роста *TP53*, фактора транскрипции *NOTCH1*, реже в генах сплайсосомного аппарата и когезинового комплекса, а также были обнаружены изменения в генах *IKZF1*, *ASXL1*, *TET2*, *ETV6* [1, 218].

Лимфоидные новообразования подразделяют на В - и Т-лимфобластные лейкозы/лимфомы. В-лимфобластный лейкоз/лимфома происходит от предшественников В-клеток. Данное заболевание встречается преимущественно у детей, но также может возникнуть в любом возрасте. Для В-лимфобластного лейкоза/лимфомы характерны следующие генетические нарушения: транслокации  $t(12;21)$  *ETV6-RUNX1*,  $t(1;19)$  *E2A-PBX1*,  $t(5;14)$  *IL3-IGH*,  $t(9;22)$  *BCR-ABL1*,  $t(v;11q23)$  *KMT2A/MLL*, а также аномалии хромосом 1, 2, 3, 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 и X. При В-клеточных лейкозах/лимфомах почти в 40% случаев в опухолевых клетках

выявляют точечные мутации в генах супрессоров опухолевого роста, регуляторов клеточного цикла, транскрипционных факторов, компонентов сигнального пути Ras и др [231, 235].

T-лимфобластный лейкоз и T-лимфобластная лимфома представляют собой новообразования из незрелых предшественников T-клеток или лимфобластов. Эти новообразования, как правило, возникают у подростков старшего возраста, с преобладанием у лиц мужского пола (3:1). При T-лимфобластном лейкозе/лимфоме трансформация T-клеток включает в себя как различные патогенные генетические полиморфизмы, так и изменения сигнальных путей, отвечающих за различные механизмы в клетке, такие как пролиферация и дифференцировка. Самой распространенной генетической аномалией, встречающейся в 70% случаев, является делеция 9q21 в генах CDKN2A/CDKN2B, ответственных за супрессию опухолевого роста. Активирующие мутации в NOTCH1 или инактивирующие мутации его негативного регулятора FBXW7 происходят примерно в 60% случаев. Также встречаются мутации в генах TAL1/2, LYL1, LMO1/2/3, TLX1/3, HOXA, MYB, MYC. Эти генетические изменения способствуют ингибированию генов-супрессоров, а также повышению уровня экспрессии транскрипционных факторов и пролиферативной активности [34, 228].

Лимфома Ходжкина (ЛХ) – злокачественное новообразование лимфоидной ткани, характерным признаком которого является наличие гигантских клеток Ходжкина и Рид-Штернберга (моноядерных и многоядерных соответственно). Однако они составляют лишь незначительную часть опухолевой ткани, которая представлена преимущественно лимфоцитами, макрофагами, эозинофилами, плазматическими клетками, стромальными клетками и фибробластами. При ЛХ сигнальные пути и факторы транскрипции, включая NF-κB, JAK-STAT, PI3K-Akt, Erk, AP1, NOTCH1 и рецепторные тирозинкиназы, гиперактивированы в клетках Ходжкина и Рид-Штернберга. Наиболее часто встречающимся генетическим изменением при ЛХ, обнаруженным в 42% случаев, является мутация в гене супрессора опухолевого роста TNFRSF14 в хромосоме 1 [9, 37, 119, 177].

Новообразования из зрелых В-лимфоцитов представляют собой обширный раздел заболеваний, включающий такие НХЛ как: лимфома Беркитта (ЛБ), В-крупноклеточные лимфомы, MALT-лимфома, волосатоклеточный лейкоз и др. Данная подгруппа характеризуется различными генетическими изменениями, выявляемыми при диагностике. Так при хроническом лейкозе/лимфоме из малых лимфоцитов обнаруживают мутации в генах TP53, NOTCH1, SF3B1, ATM и BIRC3; при волосатоклеточном лейкозе – в большинстве случаев мутацию BRAFV600E, а также мутацию MAP2K1 (при условии наличия мутации IGVH4-34 и отсутствия BRAFV600E); при ЛБ в 70% случаев обнаруживают мутации в гене фактора транскрипции TCF3 или его негативном регуляторе ID3 и др. [5]. Мантийноклеточная лимфома (МКЛ) зачастую характеризуется транслокацией t(11;14)(q13;q32), приводящей к конститутивной

гиперэкспрессии циклина D1. Однако обнаружена небольшая подгруппа циклин D1-независимых МКЛ, и более половины из них несут транслокации в гене *CCND2* [140, 206].

Новообразования из гистиоцитов и дендритных клеток очень редки и могут возникать *de novo* или в связи с В-/Т-клеточными или миелоидными новообразованиями, при этом имея характерные для данных новообразований генетические нарушения. В большинстве случаев в данной нозологической группе обнаруживают соматические мутации, связанные с сигнальным путем RAS, что приводит к активации этого онкогенного пути. Наиболее распространенные мутации - BRAFV600E (50–60%) и MAP2K1 (25%), которые являются взаимоисключающими. Кроме того, мутации в генах TP53 и U2AF1 были обнаружены в 17% и 19% случаев, соответственно, при этом мутации TP53 обычно связаны с мутациями BRAF [156].

Посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания (ПТЛЗ) являются серьезным осложнением после трансплантации солидных органов или аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Генетические вариации реципиента и доноров в локусах человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) и гены некоторых цитокинов участвуют в ПТЛЗ. Было показано, что различные гаплотипы донора и реципиента (HLA-A26 и B38) были независимыми факторами риска, в то время как гаплотипы донора HLA-A1, B8 и DR3 защищали от ПТЛЗ. Отдельное исследование показало, что несоответствие HLA-B у донора и реципиента является причиной развития ПТЛЗ у пациентов с трансплантатом почки. Полиморфизм цитокинов IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  также считается факторами риска развития данного заболевания [188].

На основании всего вышеперечисленного можно сделать вывод о том, что накопленные к настоящему времени знания о различных генетических изменениях при ЗНО СК, приводящих к нарушению множества сигнальных путей, позволяют выявить закономерности возникновения новообразований, совершенствовать классификацию для улучшения диагностики и оценки рисков, а также разрабатывать более эффективную терапию.

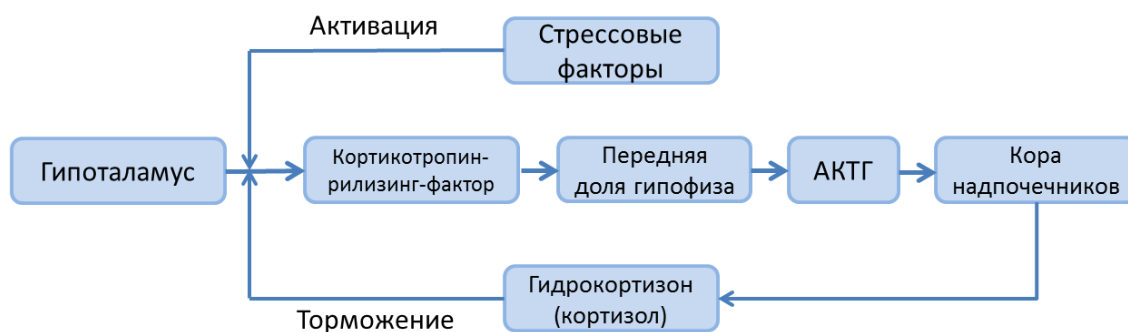
## **1.2. Использование глюкокортикоидов в терапии злокачественных новообразований системы крови**

Глюкокортикоиды (ГК) входят в группу стероидных гормонов –полициклических соединений терпеноидного липидного происхождения, и синтезируются в пучковой и сетчатой зонах коры надпочечников. Широкое применение данного класса соединений обосновано плейтропностью их действия на организм человека. Они регулируют различные физиологические процессы, эмбриональное и постэмбриональное развитие, в частности, созревание легких у плода [74, 152]. Эти стероидные гормоны принимают участие во всех видах

обмена: углеводном, белковом и жировом, а также оказывают противовоспалительное, иммуномодулирующее и противоаллергическое действие. Иммуносупрессивное действие ГК обуславливает их применение в лечении острых и хронических воспалительных заболеваний, таких как астма, различные аллергические реакции, ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника, рассеянный склероз и др. За счет цитотоксических эффектов на клетки иммунной системы ГК являются неотъемлемой составляющей комбинированной химиотерапии при различных онкологических заболеваниях лимфатической и кровяной систем, к примеру, при ОЛЛ, ЛХ, ХЛЛ и др.

### 1.2.1. Механизм действия и биологические эффекты глюкокортикоидов

Регуляция секреции ГК осуществляется гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (ГГНС). Главным звеном в системе регуляции синтеза ГК является гипоталамус, реагирующий на уровень гидрокортизона в плазме крови и стрессовые факторы (СФ). Таким образом, при понижении ГК в крови или при появлении СФ (болевого синдрома, физической нагрузки, инфекции, голода и т.д.) гипоталамус секретирует кортикотропин-рилизинг-фактор (кортиколиберин), стимулируя тем самым выброс адренокортикотропного гормона (АКТГ) из гипофиза. Под действием АКТГ в надпочечниках синтезируются ГК и минералокортикоиды. Напротив, при повышенном уровне ГК в крови гипоталамус прекращает продуцировать кортиколиберин. Таким образом, ГГНС функционирует по механизму отрицательной обратной связи. Однако при длительном применении ГК угнетают ГГНС [60] (Рисунок 1).

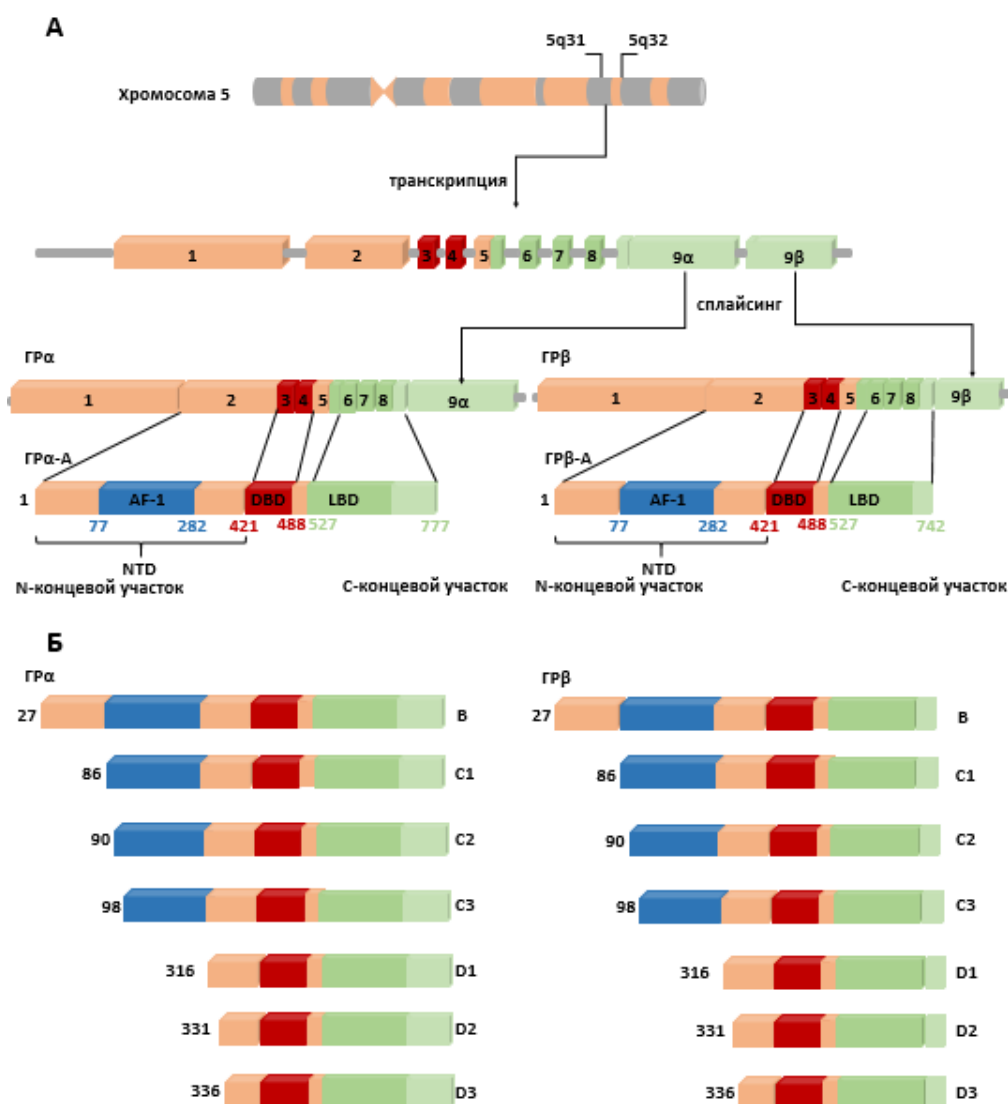


**Рисунок 1** – Схема регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (адаптировано из [20])

Биологический эффект ГК реализуется за счет связывания гормонов с рецептором глюкокортикоидов (ГР). ГР (ген *NR3C1*) – лиганд-активируемый транскрипционный фактор, который, по современным данным, участвует в регуляции экспрессии нескольких тысяч генов, локализуется на длинном плече 5 хромосомы (5q31-32) и состоит из 9 экзонов [111]. (Рисунок 2А) ГР относится к семейству ядерных рецепторов и подсемейству рецепторов стероидных

гормонов, локализованные в ядре, способные также находиться в цитозоле в отсутствие лиганда [24]. ГР экспрессируется практически во всех клетках человеческого организма, однако на различном уровне в зависимости от типа клеток или ткани [72].

ГР имеет доменную структуру (Рисунок 2А, Б). Экзон 1 образует 5'-нетранслируемую область. На N-концевом участке находится иммуногенный домен (NTD) (1-420 аминокислотные остатки (а.о.)), включающий в себя транс-активаторный участок  $\tau$ -1, расположенный в районе 77-262 а.о., главной функцией которого является активация транскрипции генов-мишеней рецептора путем взаимодействия с компонентами базального транскрипционного комплекса и/или с коактиваторными белками [143].



(А) Локализация гена *NR3C1*; доменная структура ГР, изоформы ГР $\alpha$  и ГР $\beta$ , образующиеся в результате альтернативного сплайсинга; (Б) результаты альтернативной инициации трансляции ГР $\alpha$  и ГР $\beta$  (адаптировано из [111])

**Рисунок 2** – Расположение и структура рецептора глюкокортикоидов

Иммуногенный домен кодируется одним большим экзоном (экзон 2). В центре расположен ДНК-связывающий домен (DBD) (421-488 а.о.), и его характерной особенностью является наличие особых петлевых структур, называемых «цинковыми пальцами», представляющих собой 4 остатка цистеина, взаимодействующих с ионами цинка. Этот домен кодируют экзоны 3 и 4, при этом каждый из «цинковых пальцев» кодируется отдельным экзоном [72]. Контакт с ДНК происходит в области альфа-спирали, которая начинается в карбоксильном основании первого «цинкового пальца», при этом в прямом контакте с азотистыми основаниями в большой бороздке ДНК находятся только три аминокислотных остатка, локализованных в альфа-спирали (Lys-461, Val-462, Arg-466) [133]. На С-концевом участке находится лиганд-связывающий домен (LBD), который кодируют экзоны 5-8 и 5'-конец экзона 9 (527-742 а.о.) [24]. Этот домен, как и иммуногенный домен, содержит транс-активаторный участок  $\tau$ -2, расположенный в районе 527-556 а.о., распознаваемый коактиваторными белками [63, 97].

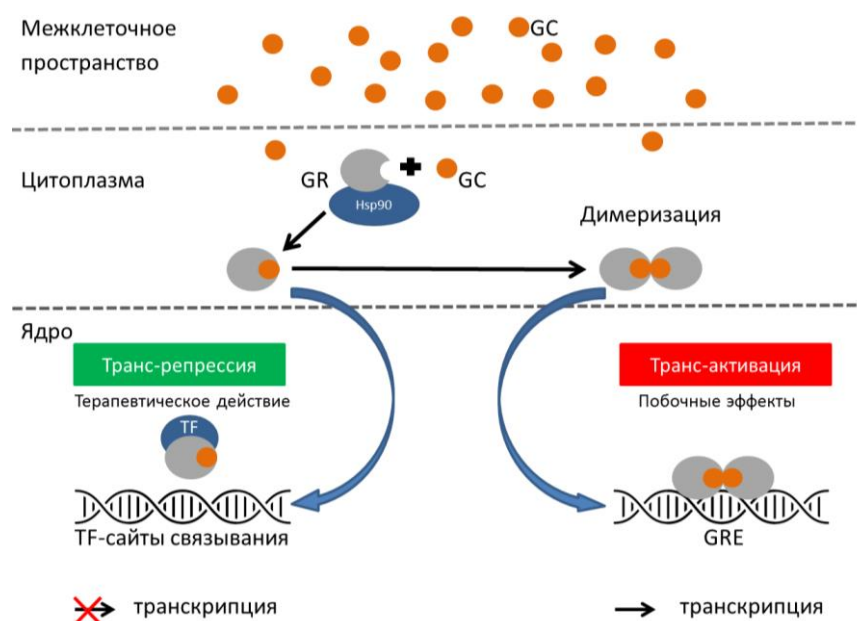
Известно 8 изоформ ГР [15, 72, 111] (Рисунок 2А, Б). Эти изоформы обусловлены полиморфными вариантами *NR3C1*, альтернативным сплайсингом и инициацией альтернативной трансляции [72, 132]. Однако наиболее значимыми, полученными в результате альтернативного сплайсинга, являются  $\alpha$  и  $\beta$  изоформы. Изоформа ГР $\alpha$  состоит из 777 остатков аминокислот и включает в себя все вышеперечисленные домены. Известно, что изоформа ГР $\beta$  (742 а.о.), преимущественно локализованная в ядре, является усеченной по лиганд-связывающему домену, в связи с этим не обладает способностью связываться с ГК. Данная изоформа является доминантным биологическим ингибитором действия ГК [15, 16, 20, 150, 151]. Однако, несмотря на то, что не было показано связывание ГР $\beta$  с агонистами ГК, известно, что антагонист RU486 (мифепристон) может связываться с ГР $\beta$  и регулировать его транскрипционную активность [129]. Таким образом, ГР $\beta$  является отрицательным регулятором функций изоформы ГР $\alpha$ , а также выполняет независимые функции [111].

ГР $\gamma$ , ГР-А и ГР-Р - менее охарактеризованные изоформы ГР, обуславливающие нечувствительность к ГК [149]. Было обнаружено, что уровень экспрессии ГР $\gamma$  ниже у пациентов с ОЛЛ, которые хорошо ответили на лечение ГК, чем у пациентов, плохо отвечавших на терапию [35].

Изоформа ГР $\alpha$  в результате альтернативной инициации трансляции в экзоне 2 может образовывать восемь дополнительных изоформ ГР с усеченными N-концами (ГР $\alpha$ -А, ГР $\alpha$ -В, ГР $\alpha$ -С1, ГР $\alpha$ -С2, ГР $\alpha$ -С3, ГР $\alpha$ -D1, ГР $\alpha$ -D2 и ГР $\alpha$ -D3). (Рисунок 2Б) Предполагается, что ГР $\beta$  может также образовывать восемь  $\beta$ -изоформ, подобных ГР $\alpha$  [72]. Все изоформы ГР $\alpha$  имеют сходное сродство к ГК и взаимодействуют с глюкокортикоид-респонсивными элементами (ГРЭ). Интересно, что изоформа ГР $\alpha$ -С является наиболее биологически активной, в то время как изоформа ГР $\alpha$ -D менее функциональна по отношению к ГК [133].

В отличие от изоформы ГРβ, ГРа при отсутствии гормона находится в цитозоле и входит в состав гетеромерного комплекса, включающего в себя одну молекулу GR и молекулы белков-шаперонов (hsp90, hsp70, иммунофилины FKBP51, FKBP52 и др.) [168]. Связывание рецептора в районе лиганд-связывающего домена с белками теплового шока необходимо для поддержания цитоплазматической локализации неактивированного рецептора, поскольку данный белковый комплекс не способен транслоцироваться в ядро и связываться с ДНК [167, 169]. При прохождении ГК через мембрану внутрь клетки происходит связывание рецептора и гормона, при этом становится возможной диссоциация гетеромерного белкового комплекса [138, 146]. Комплекс «гормон-рецептор» способен запускать два регуляторных механизма действия, транс-репрессию и транс-активацию, которые описаны ниже. Лиганд-связывающий домен также содержит сигналы ядерной локализации и участвует в транспорте комплекса «гормон-рецептор» в ядро клетки и его димеризации [44, 93, 160].

Как было отмечено выше, активированная форма ГР может осуществлять два регуляторных механизма действия. Таким образом, образовавшиеся комплексы «лиганд-рецептор» запускают либо геномный механизм регуляции – транс-активацию, либо внегеномный – транс-репрессию (Рисунок 3).



**Рисунок 3** - Механизмы действия глюкокортикоидов

Транс-активация представляет собой механизм действия ГР, при котором комплексы «лиганд-рецептор» формируют гомодимеры и могут транслоцироваться в ядро. Эти комплексы осуществляют регуляцию экспрессии генов посредством связывания со специфическими последовательностями в промоторных участках целевых генов – позитивными ГРЭ (глюкокортикоид-респонсивными элементами). В результате последующей активации транскрипции синтезируются противовоспалительные белки (IL-10, липокортин-1, агонист

рецепторов IL-1 и др.). Также ГК увеличивают синтез  $\beta_2$ -адренорецепторов, что приводит к возрастанию их количества в легких и повышению чувствительности к агонистам. Однако гомодимерные комплексы активируют также экспрессию про-воспалительных и антиапоптотических генов (IL-8, фактора некроза опухоли  $\alpha$ , *Bcl-xl*, *CIAP1,2*, сурвивина и др.) [91, 213]. Таким образом, непосредственное взаимодействие комплекса «лиганд-рецептор» с ДНК может являться причиной развития нежелательных побочных эффектов, которые будут описаны далее [101, 198].

Существует также механизм взаимодействия активированных комплексов «лиганд-рецептор» с другими транскрипционными факторами, инициаторами пролиферации, воспаления, клеточной адгезии (NF- $\kappa$ B, AP-1 и т.д.) – транс-репрессия. В результате такого белок-белкового взаимодействия осуществляется основной терапевтический эффект ГК: происходит ингибирование вышеупомянутых факторов, а также снижение транскрипционной активности других звеньев этих сигнальных путей, что приводит к гибели трансформированных клеток [165, 171].

Также транс-репрессия может осуществляться за счет связывания комплекса «лиганд-рецептор» с негативными ГРЭ. Такой тип связывания, в отличие от транс-активации, возможен при участии как димеров, так и мономеров ГР, что связано со структурой негативных ГРЭ. После связывания с негативными ГРЭ происходит снижение синтеза провоспалительных белков (фосфолипазы  $A_2$ , циклооксигеназы-2) и медиаторов воспаления – цитокинов (IL-1, IL-2, IL-3, фактор некроза опухоли  $\alpha$  и др.), а также молекул адгезии лейкоцитов и др. [198].

### **1.2.2. Роль глюкокортикоидов в терапии и их побочные эффекты**

Благодаря высокой биологической активности ГК применяют при терапии множества воспалительных и аутоиммунных заболеваний: ревматоидного артрита, бронхиальной астмы, туберкулеза, надпочечниковой недостаточности, офтальмологических заболеваний [26, 56, 57, 80, 190]. Также ГК играют важную роль в терапии ЗНО СК: ОЛЛ, множественной миеломы, лимфогранулематоза (ЛХ), ХМЛ и многих других [45, 112, 202]. Как было описано выше, их терапевтический эффект осуществляется за счет активации клеточных рецепторов, способных подавлять активность большого количества факторов транскрипции и воспаления, что ведет к снижению экспрессии провоспалительных и про-пролиферативных генов, за счет чего и достигается цитотоксический эффект ГК на трансформированные клетки кроветворной системы. Высокая биологическая активность ГК позволяет их применять не только при длительной терапии вышеперечисленных заболеваний, но и в экстренных случаях. Например, ГК



применяются в комплексе мер неотложной помощи: при шоке, коллапсе, острых аллергических реакциях, астматическом синдроме.

Термин «глюкокортикоиды» включает в себя не только природные соединения: кортизон и гидрокортизон, но их полусинтетические аналоги, такие как: дексаметазон, преднизон, бетаметазон и др. Было отмечено, что полусинтетические ГК, как правило, обладают более продолжительным временем полураспада, а, следовательно, и более высокой терапевтической активностью, чем природные. Это позволяет их применять в сниженных дозах, тем самым уменьшая вероятность развития системных побочных эффектов и резистентности. Однако полусинтетические ГК, так же, как и природные, обладают рядом побочных эффектов. В частности, одним из подобных осложнений приема ГК является снижение всасывания кальция в кишечнике, повышения резорбции его из костей и избыточного выведения кальция почками, в результате чего возможно развитие гипокальциемии или глюкокортикоидного остеопороза [54]. Как природные, так и полусинтетические ГК оказывают влияние на белковый обмен. Эти гормоны вызывают торможение синтеза белка, а также активируют его распад в тканях организма человека. Угнетение синтеза и ускорение катаболизма белков приводит к мышечной слабости, атрофии кожи и мышц, замедлению заживления ран, образованию стрий, а в детском и юношеском возрасте это может стать причиной задержки роста [181, 212]. При этом остеопороз также может быть вызван нарушением синтеза белкового каркаса кости вследствие потери кальция [48].

Препараты глюкокортикоидного ряда применяются в терапии большого количества заболеваний, и при длительном приеме они способны вызывать целый ряд нежелательных реакций [154]. Побочные эффекты, связанные с ГК, могут поражать различные системы органов. Возможны скелетно-мышечные, желудочно-кишечные, сердечно-сосудистые, эндокринные, психоневрологические, дерматологические, офтальмологические и иммунологические побочные эффекты. Было показано, что они могут возникать у 90% пациентов, принимающих ГК более 60 дней. Однако проявление таких реакций зависит не только от длительности приема препаратов, но и от дозы. Как правило, эти значения прямо пропорциональны, т.е. с увеличением длительности приема и доз риск появления побочных эффектов возрастает. Побочные эффекты могут проявляться и варьироваться также в зависимости от пути введения [59, 159].

Различным нарушениям, скелетно-мышечным, в частности, при длительной системной терапии ГК наиболее подвержены пациенты детского и юношеского возраста, у них наблюдается задержка роста и полового созревания [212]. Следует отметить, что развитие данных побочных эффектов может возникать даже у пациентов, получающих интраназальное или ингаляционное лечение ГК, например, при аллергическом рините или астме. Длительное применение ГК

приводит к повышенному риску развития остеопороза, поскольку эти стероидные гормоны вызывают потерю костной массы (до 12% в первые месяцы, далее 2-3% ежегодно) [214, 215].

Непосредственные эффекты ГК на процесс формирования костной ткани в значительной степени опосредованы индукцией гамма-рецептора 2 (PPAR $\gamma$ 2), активируемого пролифераторами пероксисом, и воздействием на сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин. Таким образом, ГК влияют на метаболизм в костной ткани несколькими путями:

1) ГК ингибируют образование костной ткани, способствуя дифференцировке плюрипотентных клеток-предшественников в адипоциты, а не в остеобласты, что приводит к уменьшению количества остеобластов и снижению их активности;

2) ГК вызывают снижение абсорбции Ca<sup>2+</sup> в желудочно-кишечном тракте и увеличение экскреции Ca<sup>2+</sup> с мочой;

3) снижают уровни половых гормонов посредством подавления надпочечников, обусловленным ГК;

4) повышенная экспрессия склеростина, который связывается с ко-рецепторами Lrp4 и Lrp5, приводит к ингибированию передачи сигналов Wnt, что, в свою очередь, влечет за собой снижение дифференцировки предшественников остеобластов в зрелые остеобласты и увеличение степени запуска апоптоза остеобластов и остеоцитов;

5) ГК оказывают подавляющее действие на гормон роста, инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF1) и трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ) [54, 181].

ГК оказывают катаболическое действие на скелетную мускулатуру, что при использовании высоких доз может привести к стероидной миопатии. Катаболические эффекты ГК на мышечную ткань опосредуются несколькими клеточными механизмами: эти гормоны подавляют захват глюкозы скелетными мышцами, что способствует расщеплению мышечных белков; ГК вызывают деградацию и подавляют синтез белка. Также было показано, что глутаминсинтетаза катализирует образование глутамина, который затем выводится из скелетных мышц в катаболических условиях. При атрофии мышц, индуцированной ГК, выведение глутамина составляет 25-30% от общего выведения белка из скелетных мышц. Остеопротегериновый лиганд (OPG-L) стимулирует дифференцировку остеокластов, увеличивает количество зрелых остеокластов и ингибирует их апоптоз, тем самым увеличивая пул активированных остеокластов. ГК повышают уровень мРНК OPG-L посредством механизма транс-активации. В свою очередь, ГК уменьшают уровни мРНК и белка OPG посредством механизма транс-репрессии. OPG-L и OPG способны взаимодействовать по принципу «лиганд-рецептор», предотвращая тем самым связывание OPG-L с клеточным рецептором остеокластов. Таким образом, биологический эффект OPG на костные клетки противоположен действию OPG-

L. Следовательно, ГК увеличивают соотношение OPG-L/OPG, таким образом способствуя резорбции кости за счет увеличения зрелых и активированных остеокластов [181].

Считается, что увеличение протеолиза в клетках мышечной ткани, в частности, за счет активации убиквитин-протеасомной и лизосомной систем, также играет важную роль в катаболическом действии ГК. Стимуляция ГК этих двух протеолитических систем опосредуется повышением экспрессии нескольких атрофогенов, таких как ген фактора транскрипции *FOXO*, *Atrogin-1* – ген белка F-box, специфичного для сердечных и скелетных мышц, и ген убиквитинлигазы *MuRF-1*. Также предполагается, что подавляющий эффект ГК на синтез мышечного белка является результатом ингибирования пути mTOR, связанного с изменениями экспрессии анаболического фактора роста мышц – инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1), и фактора катаболического роста мышц – миостатина [182]. Другими авторами было показано, что нокаут *Redd1* при применении ГК влияет не только на массу скелетных мышц, синтез белка и протеолиз, но и на сигнальный путь mTOR. При сравнении в базовых условиях мышей дикого типа (WT) и мышей с нокаутным геном *Redd1* масса и типология скелетных мышц не была изменена. Однако пероральное введение Dex посредством желудочного зонда в течение 7 дней служило причиной уменьшения размера и массы передней большеберцовой и икроножной мышц только у мышей WT. Также нокаут *Redd1* предотвращал ингибирование синтеза белка и активности mTORC1, наблюдаемое в икроножной мышце мышей WT после однократного введения Dex в течение 5 часов. Авторы предполагают, что *Redd1*-опосредованное ингибирование mTORC1 в скелетных мышцах не связано с модуляцией взаимодействия между комплексом туберозного склероза TSC2 и регуляторным белком 14-3-3. Предполагается, что, напротив, механизм, участвующий в запуске ингибирования mTORC1, связан с взаимодействием между REDD1, Akt и PRAS40, которое будет более подробно рассмотрено далее. Таким образом, было продемонстрировано, что ген *REDD1* необходим для ГК-индуцированного ингибирования синтеза белка посредством подавления mTORC1 [41].

Комплекс mTORC1 регулирует множество сигнальных путей, включая аутофагию, пролиферацию клеток и метаболизм. Также известно, что данный комплекс вовлечен в патогенез различных заболеваний, таких как ожирение, сердечно-сосудистые и онкологические заболевания. Костный гомеостаз поддерживается за счет действия резорбирующих костную ткань остеокластов и костеобразующих остеобластов. Дисбаланс в сложной регуляции остеокластов и остеобластов приводит к возникновению таких метаболических заболеваний костей, как остеопороз и остеопетроз. Было показано, что комплекс mTORC1 играет ключевую роль в регуляции резорбции и гомеостаза кости посредством изменения его экспрессии в остеокластах [96]. Другими авторами было продемонстрировано, что ГК вызывают аутофагию остеоцитов за счет подавления пути PI3K/Akt/mTOR. Интересно, что у трансгенных мышей *Ctsk*-

Cre, несущих ген рекомбиназы Cre, управляемый промоторами катепсина К Ctsk, нокаут в остеоцитах гена *Raptor*, белковый продукт которого является специфическим и важным компонентом mTORC1, привел к увеличению массы губчатой кости посредством ингибирования резорбции кости. Таким образом, подавление пути PI3K/Akt/mTOR в остеоцитах может предотвратить ГК-индуцированный остеопороз. Однако при нокауте *Raptor* у трансгенных мышей Lyz2-Cre, несущих ген рекомбиназы Cre, управляемый промотором лизоцима C-2 Lyz2, наблюдали уменьшение костной массы за счет увеличения дифференцировки остеокластов у мышей. Напротив, нокаут гена комплекса туберозного склероза 1 *Tsc1* у мышей Lyz2-Cre увеличивал костную массу и снижал резорбцию кости [105, 232]. Кроме того, нокаут *Tsc1* в гемопоэтических стволовых клетках у мышей Vav1-Cre (*Vav1* – протоонкоген, белковый продукт которого является членом семейства факторов обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF)) приводил к увеличению костной массы как следствие нарушения остеокластогенеза [96]. Также было показано, что система HIF-1 $\alpha$ /PDK1 предотвращает ГК-индуцированное остеогенное ингибирование остеобластов также посредством активации сигнального пути АКТ/mTOR [221].

К развитию дерматологических побочных эффектов может привести как местная, так и системная терапия ГК. К этому типу нежелательных реакций, индуцированных ГК терапией, относятся:

- атрофия эпидермиса и дермы, при этом возможна также атрофия подкожной клетчатки, что приводит к образованию стрий и нарушению заживления ран;
- гипертрихоз, обычно обратимый после прекращения терапии;
- развитие акне, преимущественно наблюдаемое у молодых пациентов;
- нарушение пигментации;
- развитие эритемы, и др.

Среди перечисленных дерматологических побочных эффектов, наиболее исследуемым является атрофия кожи. Ранее было показано, что основным компонентом фибрилл коллагена в коже является коллаген 1-го типа, составляющего 80%, а также коллагены 3-го типа (10-15%), 5-го (5%) и 4-го (базальная мембрана). Коллаген 1-го типа представляет собой гетеродимер, состоящий из 3-х  $\alpha$  цепей, кодируемых генами *COL1A1* и *COL1A2*. После местного лечения ГК было продемонстрировано снижение синтеза коллагена 1-го и 3-го типа как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Было показано, что существует консенсусная последовательность для связывания *Smad3* внутри промотора гена *COL1A2*. Этот сайт связывания необходим для полной индукции транскрипции *COL1A2* с помощью трансформирующего фактора роста TGF- $\beta$ . Также было продемонстрировано, что ГР взаимодействует с доменом активации *Smad3 in vitro* и *in vivo* таким образом, что прямое белок-белковое взаимодействие между ГР и *Smad3* может опосредовать подавление экспрессии гена *COL1A2*. Кроме того, стабильность мРНК

проколлагена снижается при обработке ГК. Дальнейшее воздействие ГК на кожу заключается в снижении синтеза эпидермальных липидов, а также в увеличении трансэпидермальной потери воды [181].

В отделе химического канцерогенеза «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» было показано, что повышение экспрессии *REDD1* при длительной обработке стероидами лежит в основе реализации ряда ГК-обусловленных побочных эффектов. В частности, при длительной обработке ГК кожного покрова мышей наблюдали развитие стероид-индуцированной атрофии, которое было сопровождено значительным повышением экспрессии *Redd1*. Более того, в дальнейших исследованиях было показано, что у мышей с нокаутированным геном *Redd1* не последовало развития ГК-опосредованной атрофии кожного покрова, в то время как терапевтические эффекты ГК были сохранены в полном объеме [32]. Более того, в исследованиях, направленных на изучение полового диморфизма атрофических эффектов при применении местных ГК, было обнаружено, что самки мышей более подвержены развитию атрофии кожи, при этом и самцы, и самки были одинаково чувствительны к противовоспалительному эффекту ГК в тесте на отек уха [31].

Нарушение заживления ран после системного лечения ГК также является распространенным побочным эффектом. Применение ГК в области раны подавляет экспрессию коллагена 1-го типа. Кроме того, ГК участвуют в регуляции провоспалительных цитокинов, факторов роста, белков и протеаз матрикса, что также оказывает влияние на заживление ран. Было показано, что дексаметазон подавляет экспрессию гена *COL7A1*. Коллаген 7-го типа представляет собой основной коллагеновый компонент закрепляющих (анкерных) фибрилл. Эти структуры необходимы для функциональной целостности дермоэпидермального соединения. Различные нарушения в таких структурах прикрепления могут привести к ухудшению заживления ран [90, 181].

ГК оказывают влияние на углеводный обмен, они стимулируют ферменты глюконеогенеза в печени, мобилизуют и разрушают белки, а также индуцируют отложение гликогена в печени. Терапия ГК связана с риском гипергликемии у пациентов, таким образом, возможна как индукция, так и обострение диабета (ухудшение гликемического контроля). Избыток ГК вызывает как снижение выработки инсулина  $\beta$ -клетками, так и резистентность к инсулину, то есть снижение эффективности инсулина в подавлении продукции глюкозы в печени и в увеличении поглощения глюкозы мышечной и жировой тканью. Считается, что ГК как часть стандартной терапии после трансплантации органов являются причиной развития посттрансплантационного сахарного диабета (ПТСД). Было обнаружено, что у пациентов с трансплантацией почки, получавших преднизолон, происходило развитие ПТСД примерно в 40% случаев [153].

Промотор гена *TAT*, кодирующий печеночный фермент глюконеогенеза - тирозинаминотрансферазу, содержит ГРЭ, содержащие сайты связывания для ГР и других факторов транскрипции [174]. Промотор гена *G6Pase*, глюкозо-6-фосфатазы, катализирующей еще один важный этап глюконеогенеза, также содержит ГРЭ, что указывает на индукцию транскрипции гена с помощью активированных ГР и приводит к увеличению скорости глюконеогенеза [227]. Таким образом, механизм транс-активации влияет на метаболизм глюкозы и запасы гликогена. Следовательно, большинство эффектов, ведущих к повышенному синтезу глюкозы, опосредованы увеличенной транскрипцией генов ферментов, участвующих в глюконеогенезе.

Наиболее частые эффекты длительного лечения ГК влияют на ГГНС и вызывают нарушения, такие как: синдром Иценко-Кушинга, надпочечниковая недостаточность и др. Дополнительная проблема подавления ГГНС представляет собой снижение общей продукции стероидных гормонов из-за снижения уровня АКТГ, что способствует развитию других побочных эффектов, таких как гипогонадизм и остеопороз. После длительной терапии ГК (более 1 года) надпочечниковая недостаточность развивается в 100% случаев, даже после более короткого курса лечения ГК (~8 дней) у 45% пациентов наблюдали надпочечниковую недостаточность, которая была сохранена от 2 дней до более чем 3 месяцев [95]. Длительное подавление уровня АКТГ приводит к атрофии коры надпочечников и вторичной надпочечниковой недостаточности [88].

Гипертензия, нарушение обмена холестерина и снижение фибринолитического потенциала являются основными побочными эффектами ГК на сердечно-сосудистую систему. Эти побочные эффекты со стороны сердечно-сосудистой системы опосредованы рецептором минералокортикоидов (MR) или ГР. ГК увеличивают количество натриевых каналов и их активность за счет ГК-индуцируемых киназ. Натриевые каналы отвечают за трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$  в протоках почек, в эпителии дыхательных путей, а также в потовых и слюнных железах [180]. Было показано, что дексаметазон увеличивает экспрессию мРНК гена кальциевых каналов  $\alpha$ -*ENaC* [196].

В нескольких исследованиях рассматривали важную роль ГК в эритропоэзе. Известно, что высокие уровни ГК вызывают полицитемию, а эритроцитоз может быть первым проявлением у пациентов с синдромом Иценко-Кушинга. Действуя совместно с эритропоэтином и фактором стволовых клеток, считается, что ГК способствуют пролиферации эритробластов, вызывая остановку созревания и, тем самым, увеличивая клеточную продукцию эритропоэза. Также было показано, что мыши, несущие мутации в ГР, нарушающие димеризацию комплекса «лиганд-рецептор», неспособны увеличивать продукцию эритроцитов в ответ на гипоксию [201]. В исследовании на мышинной модели хронического сдерживающего стресса (RST) были

обнаружены маркеры ранней экспансии эритроцитов с участием ГР. Кроме того, у животных, подвергшихся воздействию RST, было повышенное количество циркулирующих ретикулоцитов и повышенный эритропоэз в первичных и вторичных эритроидных тканях по сравнению с контрольной группой. Мыши также показали увеличение популяций эритроидных предшественников и повышенную экспрессию эритроидного фактора транскрипции *Klf1*. Таким образом, психологический стресс, стимулируя выработку ГК, влияет на гомеостаз эритроидов [208].

Препараты стероидных гормонов используют в терапии гипопролиферативной анемии, в частности, наследственного синдрома недостаточности костного мозга. Проблема длительной терапии ГК заключается в том, что пациенты становятся невосприимчивыми к лечению, и, следовательно, зависимыми от переливаний эритроцитов, в том случае, если они не достигают ремиссии, или им не проводят трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Однако конкретные механизмы действия ГК в эритроидной системе как у здоровых людей, так и у пациентов с анемией малоизучены. Несколько исследований продемонстрировали, что ГК действуют на уровне эритроидных клеток-предшественников, но точные этапы эритроидной дифференцировки остаются недостаточно ясными. Авторами было показано, что обработка Dex предшественников CD34<sup>+</sup> из периферической крови привела к специфической активации ингибитора циклин-зависимой киназы *Cip/Kip* – p57<sup>Kip2</sup>; при этом shRNA-опосредованное подавление p57<sup>Kip2</sup> значительно ослабляло влияние Dex на дифференцировку эритроидов и подавляло рост незрелой субпопуляции эритроидных колониеобразующих клеток [28].

Побочные эффекты на желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), вызванные ГК, включают пептические язвы, кровотечение из верхних отделов ЖКТ, панкреатит и кандидоз полости рта после ингаляционного применения. Было показано, что ГК увеличивают секрецию желудочного сока, уменьшают выделение желудочной слизи, вызывают увеличение выработки гастрина, гиперплазию париетальных клеток и замедляют заживление язв [173].

Поскольку в ходе терапии осуществляется противовоспалительное и иммуносупрессивное действие ГК, еще одним побочным эффектом является повышенный риск развития всех видов инфекции. Более того, из-за иммуносупрессии могут отсутствовать симптомы инфекции, что препятствует своевременной диагностике заболевания. Кроме того, лечение ГК может значительно повысить риск инфицирования в ситуациях, уже характеризующихся сниженным иммунным потенциалом. Например, повышенный риск неонатальных и материнских инфекций после дородового лечения ГК для профилактики хронических заболеваний легких [209].

После системного и/или местного применения ГК были продемонстрированы офтальмологические побочные эффекты. К ним относятся развитие катаракты и глаукомы. ГК

относятся к наиболее часто используемым лекарственным препаратам в офтальмологии. Они применяются при конъюнктивите, кератите, а также при послеоперационном ведении пациентов после оперативного лечения катаракты и трансплантации роговицы. Механизмы, которые участвуют в развитии катаракты, включают повышенный уровень глюкозы, вызванный повышенной скоростью глюконеогенеза; ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы; повышенную катионную проницаемость клеточной мембраны; ингибирование глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы; подавление синтеза РНК; потеря АТФ; и ковалентное связывание стероидов с белками хрусталика. Применение ГК также связано с высокой частотой развития глазной гипертонии, увеличивающей риск развития глаукомы, посредством морфологического и функционального изменения трабекулярной сети [116, 181].

При терапии ГК могут усугубиться психические заболевания. Однако перепады настроения, эйфория, депрессия и «стероидные психозы» также могут возникать у ранее стабильных людей. Психиатрические симптомы чаще встречается у женщин. Нарушения функции ГГНС, а также нарушение регуляции системы серотонина вовлечены в нейروпсихиатрические расстройства, вызванные повышенным уровнем ГК. Подавление экспрессии гена рецептора системы регуляции серотонина *5-HT1A* с помощью ГК может быть причиной развития депрессии. В промоторе гена рецептора *5-HT1A* были идентифицированы респонсивные элементы NF-kB. В свою очередь, опосредованная NF-kB индукция транскрипции генов ингибируется ГК [217].

Однако сложности в применении ГК заключаются не только в возникновении различных побочных реакций, но и в развитии резистентности. Проявление устойчивости к препаратам может быть обусловлено различными факторами, например, мутациями в гене ГР, изменением соотношения между экспрессией транскрипционных и трансляционных изоформ ГР, нарушением механизма отрицательной обратной связи через ГГНС, изменением экспрессии/активности белков-шаперонов, ко-репрессоров и ко-активаторов и др. Однако опухолевые клетки могут не только приобретать данные свойства в процессе терапии, но и обладать ими изначально. Было показано, что мутация по типу SNP, заключающаяся в замене Asp на Val в 641 позиции изоформы  $\alpha$ , была причиной снижения аффинности к ГК, а также нарушения транслокации в ядро и общей нестабильности [102].

Широкий спектр действия ГК значительно осложнен не менее широким спектром побочных эффектов. Благодаря исследованиям, ориентированным на изучение механизмов действия этих стероидных гормонов на ГК-опосредованные сигнальные пути, становится возможным поиск новых препаратов, позволяющих минимизировать риски развития нежелательных реакций со стороны различных систем организма.



### 1.3. Ген *REDD1* как основной ген, индуцируемый глюкокортикоид-зависимой транс-активацией

Один из ГК-зависимых генов – ген *REDD1* (*Regulated in Development and DNA Damage response 1*) локализован на 10 хромосоме (10q), также известный как *DDIT4* (DNA Damage Inducible Transcript 4) и являющийся гомологом генов *scylla* и *charybdis* у дрозофилы, *Rtp801* у крысы и *Dig2* у мыши, белковый продукт которого способен ингибировать сигнальный путь mTOR.

Данный ген был обнаружен группами ученых, которые провели скрининг регулируемых гипоксией генов в клетках глиомы крысы С6 и идентифицировали ген, названный *RTP801*, участвующий в регуляции образования активных форм кислорода (АФК) и активируемый в ответ на фактор, индуцируемый гипоксией 1 Hif-1. Одновременно другая группа исследователей клонировала ген, индуцированный после повреждения ДНК и во время эмбриогенеза. Этот ген, соответствующий которому белок участвовал в регуляции АФК, был альтернативно назван *REDD1* [71]. Позже был обнаружен индуцированный дексаметазоном ген 2 *Dig2* – мышинный гомолог *Redd1/Rtp801* в анализе микроматриц из Т-клеток мышинной лимфомы, обработанных Dex [211].

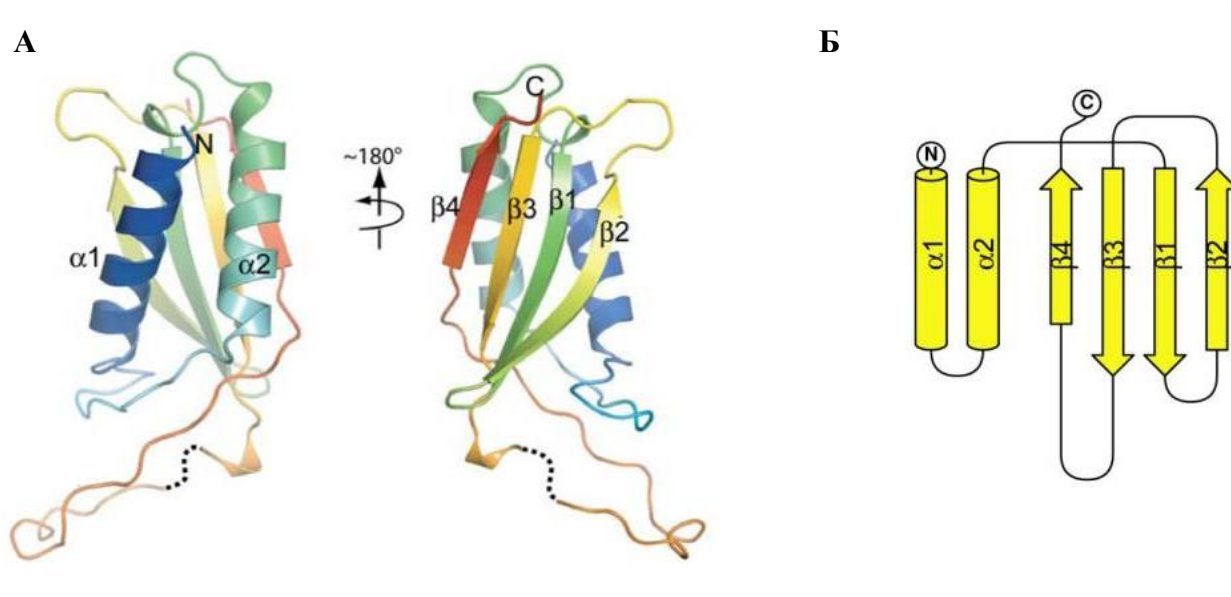
Дальнейшие исследования показали, что ген *REDD1* – быстро активируемый ген, а его экспрессия является стресс-индуцированной и возникает при множественных клеточных стрессах, в частности, в ответ на повреждение ДНК, гипоксию, тепловой шок, ионизирующее излучение, недостаток питательных веществ [71, 187, 193]. Более того, экспрессия *REDD1* повышается под воздействием различных химических веществ, таких как дофаминергические нейротоксины, б-гидроксидофамин, изофлавоноид ротенон, индукторы стресса эндоплазматического ретикула туникамицин и тапсигаргин, ДНК-повреждающие агенты этопозид и арсенит [47].

Белковый продукт гена *REDD1* состоит из 232 аминокислот и повсеместно синтезируется на низком уровне во многих тканях взрослого человека. Он был обнаружен в цитозоле, ядре, плазматической мембране, аутолизосоме или компартментах митохондрий. Также было показано, что данный белок частично локализован во фракции мембран эндоплазматического ретикула (ЭР), ассоциированного с митохондриями (МАМ), но при этом не был обнаружен в митохондриях клеток скелетных мышц [42].

Структурный анализ *REDD1* привел к лучшему пониманию функциональных доменов в белке, которые опосредуют его репрессивное действие на mTORC1. Этот анализ показал, что делеция коротких отрезков аминокислот в двух сегментах *REDD1*, включающих аминокислоты 85–193 и 207–225, полностью предотвращает *REDD1*-опосредованное ингибирование mTORC1.

Анализ кристаллической структуры аминокислот 89–226 REDD1 показал, что эта часть белка сворачивается в две  $\alpha$ -спирали, расположенные напротив четырех  $\beta$ -листов, причем  $\beta$ -листы 1–3 образуют редкий структурный мотив, называемый  $\psi$ i-петлей. Интересно, что поиск в базе данных не смог идентифицировать другие белки с такой структурой, что позволяет предположить, что топология REDD1 уникальна (Рисунок 4). Картирование консервативных остатков в кристаллической структуре выявило два сегмента белка, состоящих из аминокислот 85–193 и 207–225, которые не являются смежными в первичной последовательности, но являются смежными в трехмерной структуре. Консервативные мутации отдельных аминокислот в этих областях, например, изменение Cys<sup>140</sup> на Ser, незначительно нарушали репрессивные эффекты REDD1 на mTORC1, в то время как менее консервативные мутации, например, замена Lys<sup>219</sup> и Tyr<sup>222</sup> на Ala, полностью предотвращали его репрессивные действия [205].

Ключевая функция REDD1 – способность ингибировать сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR, а конкретно комплекс mTORC1, включающий в себя помимо mTOR дополнительные белки: Raptor – регуляторный белок, ассоциированный с mTOR, mLST8 – мишень комплекса рапамицина (Rapa) субъединица LST8, и PRAS40 – богатый пролином субстрат Akt 40 кДа [43, 55]. (Более подробно механизм действия REDD1 описан далее в разделе 1.3.1.) REDD1 способен выполнять двойную роль в зависимости от условий: в пролиферирующих недифференцированных клетках он является антиапоптотическим, а в неделящихся дифференцированных клетках, таких как нейроны, REDD1 является проапоптотическим [137, 187, 234]. Было продемонстрировано, что при исследовании кортикального нейрогенеза крыс, где REDD1 контролировал пролиферацию нейропрогениторов (предшественников нейронов) и дифференцировку нейронов, в корковых нейропрогениторах, экспрессия данного гена была повышена. Напротив, новые и зрелые нейроны показали более низкие уровни *REDD1*. И, если повышение уровня экспрессии *REDD1* было сохранено в этих дифференцирующихся нейронах, оно становилось проапоптотическим [136].



Пунктирная линия представляет неупорядоченную область (А); топологическая схема белка REDD1 (Б) [205]

**Рисунок 4** – Структура белка REDD1 (89-226 а.о.)

Разнообразие факторов, влияющих на уровень экспрессии *REDD1*, условно делят на 3 группы:

1) Физиологическая и циркадная регуляция метаболизма.

В эту группу входят факторы гормональной стимуляции, такие как: ГК, тестостерон, эстроген, инсулиноподобный фактор роста-1, инсулин, альдостерон. Известно, что ген *REDD1* является важным регулятором гомеостаза организма. Было показано, что *REDD1* участвует в контроле циркадного ритма, а именно: экспрессия гена циркадных ритмов *Per1* модулируется посредством взаимодействия ГК и REDD1 в скелетных мышцах в ответ на стрессовые факторы, которыми были активные аэробные упражнения [178].

2) Умеренные энергетические стрессы.

Вторая группа факторов, которые индуцируют экспрессию *REDD1*, включает умеренные энергетические стрессы, вызванные гипоксией, голоданием, депривацией глюкозы, физическими упражнениями на выносливость, катехоламинами, передачей сигналов кальций/кальциневрин. Быстрое увеличение экспрессии *REDD1* в этих условиях свидетельствует о том, что этот ген важен для поддержания энергетического гомеостаза клетки во время метаболических изменений.

3) Критические метаболические изменения.

Наконец, экспрессия *REDD1* индуцируется под воздействием арсенита, алкоголя, избыточного производства АФК, повреждением ДНК, хроническим воспалением, стрессом эндоплазматического ретикулума. При воздействии данных факторов экспрессия *REDD1* может способствовать гибели клеток [42].

Интересно, что *REDD1* имеет гомолог – ген *REDD2* (также известного как *DDIT4L*, *RTP801L* или *SMHS1*). Его белковый продукт представляет собой консервативный белок, имеющий 65% сходства с аминокислотной последовательностью *REDD1*. *REDD2* также подавляет mTORC1 и пролиферацию, активируя аутофагию. Однако базальная экспрессия *REDD1* и *REDD2* варьируется в зависимости от ткани, и их индукция часто зависит от различных стимулов. Например, *REDD1* высоко экспрессируется в клетках печени и желудке, в то время как экспрессия *REDD2* в базовых условиях более повышена в скелетных и сердечных мышцах. В отличие от *REDD1*, экспрессия *REDD2* не является стресс-индуцированной и не возникает в ответ на такие факторы как: гипоксия или ГК. Экспрессия *REDD2*, по-видимому, индуцируется во время снижения мышечной активности (иммобилизация, денервация и постельный режим) и потери функции нейронов (повреждение аксона). *REDD2* может способствовать клеточной атрофии неактивных или поврежденных клеток. Однако современные знания о функции *REDD2* остаются недостаточными и нуждаются в дальнейших исследованиях его физиологической роли [42].

### 1.3.1. Механизм действия *REDD1* как ингибитора сигнального пути PI3K/Akt/mTOR

Как было упомянуто ранее, лучше всего охарактеризованная функция *REDD1* – ингибирование комплекса mTORC1. Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR играет важную роль в выживании, пролиферации, ангиогенезе, метастазировании и др. [73]. Охарактеризовано влияние данного сигнального пути на прогрессию различных ЗНО, таких как рак желудка, рак яичников, различных ЗНО СК и др. [36, 70, 77, 222].

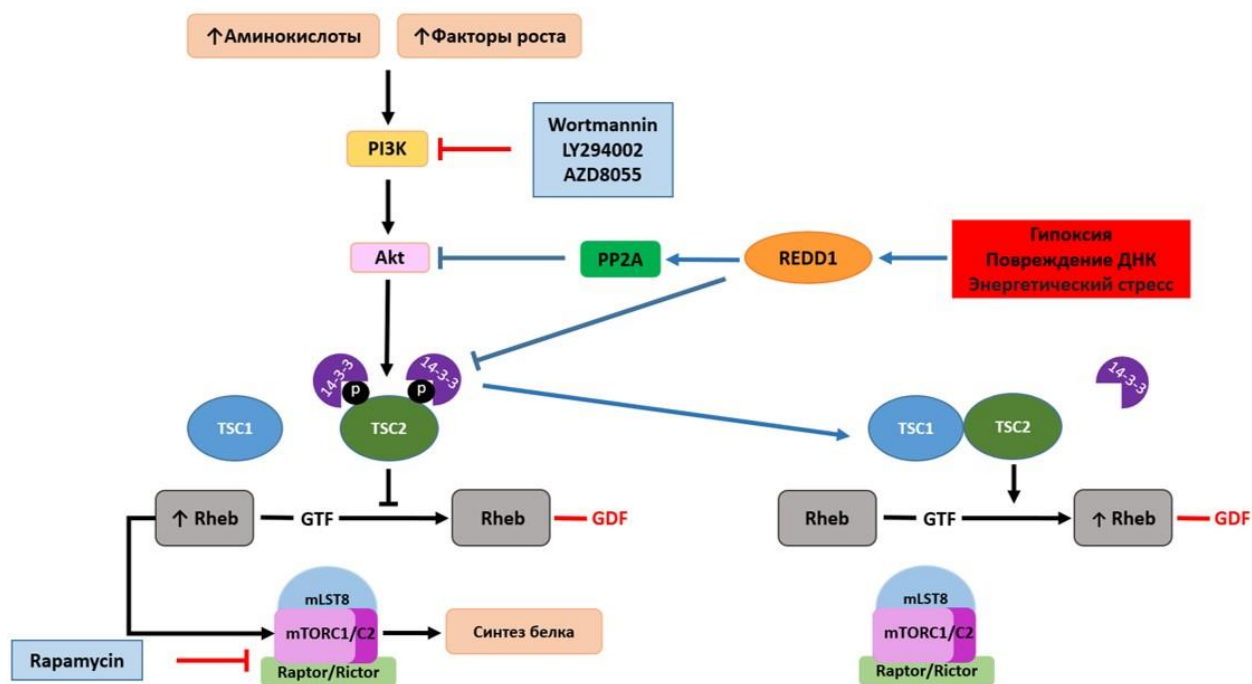
Известно, что ассоциированный с мембраной комплекс TSC1/TSC2 связывается с ГТФазой Rheb (*Ras homolog enriched in brain*), являющейся специфическим стимулятором mTOR, и действует как белок-активатор ГТФазной активности, инактивируя мембранную передачу сигналов Rheb путем стимуляции гидролиза ГТФ до ГДФ [12, 46]. (Рисунок 5) Однако в присутствии ростовых факторов происходит активация Akt (протеинкиназы B), которая в свою очередь фосфорилирует TSC2 по двум остаткам Ser<sup>939</sup> и Ser<sup>981</sup>. Предполагается, что в ответ на вышеупомянутое фосфорилирование посредством Akt белки 14-3-3 изолируют TSC2 в цитозоле. Таким образом, связывание TSC2/14-3-3 дестабилизирует TSC2 и нарушает его взаимодействие с TSC1. Дефицит ассоциированного с мембраной TSC2 приводит к накоплению Rheb, связанного с ГТФ, что приводит к усилению передачи сигналов mTOR, и, следовательно, активации клеточной пролиферации, синтеза белка и т.д. [46, 66, 106].

Было продемонстрировано, что *REDD1* необходим для ингибирования mTORC1 во время гипоксии через TSC2-зависимый механизм [43]. В нескольких исследованиях также было

продемонстрировано, что REDD1 активирует TSC2 в нейронах и фибробластах [43, 137, 193]. На основании этих наблюдений было высказано предположение, что REDD1 способствует дальнейшему взаимодействию TSC1/TSC2, высвобождая TSC2 из комплекса с 14-3-3 [66].

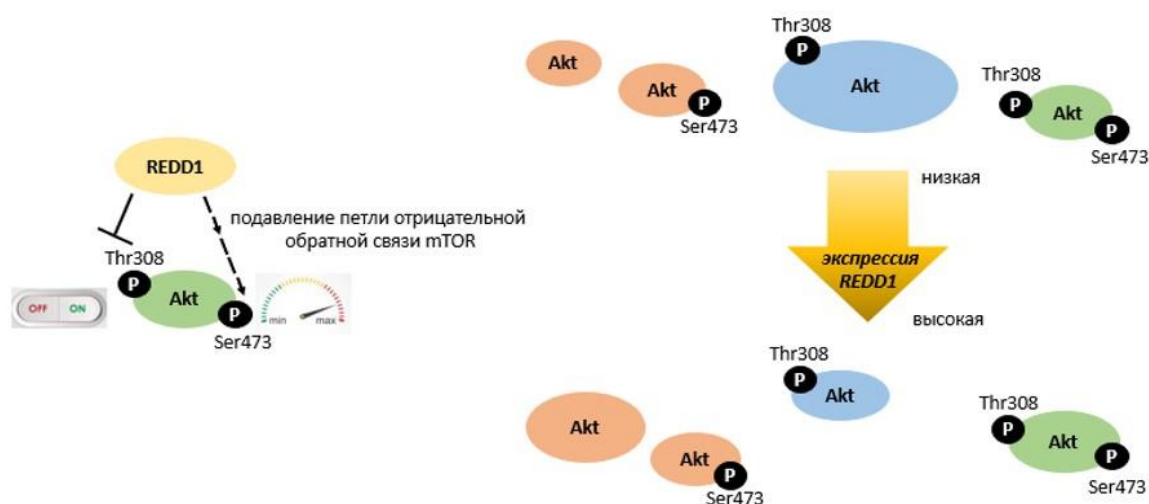
Авторами была предложена гипотеза о том, что REDD1 напрямую связывает 14-3-3, приводя к разрушению комплекса TSC2/14-3-3 [42]. Это предположение было подтверждено другими исследованиями, в которых наблюдали образование комплекса REDD1/14-3-3 или снижение взаимодействия TSC2/14-3-3, связанного с ингибированием mTORC1 [78, 161]. Однако по результатам кристаллографического анализа белка REDD1 стало известно, что связывание с 14-3-3 маловероятно без изменения структуры белка REDD1. Расположение консенсусного связывающего фрагмента 14-3-3 в последовательности REDD1 имеет часть  $\alpha$ -спирали и последующей петлевой структуры, что означает, что REDD1 должен претерпеть значительные конформационные изменения, чтобы связываться с этим участком [205]. Таким образом, вопрос о потенциальном влиянии экспрессии *REDD1* на другие белки, взаимодействующие с 14-3-3, такие как PRAS40, FOXOs, AS160 и др., является актуальным.

Другими исследователями была предложена альтернативная модель REDD1-зависимого ингибирования mTORC1 [65]. Ими было продемонстрировано, что REDD1 взаимодействует с серин-треониновой протеинфосфатазой 2A PP2A в эмбриональных фибробластах мыши (ЭФМ), приводя к частичному ингибированию Akt посредством его дефосфорилирования по Thr<sup>308</sup> (Рисунок 5).



**Рисунок 5** – Механизм действия REDD1 в качестве ингибитора сигнального пути mTOR (адаптировано из [46, 131])

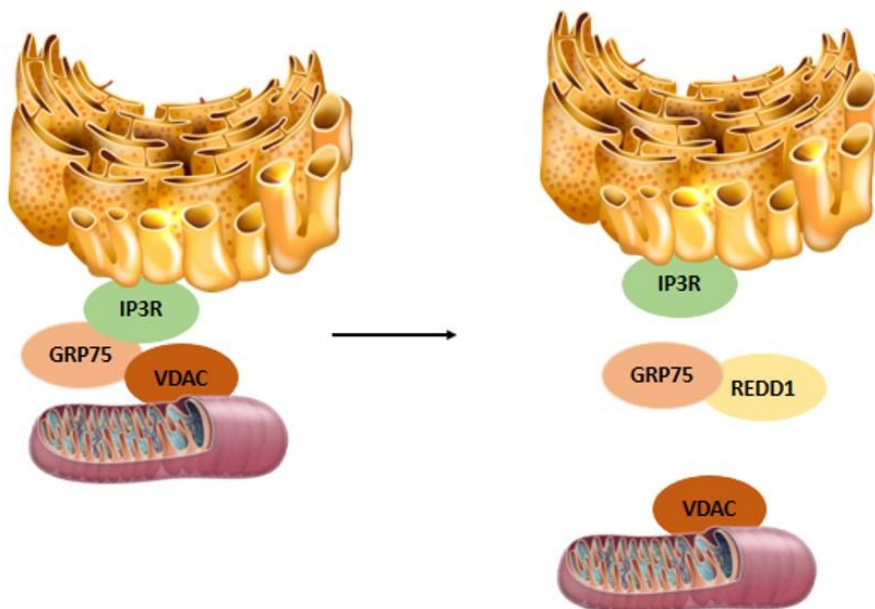
Полная активация Akt требует фосфорилирования по Thr<sup>308</sup> и Ser<sup>473</sup>, а также его транспортировку к плазматической мембране. Фосфорилирование Akt по Thr<sup>308</sup> необходимо для его внутренней ферментативной киназной активности, а фосфорилирование по Ser<sup>473</sup> с помощью mTORC2 усиливает активность киназы Akt для других субстратов (киназа гликогенсинтазы 3 GSK3, FOXO1, TSC2 и циклин-зависимая киназа CDKN1B (p27)). Напротив, субстраты Akt, такие как PRAS40 или гексокиназа II, по-видимому, менее чувствительны к фосфорилированию Ser<sup>473</sup> и в основном зависят от фосфо-Thr<sup>308</sup>. Поскольку REDD1 специфически ингибирует Akt путем дефосфорилирования Thr<sup>308</sup> в ЭФМ и скелетных мышцах, он, следовательно, должен иметь аналогичное влияние на все мишени Akt. Однако ингибирование фосфорилирования Akt по Thr<sup>308</sup> может управлять подавлением петли отрицательной обратной связи mTORC1/S6(S6K1) по субстрату рецептора инсулина 1 IRS1. Поскольку IRS1 запускает активацию путей фосфатидинозитол-3-киназы PI3K/Akt и PI3K/mTORC2, снижение фосфорилирования по Thr<sup>308</sup> может привести к избыточному фосфорилированию Akt по Ser<sup>473</sup>. И, наконец, увеличение фосфорилирования Ser<sup>473</sup> может обеспечивать активность Akt [42] (Рисунок 6). Ингибирование Akt посредством REDD1 может варьироваться в зависимости от типа клеток. Фактически, в нейронах экспрессия *REDD1* подавляет фосфорилирование Akt как по остаткам Ser<sup>473</sup>, так и по Thr<sup>308</sup>[135].



**Рисунок 6** – Влияние REDD1 на фосфорилирование Akt; синий - пул активных Akt красный - пул неактивных и зеленый - гиперактивных Akt (адаптировано из [42])

Известно, что активация сигнального пути Akt/mTOR инсулином влечет за собой индукцию МАМ [203]. МАМ имеют решающее значение для регуляции системы окислительного фосфорилирования митохондрий ОХРНОС через перенос Ca<sup>2+</sup> из ЭР посредством белкового комплекса, образованного рецептором инозитолтрифосфата IP3R, белком, регулируемым глюкозой 75 GRP75 и потенциал-зависимым анионным каналом 1 VDAC1. IP3R необходим для

активации сигнального пути Akt/mTOR в ответ на  $\text{Ca}^{2+}$  и АТФ в клетках мышечной ткани. Было также показано, что REDD1 может связываться с GRP75 и снижать количество МАМ в мышцах. Таким образом, REDD1 может нарушать МАМ посредством связывания с GRP75, что приводит к ингибированию сигнального пути Akt/mTOR [42] (Рисунок 7).



**Рисунок 7** – Механизм ингибирования МАМ (адаптировано из [42])

### 1.3.2. Роль REDD1 в патогенезе различных заболеваний

Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR играет важную роль в поддержании гомеостаза клетки путем контроля как анаболических, так и катаболических процессов. Нарушение регуляции данного сигнального пути зачастую ведет к развитию различных заболеваний, таким образом, изменение экспрессии *REDD1* может вносить вклад в их патогенез. Ниже будут рассмотрены патологические процессы, влияние на развитие которых может оказывать REDD1.

#### 1) Онкологические заболевания

Ген *REDD1* играет важную роль в развитии различных ЗНО. В раковых клетках с низкой базальной экспрессией *REDD1* его индукция некоторыми фармакологическими препаратами снижает рост и пролиферацию клеток. Напротив, высокая базальная экспрессия *REDD1* связана с плохим прогнозом при различных злокачественных новообразованиях толстой кишки, кожи, легких, плоскоклеточной карциномы полости рта (ПКПР), рака молочной железы, миелолейкоза и глиобластомы [234]. Также было продемонстрировано, что повышение экспрессии *REDD1* связано с резистентностью к терапии при раке яичников, желудка и тройном негативном раке молочной железы. Кроме того, повышение уровня белка REDD1 связано с устойчивостью к ионизирующему излучению мезенхимальных стромальных клеток костного мозга [42]. В

исследованиях *in vivo* было показано, что нокаут *REDD1* увеличивает пролиферацию иммортализованных эмбриональных фибробластов в опухоли, имплантированной мышам Nude (Nu/Nu) [99].

В исследовании, направленном на изучение экспрессии *REDD1* при ПКПР, было обнаружено, что экспрессия данного гена была значительно выше в тканях ПКПР по сравнению с перитуморальными тканями слизистой оболочки. Кроме того, результаты ИГХ также показали, что экспрессия *REDD1* была выше в тканях ПКПР по сравнению с околоопухолевыми тканями. Кроме того, повышение экспрессии *REDD1* было связано с более поздней стадией заболевания, более слабой дифференцировкой опухоли, лимфатическими метастазами и рецидивом опухоли. Кроме того, гиперэкспрессия *REDD1* коррелировала с плотностью микрососудов. Также результаты анализа продемонстрировали значительное снижение выживаемости у пациентов с ПКПР и высокой экспрессией *REDD1* [79].

Некоторые опухолевые клетки плохо васкуляризированы и часто подвергаются гипоксии. В этом случае выживаемость данных клеток зависит от их способности обеспечивать энергетический гомеостаз в условиях гипоксического стресса. Интересно, что гиперэкспрессия *REDD1* защищает клетки глиобластомы от кислородного голодания. Также повышенная экспрессия *REDD1* способствует выживанию клеток рака поджелудочной железы и колоректального в условиях гипоксии, что приводит к росту опухоли. Помимо своей метаболической роли, *REDD1* также способствует стабилизации фактора, индуцируемого гипоксией, HIF-1 $\alpha$ . В клетках рака легких экспрессия *REDD1* ингибирует петлю отрицательной обратной связи mTORC1/S6K1 на IRS1/PI3K/mTORC2/Akt, тем самым способствуя выживанию клеток. *REDD1* также может быть ответственным за метастазирование и инвазию опухоли. Поскольку в опухолевых тканях макрофаги участвуют в формировании кровеносных и лимфатических сосудов, инвазии и дистального распространения опухолевых клеток, а также в подавлении иммунитета, то повышенная экспрессия *REDD1* в гипоксических макрофагах, связанных с опухолью, снижает их потребление глюкозы и высвобождает энергетические субстраты для других клеток. Повышенная доступность глюкозы стимулирует зависящую от эндотелиальных клеток васкуляризацию, что приводит к увеличению диаметра сосудов и их проницаемости. Этот процесс позволяет опухолевым клеткам проникать в кровоток и способствует метастазированию. Напротив, нокаут *REDD1* в макрофагах увеличивает поток глюкозы для их энергетического метаболизма и снижает доступность субстрата для эндотелиальных клеток. Таким образом, в условиях энергетической конкуренции эндотелиальные клетки сохраняют свою барьерную функцию и остаются непроницаемыми для опухолевых клеток [42, 139].



Джин и др. показали, что в клетках рака легкого конститутивная гиперэкспрессия *REDD1* индуцировала повышение уровня HSP27 и HSP70. Ингибирование HSP27 или HSP70 подавляло фосфорилирование Akt, которое было индуцировано конститутивной гиперэкспрессией *REDD1* и усиливало ингибирующие эффекты на жизнеспособность клеток. Таким образом, HSP и Akt в клетках с повышенным уровнем *REDD1* положительно регулируют функцию и экспрессию друг друга и участвуют в выживании клеток при ЗНО. Авторами было показано, что нокаунт HSP27, HSP70 или AKT усиливал чувствительность клеток к ионизирующему излучению, особенно в клетках рака легкого со стабильно высокой экспрессией *REDD1*. В совокупности, по мнению исследователей, эти данные демонстрируют, что ген *REDD1* может использоваться в качестве терапевтической мишени для вышеупомянутой нозологии [110].

ЗНО человека с активирующими мутациями *RAS* обычно очень агрессивны и не поддаются лечению, однако самой мутации в гене *RAS* недостаточно для онкогенеза. Авторы продемонстрировали, что нокаунт *REDD1* достаточен для перепрограммирования метаболизма липидов и стимулирования прогрессирования *RAS*-мутантного ЗНО. Нокаунт *REDD1* у мышей с *KRAS*-зависимой аденокарциномой поджелудочной железы и легких превращает пренеопластические поражения в инвазивные и метастатические карциномы. Метаболическое профилирование показывает, что *REDD1*-нокаунтные/*RAS*-мутантные клетки демонстрируют повышенное поглощение лизофосфолипидов и накопление липидов в сочетании с усиленным окислением жирных кислот, которое поддерживает как уровни АТФ, так и НАДФН, необходимый для нейтрализации АФК. *REDD1* может способствовать выживанию и метастазированию опухолевых клеток в гипоксической среде, а также повышать устойчивость к химиотерапии или ионизирующему излучению за счет снижения потребления энергии [170].

Как было описано ранее (см. стр. 12), онкогенные вирусы играют важную роль в этиологии различных заболеваний. Онкогенные ВПЧ тесно связаны со ЗНО человека, включая рак шейки матки, опухолей головы и шеи. Известно, что ВПЧ-положительные опухолевые клетки находятся в процессе конкуренции, в результате которой происходит отбор наиболее жизнеспособных клеток для дальнейшей экспрессии вирусных онкогенов E6/E7, а также что их внутриклеточные уровни p53 восстанавливаются при репрессии E6/E7, а ингибирование данных генов фенотипически приводит к клеточному старению. Авторы продемонстрировали, что гипоксические состояния, которые часто встречаются при раке шейки матки, опухолях головы и шеи, позволяют ВПЧ-положительным опухолевым клеткам ускользать от этих регуляторных принципов: E6/E7 эффективно подавляется, но уровни p53 не повышаются. Более того, репрессия E6/E7 в условиях гипоксии не приводит к клеточному старению из-за связанного с гипоксией нарушения сигнального пути *REDD1/TSC2*. Вместо этого индуцируется обратимое ингибирование пролиферации, которое можно преодолеть путем реоксигенации. Нарушение

передачи сигналов mTOR также влияет на реакцию старения гипоксических ВПЧ-положительных опухолевых клеток при химиотерапии *in vitro*. В совокупности эти результаты показывают, что гипоксические ВПЧ-положительные опухолевые клетки могут вызывать обратимое состояние покоя со снижением синтеза вирусного антигена и повышенной терапевтической резистентностью, а также могут служить причиной рецидива опухоли при реоксигенации [98].

Мелатонин участвует в различных физиологических функциях, включая противоопухолевую активность посредством торможения роста ЗНО, а также путем потенцирования действия других препаратов. Авторами было исследовано комбинированное влияние мелатонина и оксида мышьяка на гибель клеток рака молочной железы человека. Было показано, что мелатонин усиливает индуцированную оксидом мышьяка апоптотическую гибель клеток за счет изменений уровней белков сурвивина, Bcl-2 и Bax, тем самым влияя на высвобождение цитохрома С из митохондрий в цитозоль. Также было обнаружено, что гибель клеток, вызванная совместным лечением мелатонином и оксидом мышьяка, опосредована индукцией REDD1, которая была связана с повышенным образованием АФК. Таким образом, авторы предполагают, что мелатонин усиливает индуцированную оксидом мышьяка апоптотическую гибель клеток за счет активации экспрессии гена *REDD1* и ингибирования mTORC1, а также активации p38/JNK в клетках рака молочной железы человека [229].

Другими исследователями был продемонстрирован новый молекулярный механизм ответа на аспирин в клетках рака молочной железы. В частности, было обнаружено, что аспирин и салициловая кислота увеличивают экспрессию белка REDD1, а нокдаун гена *REDD1* позволяет увеличить опосредованное аспирином подавление фосфорилирования афферентного звена сигнального пути mTORC1, 4E-BP1, в клеточной линии MDA-MB-468. Подавление REDD1 стимулировало снижение фосфорилирования 4E-BP1 аспирином в клетках MCF-7, но не вызывало воспроизводимого эффекта в клеточной линии MDA-MB-231. Нокдаун REDD1 не влиял на экспрессию фосфорилированной формы 4E-BP1 после обработки аспирином в доброкачественных эпителиальных клетках молочной железы MCF10A. Эти результаты показывают, что подавление экспрессии *REDD1* может улучшить противоопухолевую активность аспирина в подмножестве опухолей молочной железы [179].

Известно, что золедроновая кислота, используемая для профилактики и лечения остеопатических осложнений, оказывает противоопухолевое действие при лечении рака молочной железы. В исследованиях *in vitro* на клеточных линиях рака молочной железы было показано, что в выбранных клеточных линиях после терапии золедроновой кислотой наблюдали индукцию экспрессии *REDD1* в различной степени. Авторами было показано, что индуцированная золедроновой кислотой гибель клеток была вызвана стрессом

эндоплазматического ретикулума, активирующим путь PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP для индукции экспрессии *REDD1* и ингибирования пути mTOR [122].

Другой группой авторов было проведено исследование, в котором оценивали клиническую значимость уровней экспрессии *REDD1* и *Akt* при раке яичников (РЯ), а также корреляцию мутаций *KRAS* с уровнем *REDD1*. Было обнаружено, что экспрессия *REDD1* и *Akt* была значительно выше при серозной аденокарциноме, чем при других гистологических типах, это повышение коррелировало с поздней стадией заболевания. Экспрессия *REDD1* также была ассоциирована с образованием асцита, тогда как экспрессия *Akt* – с более высокой гистологической степенью злокачественности и химиорезистентностью. Снижение безрецидивной и общей выживаемости у пациентов с РЯ коррелировало с гиперэкспрессией как *REDD1*, так и *Akt*. У пациентов с мутациями *KRAS* данные показатели были более высокими. Однако мутации в гене *KRAS* и повышенный уровень *REDD1* не коррелировали [109].

Метилселениновая кислота представляет собой метилированный метаболит селена, который обладает мощной противоопухолевой активностью за счет ингибирования клеточной пролиферации при некоторых ЗНО. Ранее было исследовано, что данная кислота способствует апоптозу в клетках инвазивного рака простаты частично за счет подавления фактора, индуцируемого гипоксией, HIF-1 $\alpha$ . В клетках рака простаты как PTEN<sup>+</sup>, так и PTEN<sup>-</sup> было показано, что метилселениновая кислота повышает уровень экспрессии *REDD1* и фосфорилирование *Akt* вместе с p70S6K при гипоксии. Кроме того, индукция *REDD1* под действием кислоты не зависит от *Akt*, а ингибирование mTOR в клетках рака простаты вызывает частичную устойчивость к индуцированному метилселениновой кислотой снижению роста при гипоксии. Исследователи полагают, что вышеупомянутая кислота индуцирует *REDD1* и ингибирует рост клеток рака простаты при гипоксии, несмотря на активацию *Akt* и нарушение регуляции mTOR [189]. sinha

Опухолевая кахексия — это многофакторный метаболический синдром, который вызывает до 20% смертей, связанных с ЗНО. Атрофия мышц, признак опухолевой кахексии, сильно ухудшает качество жизни пациентов, однако лежащий в основе патологический процесс все еще плохо изучен. Изучение патогенеза заболевания во многом опирается на мышечные модели кахексии. В своем исследовании авторы использовали транскриптом кахектической икроножной мышцы в модели ксенотрансплантата C26. Посредством биоинформатического анализа и построения сети белок-белкового взаимодействия, а также сравнения путей, участвующих в механизме опухолевой кахексии, было выявлено, что ключевым белком в данном процессе является *REDD1*. Повышенная экспрессия *REDD1* в мышечной ткани, подверженной кахексии, была дополнительно подтверждена на животных моделях и у пациентов с опухолевой

кахексией. Дальнейшее исследование показало, что p38 индуцирует экспрессию гена *REDD1*, который, в свою очередь, ингибирует путь mTOR в атрофических клетках [147].

Также исследователями было показано, что изменение экспрессии гена *REDD1* играет важную роль в развитии уротелиальной карциномы мочевого пузыря (УКМП) – одного из наиболее распространенных ЗНО мочевыделительной системы. Было отмечено, что повышенный уровень экспрессии *REDD1* коррелировал с негативными прогностическими показателями у пациентов с УКМП. Данный ген увеличивает пролиферацию и снижает апоптоз клеток УКМП, что позволяет предположить, что *REDD1* действует как онкоген в вышеупомянутой нозологии. Также авторами было показано, что ингибирование экспрессии *REDD1* посредством РНК или miR-22 может быть новой потенциальной терапевтической стратегией для сенсibilизации клеток УКМП к паклитакселу [230].

Вышеприведенные исследования показывают, что ингибирование экспрессии *REDD1* может быть способом подавления роста опухоли, а уровень экспрессии этого гена может служить в качестве нового маркера для оценки и прогнозирования течения заболевания. Таким образом, ген *REDD1* может стать новой терапевтической мишенью для целого ряда онкологических заболеваний.

## 2) Неонкологические заболевания

Следует отметить, что онкологические пациенты достаточно часто страдают сопутствующими заболеваниями, при которых также может происходить изменение экспрессии *REDD1*. Данные заболевания могут оказывать влияние на качество жизни пациентов, а понимание механизмов молекулярного патогенеза сопутствующих заболеваний может стать важным шагом на пути к предотвращению этих нежелательных последствий.

### *Кожная атрофия и заболевания опорно-двигательного аппарата*

Масса скелетных мышц определяется балансом между скоростью синтеза мышечного белка и его деградацией [108]. Таким образом, мышечная масса увеличивается, когда скорость синтеза превышает скорость разложения белка в течение длительного периода времени, и наоборот, увеличение степени деградации по сравнению с синтезом белка приводит к потере мышечной массы. В ходе суточного цикла эти два процесса усиливаются и ослабевают в ответ на различные внешние факторы (доступность питательных веществ, физические упражнения и др.). Сдвиг метаболизма в сторону синтеза после анаболического стимула (например, упражнений с отягощениями) осуществляется путем передачи сигналов через mTORC1, поскольку было показано, что фармакологическое ингибирование этой киназы с помощью Рапа сводит на нет стимуляцию синтеза белка [89].

Как было отмечено ранее, уровень экспрессии *REDD1* увеличивается при применении терапии ГК. В разделе 1.2.2. было рассмотрено влияние ГК на развитие стероид-

индуцированного эластоза и мышечной атрофии, а также остеопороза, при которых наблюдали значительное увеличение экспрессии *REDD1*. Таким образом, атрофия кожи является основным побочным эффектом при применении местных стероидов. Авторы предположили, что ингибиторы *REDD1* могут защищать кожу от катаболических эффектов ГК. Было показано, что ингибиторы сигнального пути PI3K/mTOR/Akt блокировали экспрессию *REDD1* в кератиноцитах человека. Они также модифицировали глобальный эффект ГК на транскриптом, сдвигая его в сторону терапевтически важного механизма транс-репрессии. Кроме того, местное применение ингибитора LY294002 вместе с ГК флуоцинолона ацетонидом (ФА) защищало мышечную массу от ФА-индуцированного ингибирования пролиферации и атрофии кожи, но не изменяло противовоспалительную активность ФА в тесте на отек уха [25].

Другими авторами было показано, что анаболические гормоны могут ингибировать экспрессию *REDD1*, и, как следствие, атрофию мышц. После того, как было установлено, что тестостерон эффективно предотвращает ГК-индуцированную мышечную атрофию, было показано, что совместное введение супрафизиологической дозы тестостерона предотвращает Дех-индуцированное увеличение мРНК и белка *REDD1* в икроножной мышце самцов крыс. Увеличение *Redd1* в ответ на ГК зависит от доступности ГР, поскольку антагонист рецептора RU-486 ослабляет увеличение мРНК *Redd1* в дифференцированных мышечных трубках L6. Предварительная обработка RU-486 блокировала увеличение *REDD1* при терапии Дех, также эксперименты *in vitro* показали, что рецептор андрогена должен быть функциональным для тестостерона, чтобы предотвратить Дех-индуцированное увеличение мРНК и белка *REDD1* [219].

Как было описано ранее в разделе 1.2.2., длительный прием ГК влечет за собой высокий риск развития остеопороза, а также переломов, вероятность которых выше чем в общей популяции. Причем данные побочные эффекты могут развиваться в любой возрастной категории, а также не зависят от пола.

#### *Заболевания печени и метаболизм липидов*

Хотя участие *REDD1* в регуляции липогенеза остается плохо изученным, было впервые продемонстрировано, что подавление *REDD1* в адипоцитах 3T3-L1 с использованием siRNA приводит к ослаблению инсулин-индуцированного липогенеза, одновременно с подавлением действия инсулина [172]. Соответственно, *REDD1* может участвовать в контроле липогенных путей благодаря своей способности модулировать передачу сигналов инсулина и, в частности, активность нижестоящих мишеней PKB/Akt, таких как фактора транскрипции SREBP-1, который играет решающую роль в гомеостазе липидов, индуцируя экспрессию генов, которые кодируют ацетил-КоА-карбоксилазу *ACC* и синтазу жирных кислот. В дополнение к *REDD1*-опосредованным эффектам на липогенез, другое исследование показало, что принудительной

экспрессии REDD1 было достаточно для индукции липолиза в культивируемых адипоцитах C3H10T1/2, о чем свидетельствует повышенное высвобождение глицерина и свободных жирных кислот. Интересно, что это усиление липолиза, вызванное REDD1, не совпадало со значительными изменениями липолитических генов, таких как кодирующие триацилглицероллипазу жировой ткани *ATGL* и гормон-чувствительную липазу *HSL* [131].

Неалкогольная жировая болезнь печени — это хроническое заболевание печени, которое связано с ожирением и инсулинорезистентностью. Авторами было показано, что экспрессия *REDD1* была увеличена в печени мышей и пациентов с ожирением, и его экспрессия коррелировала со степенью стеатоза печени и инсулинорезистентностью у пациентов. Нокаут *REDD1* защищал мышей от развития стеатоза печени, вызванного диетой с высоким содержанием жиров, не влияя на изменение массы тела и непереносимость глюкозы. Эта защита была связана со снижением экспрессии липогенных генов фактора транскрипции 1, связывающего регуляторный элемент стерола *SREBP1c*, синтазы жирных кислот *FASN* и стеароил-коэнзима А десатураза 1 *SCD-1* в печени мышей с нокаутным геном *REDD1*, получавших пищу с высоким содержанием жиров. Также в печени у животных данной группы была повышена экспрессия маркеров аутофагии и митофагии ген клеточной системы аутофагии *Beclin*, ген, связанного с микротрубочками белка 1A/1B легкой цепи *LC3-II*, ген убиквитинликазы E3 *Parkin* и взаимодействующий с BCL2 белок 3 подобный *BNIP3L*. Митохондрии в печени мышей REDD1-KO были меньше, чем у WT. Эти результаты коррелируют с увеличением экспрессии гена рецептора, активируемого пролиферацией пероксисом *PGC-1α* и карнитин-О-пальмитоилтрансферазы *CPT-1*, участвующих в окислении жирных кислот. Таким образом, нокаут *REDD1* защищает мышей от развития стеатоза печени [68].

#### *Воспалительные заболевания*

Воспаление – это физиологический ответ на раздражители, который заключается в активации иммунных клеток для устранения причины и восстановления поврежденных тканей. В различных исследованиях было продемонстрировано, что REDD1 важен для функции иммунных клеток, поскольку он подавляет репликацию вирусов гриппа, кори, эпидемического паротита и респираторно-синцитиальных вирусов и необходим для выживания и нормальной пролиферации Т-клеток. Помимо своей роли в подавлении вирусной инфекции, REDD1, по-видимому, необходим для активации макрофагов и нейтрофилов, которые участвуют в антибактериальной защите организма, что позволяет предположить, что при бактериальной инфекции REDD1 может участвовать во врожденном иммунном ответе [42]. При эндотоксемии организм запускает воспалительную реакцию, а висцеральная жировая ткань представляет собой основной источник провоспалительных цитокинов. Таким образом, регулирование воспалительной реакции в жировой ткани имеет решающее значение. Было показано, что ген

*REDD1* играет важную роль в развитии воспаления. В макрофагах, происходящих из костного мозга, и в эпидидимальной жировой ткани наблюдали увеличение экспрессии *REDD1* в ответ на введение липополисахарида. Нокаут гена *REDD1* у мышей, которым вводили липополисахарид, защищал от развития воспалительной реакции, поскольку в жировой ткани происходило снижение экспрессии провоспалительных цитокинов *TNF $\alpha$* , *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , по сравнению с мышами дикого типа (WT). Это снижение было связано с ингибированием активации многобелкового олигомерного комплекса – инфламмосомы (p38MAPK, JNK, NF- $\kappa$ B и NLRP3), что привело к снижению секреции IL-1 $\beta$ . Хотя *REDD1* является ингибитором mTORC1, потеря *REDD1* снижает воспаление независимо от активации mTORC1, и, более вероятно, за счет регуляции окислительного стресса. Отсутствие *REDD1* снижало образование АФК, связанных с нарушением регуляции экспрессии НАДФН-оксидазы Nox-1 и глутатионпероксидазы GPx3. Отсутствие экспрессии *REDD1* в макрофагах снижало развитие инсулинорезистентности в культуре адипоцитов и макрофагов [157]. *REDD1* напрямую способствует воспалительной реакции как mTORC1-зависимым, так и независимым образом. Например, *REDD1*-зависимое ингибирование mTORC1 необходимо для активации воспаления легких в ответ на эндотоксин, поскольку известно, что mTORC1 ингибирует воспаление, в частности, репрессируя активность ядерного фактора NF- $\kappa$ B. *REDD1* также активировать воспаление и продукцию АФК посредством вышеупомянутого ядерного фактора NF- $\kappa$ B, синтазы оксида азота и супероксиддисмутазы/глутатионпероксидазы/НАДФН-оксидазы [42].

Нарушение регуляции передачи сигналов mTORC1 наблюдают при развитии нескольких иммунологических и воспалительных заболеваний. Было показано, что роль активации пути Akt/mTOR в повреждении легких была связана как с положительными, так и с отрицательными эффектами на данный процесс. Так, при воздействии сигаретного дыма, который способствует увеличению экспрессии *Redd1* в легких, кратковременное ингибирование mTORC1 Rapamycin способствует защите от повреждений и воспаления. Напротив, при воздействии сигаретного дыма на мышей с нокаутом *Redd1* и последующей длительной активации mTORC1 было показано снижение степени повреждения легких [226]. Таким образом, острое ингибирование mTORC1 посредством Rapamycin или временной экспрессии *Redd1* необходимо для адаптации легких и уменьшения повреждений, в то время как хроническое ингибирование mTORC1, связанное с устойчивой экспрессией *Redd1*, по-видимому, оказывает негативное воздействие, обусловленное избыточной продукцией АФК, активацией воспаления и повреждения тканей.

Предполагается, что хроническая экспрессия *REDD1* при эмфиземе легких усугубляет воспаление, вызванное бактериальными инфекциями. Действительно, на мышинной модели *in vivo* было показано, что эндотоксины способствуют экспрессии *REDD1* за счет стимуляции Toll-подобных рецепторов в макрофагах. *REDD1* ингибирует антиоксидантные ферменты,

приводящие к продукции АФК и активации митоген-активируемых протеинкиназ и сигнального пути N-концевой киназы c-Jun/NF-κB, что влечет за собой повышенную проницаемость сосудов, инвазию сосудистых иммунных клеток, системное воспаление и, в итоге, гибель. Напротив, эти механизмы ослаблены у мышей с нокаутным геном *REDD1* [157].

Аутовоспалительные заболевания представляют собой гетерогенную группу системных воспалительных заболеваний, вызванных генетическими или приобретенными дефектами ключевых компонентов врожденного иммунитета. Семейная средиземноморская лихорадка (ССЛ) является наиболее распространенным среди других клинических фенотипов синдромов редких наследственных периодических лихорадок. ССЛ связана с мутациями в гене *MEFV*, кодирующем пирин, и характеризуется повторяющимися, часто вызванными стрессом приступами лихорадки и серозита, но иногда также и хроническим субклиническим воспалением. Было обнаружено, что *REDD1* является наиболее сильно активируемым геном в нейтрофилах во время приступов болезни. При адренергическом стрессе *REDD1*-индуцированная аутофагия запускает управляемое пиринем созревание  $IL-1\beta$  и высвобождение нейтрофильных внеклеточных ловушек [192]. Язвенный колит также является аутовоспалительным заболеванием, характеризующимся увеличением нейтрофил-зависимого высвобождения  $IL-1\beta$  и гиперэкспрессии *REDD1* в нейтрофилах. *REDD1* индуцирует продукцию  $IL-1\beta$  нейтрофилами, подтверждая, что экспрессия *REDD1* участвует в патогенезе язвенного колита и семейной средиземноморской лихорадки [191].

В исследовании, посвященном изучению сигнальных путей при системной красной волчанке (СКВ), было обнаружено, что нейтрофилы пациентов с активной СКВ демонстрировали повышенные уровни базальной аутофагии, что приводило к усиленному высвобождению нейтрофильных внеклеточных ловушек, которое было ингибировано *in vitro* гидроксихлорохином. Нетоз нейтрофилов СКВ коррелировал с повышенной экспрессией *REDD1*. Эндотелин-1 ET-1 и индуцируемый гипоксией фактор-1α HIF-1α были ключевыми медиаторами, управляемыми *REDD1*, что доказано их ингибированием бозентаном и L-аскорбиновой кислотой соответственно. Таким образом, полученные данные предполагают влияние системы *REDD1*/аутофагия/нейтрофильная внеклеточная ловушка в повреждении органов-мишеней и фиброзе при СКВ [82].

#### *Нервно-психические и нейродегенеративные расстройства*

С изменением сигнального пути PI3K/Akt/mTOR связаны несколько неврологических заболеваний, таких как аутизм, синдром ломкой X-хромосомы, эпилепсия, депрессия и нейродегенеративные заболевания. Физиологическая роль гена *REDD1* в тканях мозга еще плохо изучена. Однако некоторые работы свидетельствуют о том, что *REDD1* способствует регуляции mTORC1 в нервной системе. Например, нокаут *REDD1* как *in vitro*, так и *in vivo* у мышей



индуцирует стойкую гипермиелинизацию Шванновских клеток (леммоцитов) и усиленную активацию mTORC1, что позволяет предположить, что эта молекула является новым негативным регулятором миелинизации периферической нервной системы [148].

Большое депрессивное расстройство является довольно распространенным заболеванием. Было показано, что REDD1 увеличивается в префронтальной коре головного мозга пациентов, страдающих депрессивным расстройством, и у крыс, подвергшихся хроническому стрессу [155, 210]. Избыточная экспрессия *REDD1* у крыс вызывает ингибирование PI3K/Akt/mTOR, тревогу, депрессивное поведение и атрофию нейронов. Напротив, мыши с нокаутным геном *REDD1* устойчивы к дефициту синаптической передачи сигналов и mTORC1, вызванными хроническим стрессом [155].

Болезнь Альцгеймера – одна из основных причин старческого слабоумия. Это нейродегенеративное заболевание, вызванное агрегацией  $\beta$ -амилоидного пептида, что приводит к нарушению обучения и памяти. Интересно, что экспрессия *REDD1* увеличивается в клетках нейробластомы, обработанных  $\beta$ -амилоидом, и трансфекция мiРНК к REDD1 в этих клетках способствует их гибели [113]. Более того, было показано, что в лимфоцитах пациентов с болезнью Альцгеймера нарушена активность mTORC1, и это нарушение коррелирует со снижением когнитивных функций [42].

Болезнь Паркинсона (БП) характеризуется дегенерацией определенных популяций нейронов в центральной и периферической нервной системе. Экспрессия *REDD1* повышена в нейронах пациентов, страдающих БП, а также в мышинной модели БП [137, 233]. На основании экспериментальных моделей данного заболевания, было показано, что на ранних стадиях заболевания экспрессия *REDD1* способствует репрессии mTOR в попытке сохранить функцию и жизнеспособность клеток. Однако, если повышение *REDD1* сохраняется, это приводит к гибели нейронных клеток за счет последовательного ингибирования mTOR и Akt [47].

Другими авторами было обнаружено, что субарахноидальное кровоизлияние (САК) индуцирует увеличение экспрессии *REDD1* в спинномозговой жидкости у пациентов в острой стадии. Кроме того, уровень *REDD1* коррелировал с тяжестью травм головного мозга, и при этом снижался на стадии восстановления. Более того, обнаружено, что экспрессия *REDD1* была значительно индуцирована гемоллизатом в нейронах дозозависимым образом. Нокаунт *REDD1* с помощью shRNA позволил ингибировать апоптоз нейронов. Важно отметить, что уровень *REDD1* в периферической крови пациентов с САК был значительно выше, чем у здоровых людей, а также коррелировал с таковым в спинномозговой жидкости. Таким образом, *REDD1* может играть критическую роль в процессе повреждения нейронов, вызванного САК [197].

Мутация в гене гентингина *HD* индуцирует накопление REDD1 в определенных областях мозга у мышей с болезнью Гентингтона (БГ), а также у пациентов, страдающих этим

заболеванием. Нокаунт *REDD1* защищает от гибели клеток, вызванной данной мутацией, и улучшает моторное обучение на модели мышей с БГ. В отличие от БП, при БГ активируется сигнальный путь mTOR. Чрезмерно повышенная экспрессия *REDD1* способствует гибели нейронов посредством ингибирования Akt, что имеет решающее значение в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Однако, экспрессия *REDD1* также может быть важна для ингибирования mTORC1 и индукции аутофагии, что важно для выживания нейронов в условиях стресса. Более того, REDD1 может снижать расход энергии и стресс ЭР за счет своего воздействия на путь MAM и Akt/mTOR [42].

#### *Инсулинорезистентность и ретинопатия, связанная с диабетом*

Инсулинорезистентность – общий симптом ожирения и сахарного диабета типа 2, характеризующийся изменением передачи сигналов инсулина. Ожирение связано с заметным накоплением липидов и высвобождением провоспалительных медиаторов адипоцитов. Накопление жира приводит к гипоксии жировой ткани, что увеличивает содержание белка REDD1 в адипоцитах. REDD1 может способствовать развитию этого провоспалительного статуса за счет высвобождения IL1- $\beta$  макрофагами, что приводит к инсулинорезистентности жировой ткани. В свою очередь, дисфункция жировой ткани могут вызывать инсулинорезистентность и жировые отложения в других тканях, таких как скелетные мышцы и печень. Кроме того, ожирение и сахарный диабет типа 2 увеличивают концентрацию ГК в крови, что, в свою очередь, может активировать REDD1 [42].

Также на мышинных моделях *in vivo* было продемонстрировано, что нокаут *REDD1* снижает чувствительность к инсулину у здоровых особей, приводит к непереносимости глюкозы и инсулина. Более того, инсулин-опосредованный липогенез ингибируется в адипоцитах 3T3-L1 с нокаутным REDD1 [69].

Инсулинорезистентность и гипергликемия способствуют развитию диабетической ретинопатии, которая является одной из основных причин развития слепоты. Диабетическая ретинопатия характеризуется апоптозом нейронов сетчатки и зависимой от фактора роста эндотелия сосудов VEGF неоваскуляризацией сетчатки. Повреждения капилляров, вызванные диабетом, вызывают ишемию, ведущую к гипоксии, а затем к HIF-1-зависимой индукции VEGF [61]. В сетчатке мышей с сахарным диабетом была продемонстрирована повышенная экспрессию *Redd1*, а нокаут данного гена улучшает зрительную функцию [40]. Также было показано, что *Redd1* способствует индуцированному диабетом окислительному стрессу в сетчатке за счет Keap1-независимой деградации ядерного фактора Nrf2 [144].

#### *Сердечно-сосудистые заболевания*

Инфаркт миокарда характеризуется окклюзией коронарной артерии, приводящей к ишемии сердца. Уменьшение поступления кислорода в кардиомиоциты приводит к гибели

клеток и повреждению тканей сердца. *REDD1* гиперэкспрессируется в гипоксической/ишемической сердечной мышце [114]. *REDD1* может быть особенно важным для адаптации кардиомиоцитов во время гипоксии, подавляя mTORC1-зависимые процессы потребления энергии посредством нарушения МАМ. Реперфузия может также вызывать повреждение сердечной мышцы из-за чрезмерного производства АФК и активации аутофагии [33]. Кроме того, *REDD1* может также стимулировать продукцию АФК во время фазы реперфузии в сочетании с TXNIP [86]. Было показано, что избыточная экспрессия *REDD1* защищает от развития и сохранения сердечной недостаточности после инфаркта миокарда за счет уменьшения апоптоза и усиления аутофагии посредством сигнального пути mTOR. Таким образом, *REDD1* является терапевтической мишенью при развитии сердечной недостаточности после инфаркта миокарда [100].

Подводя итог, можно сказать, что *REDD1* играет важную роль в регуляции целого ряда заболеваний различных систем организма человека. Повсеместно применяемые в настоящее время в комбинированной химиотерапии ГК вызывают стероид-индуцированное повышение экспрессии *REDD1*, что особенно важно в разрезе развития серьезных побочных эффектов, таких как кожная и мышечная атрофия, остеопороз, нарушение заживления ран и др. Нокаут гена *REDD1* помогает защитить от негативного влияния этих нежелательных реакций за счет активности mTORC1, при этом не оказывая влияния на терапевтический эффект ГК. Следовательно, стероидная терапия в комбинации с ингибиторами экспрессии *REDD1* может способствовать увеличению эффективности использования противоопухолевых препаратов, при этом уменьшая риск развития побочных реакций. Таким образом, подавление экспрессии гена *REDD1*, а также поиск и исследование новых ингибиторов является актуальной задачей современной медицины, в частности, онкологии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Список используемых реактивов

1. LY294002, «Sigma-Aldrich», США;
2. AZD8055, «Sigma-Aldrich», США;
3. EvaGreen краситель (50X раствор в воде), «Синтол», Россия;
4. TRI Reagent, «Sigma-Aldrich», США;
5. Агар-агар бактериологический, «Диаэм», Россия;
6. Агароза, «Fisher Biotech», Испания;
7. Ампициллин, «ПанЭко», Россия;
8. п-Ацетоксистирол, «Sigma-Aldrich», США;
9. Борная кислота, «Sigma-Aldrich», США;
10. Бромфенол синий, «Biotech», Англия;
11. Бромистый этидий, «Sigma-Aldrich», США;
12. Вортманнин (WM), «Sigma-Aldrich», США;
13. Гематоксиллин, «BioVitrum», Россия;
14. Гентамицин, «ПанЭко», Россия;
15. Гистомикс, среда для заливки блоков, «BioVitrum», Россия;
16. Глицерин, «Serva», Германия;
17. (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), «ПанЭко», Россия;
18. Дексаметазон (Dex), «Sigma-Aldrich», США;
19. Диметилсульфоксид (ДМСО), «ПанЭко», Россия;
20. 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), «ПанЭко», Россия;
21. Дитиотрейтол (ДТТ), «ThermoFischer Scientific», США;
22. Диэтиловый эфир, «Химмед», Россия;
23. ДНКаза, «Синтол», Россия;
24. Дрожжевой экстракт, «ПанЭко», Россия;
25. Изопропиловый спирт, «Химмед», Россия;
26. Ингибитор РНКаз, «Синтол», Россия;
27. Калий хлорид, «Химмед», Россия;
28. Кальций хлорид, «Химмед», Россия;
29. Кислота серная, «Химмед», Россия;

30. Кислота соляная, «Химмед», Россия;
31. Кротоновое масло, «Sigma-Aldrich», США;
32. Ксилол, «Sigma-Aldrich», США;
33. Магний хлорид, «Химмед», Россия;
34. Магний сульфат, «Химмед», Россия;
35. Маркер молекулярного веса белков Page Ruler Plus, 10-250 kDa, «ThermoFischer Scientific», США;
36. Маркеры молекулярного веса НК: маркер 100 bp («Biotech», Англия), pBR322/TaqI, pBR322/BsuRI, lambda/EcoRI, Hind III («СибЭнзим», Россия);
37. Матрица формообразующая Matrigel Matrix, «BD Biosciences», США;
38. Монтирующая среда Bio-Mount, «Sigma-Aldrich», США;
39. Набор реагентов «ОТ-1» для проведения обратной транскрипции, «Синтол», Россия;
40. Набор реагентов «РНК-Экстран» для выделения РНК из крови, тканей и культур клеток, «Синтол», Россия;
41. Набор реактивов для выделения плазмидной ДНК QIAprep Spin Miniprep Kit, «Qiagen», США;
42. Набор реактивов для определения активности люциферазы Luciferase Assay System, «Promega», США;
43. Набор реактивов для ПЦР, «Синтол», Россия;
44. Набор реактивов для трансфекции Lipofectamine LTX, «Promega», США;
45. Натрий ацетат, «Химмед», Россия;
46. Натрий додецилсульфат (SDS), «Химмед», Россия;
47. Натрий хлорид, «Химмед», Россия;
48. Натрий цитрат, «Химмед», Россия;
49. Нонидет Р-40 (NP-40), «Amresco», США;
50. Олигонуклеотиды, синтезированные НПФ «Синтол», Россия;
51. Пируват натрия, «ПанЭко», Россия;
52. Питательная среда RPMI-1640, «ПанЭко», Россия;
53. Пропидий йодид (PI), «Sigma-Aldrich», США;
54. Пуромицин, «Sigma-Aldrich», США;
55. Рапамицин (Rapa), «LC laboratories», США;
56. Реагент для определения концентрации белков Bio-Rad Protein Assay, «Bio-Rad», США;
57. РНКаза А, «Синтол», Россия;
58. Сыворотка крови эмбриональная телячья, «ПанЭко», Россия;
59. Триптон, «Диаэм», Россия;

60. Тритон-X100, «Sigma-Aldrich», США;
61. Формалин 10% забуференный, «BioVitrum», Россия;
62. Фосфорно-солевой буфер (PBS), «Flow Laboratories», Англия;
63. Хлороформ, «Химмед», Россия;
64. Эозин, «BioVitrum», Россия;
65. Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (EDTA), «Sigma-Aldrich», США;
66. Этиловый спирт.

## **2.2. Список используемых приборов**

1. Проточный цитофлуориметр FACSCalibur, «Becton Dickinson», США;
2. Спектрофотометр BioPhotometr, «Eppendorf», Германия;
3. Спектрофотометр NanoDrop Lite, «ThermoFischer Scientific», США;
4. ПЦР-анализатор Bio-Rad Connect, «Bio-Rad Laboratories Hercules», USA;
5. Флуоресцентный микроскоп Zeiss AxioPlan2, «Zeiss», Германия;
6. Микропланшетный ридер Infinite F500 Tecan, «Tecan», Австрия;
7. Мультилуночный спектрофотометр MultiScan MCC 340, «Labsystems», США.

## **2.3. Клеточные линии**

В работе использовали клетки острого лимфобластного лейкоза линии СЕМ, любезно предоставленные д.б.н. Г.А. Посыпановой, МНИИМЭ, Москва, Россия, и лимфомы мантийной зоны селезенки линий Granta-519, любезно предоставленные проф. Бернштейном, университет Рочестера, Рочестер, США. Клетки культивировали в стандартной среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотку крови эмбриональную телячью и гентамицин (50 ед/мл) при 37°C и в 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.4. Определение цитотоксического эффекта**

Эксперименты по сравнению цитотоксического эффекта на клетки ЗНСК и моноциты человека проводили путем прямого подсчета живых клеток с помощью камеры Горяева. Клеточные культуры высевали в 24-луночные планшеты и спустя 24 ч обрабатывали растворителем, исследуемым соединением или его комбинацией с

дексаметазоном. Прямой подсчет клеток проводили спустя 24 ч после обработки. В каждую экспериментальную группу входило по 3 лунки.

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. Клеточные культуры высевали в 96-луночные планшеты в количестве 3000 клеток/лунка и спустя 24 ч или 48 ч, соответственно, обрабатывали растворителем, исследуемым соединением или его комбинацией с дексаметазоном. После обработки клеточные культуры инкубировали в течение 24 ч, затем вносили 20 мкл МТТ 5 мг/мл и инкубировали 2 ч при 37°C до фиолетовой окраски. Образовавшийся формазан растворяли в 200 мкл ДМСО и инкубировали при 37°C. Измерения оптической плотности проводили с помощью мультилуночного спектрофотометра MultiScan MCC 340 при длине волны 570 нм. Построение графиков производили с помощью коммерческого пакета программ Origin Pro 8.1 (OriginLab, США).

Тип совместного воздействия исследуемых соединений оценивали с помощью комбинационного индекса (combination index, CI) по формуле [51]:

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

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, аддитивность или антагонизм.<sup>1</sup> Для построения графиков (изоболограмм) был применен метод фиксированных доз [87]. В данном методе точками обозначаются те значения, при которых количество жизнеспособных клеток составило 50%. На первом этапе на осях координат изоболограммы указывают значения, равные IC50 каждого из исследуемых соединений индивидуально, и соединяют эти значения прямой линией аддитивности. Соответственно, если полученные в ходе исследования значение располагаются на этой прямой, то для комбинации данных соединений принято рассматривать аддитивный тип совместного воздействия. Если же значение располагаются ниже или выше данной прямой, то следует рассматривать синергический или антагонистический тип совместного воздействия.

---

<sup>1</sup> Кооперативность – такое изменение состояния системы, взаимодействие элементов которой усиливается с течением процесса изменения так, что существенно ускоряет его ход в целом (положительная кооперативность) [195].

## 2.5. Проточная цитофлуориметрия

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 этого клеточные культуры рассеивали в 6-луночные планшеты в количестве 200 т. клеток/лунка и спустя 24 ч обрабатывали растворителем, исследуемым соединением или его комбинацией с дексаметазоном. В каждую экспериментальную группу входило по 3 лунки. Спустя 24 ч после обработки клетки центрифугировали, осадок промывали в натрий-фосфатном буфере (PBS), далее снова центрифугировали и при необходимости хранения ресуспендировали в 70% холодном этаноле. Хранили при 4°C до непосредственного проведения эксперимента. В день проведения анализа данные растворы центрифугировали и ресуспендировали в 500 мкл буфера, содержащего 5 мкг/мл пропидий йодида, 0,1% цитрата натрия, 0,1% тритона-X100 и 1% РНКазы А. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Число апоптотических клеток (в процентах) определяли по гиподиплоидному пику sub-G1 на ДНК-гистограмме.

## 2.6. Выделение РНК и обратная транскрипция

**Клеточные культуры.** Для выделения тотальной клеточной РНК из клеточных культур использовали набор реагентов “РНК-Экстран”, все этапы проводили согласно прилагаемой к набору инструкции. Раствор для элюции содержал 1 мкл ингибитора РНКаз и 3 мкл ДНКазы.

**Свежезамороженная костная ткань.** Для выделения тотальной клеточной РНК из свежезамороженной костной ткани использовали TRI Reagent, все этапы проводили согласно прилагаемой к реагенту инструкции. Раствор для элюции содержал 1 мкл ингибитора РНКаз и 3 мкл ДНКазы.

**Определение концентрации.** Концентрацию тотальной клеточной РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop Lite по оптической плотности раствора при длине волны 260 нм. О качестве полученного раствора судили по отношению значений оптической плотности при 260 и 280 нм.

**Реакция обратной транскрипции.** Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием коммерческого набора реагентов «ОТ-1» согласно прилагаемой инструкции. Использовали следующий температурный режим: 37°C в течение 30 мин,



далее 92°C в течение 5 мин. Полученный в ходе реакции раствор кДНК доводили до объема 100 мкл, добавляя 75 мкл деионизированной воды.

## 2.7. Количественный ПЦР-анализ

Для проведения анализа готовили реакционную смесь, состоящую из 25 мМ хлорида магния, 10-кратного ПЦР-Буфера-Б для Taq ДНК-полимеразы, 25-кратной смеси dNTP, 50-кратного красителя EvaGreen и деионизированной воды. К 18 мкл реакционной смеси добавляли 2 мкл смеси прямого и обратного праймеров концентрацией 10 пМ и 5 мкл раствора, содержащего кДНК. Каждый образец был исследован в 3-х повторах. Эксперимент проводили с использованием ПЦР-анализатора Bio-Rad Connect и следующей программы амплификации в режиме реального времени: 95°C – 3 мин, 44 цикла (95°C – 15 с, 57°C – 20 с, 72°C – 25 с), 72°C – 3 мин, с последующим плавлением от 65°C до 95°C с шагом 0,5°C. Анализ полученных результатов производили с помощью коммерческого пакета программ Bio-Rad CFX Manager Software v.3.1.

Относительное изменение экспрессии исследуемой мРНК вычисляли методом  $\Delta\Delta C_t$ , где  $\Delta\Delta C_t$  определяли путем вычитания среднего  $\Delta C_t$  контроля из среднего  $\Delta C_t$  экспериментальных образцов [126]. 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>Coll1A1</i>		GCTCCTCTTAGGGGCCACT CCACGTCTCACCATTTGGGG
<i>Coll2A1</i>		GТААСТТСГТГССТАГСААСА ССТТТГТСАГААТАСТГАГСАГС
<i>Opg</i>		АСССАГАААСТГГТСАТСАГС СТГСААТАСАСАСТАТСАСТ
<i>Rankl</i>		САГСАТСГСТСТГТТССТГТА СТГСГТТТТСАТГГАГТСТСА
<i>Rpl27</i>		GCCCTGGTGGCTGGAATTGACC TTGCGCTTCAAAGCTGGGTCCC
	<i>CCND1</i>	GCTGGAGCCCCTGAAAAAGA CTCCGCTCTGGCATTTTG
	<i>CCND2</i>	СТАСТТСССГАСТГСТСТА СССАГССАГАААССГГТСС

	<i>CD86</i>	CTGCTCATCTATACACGGTTACC GGAAACGTCGTACAGTTCTGTG
	<i>FKBP51</i>	GAATGGTGAGGAAACGCCGAT TGCCAAGACTAAAGACAAATGGT
	<i>GILZ</i>	AACACCGAAATGTATCAGACCC TGTCCAGCTTAACGGAAACCA
	<i>IL7R</i>	CGTCTATCGGGAAGGAGCCAAT GCTGGATAAATTCACATGCGTCCA
	<i>KLF9</i>	GAAACACGCCTCCGAAAAGAGG GAAAGGGCCGTTACCTGTATG
	<i>MKP1</i>	ACCACCACCGTGTTCAACTTC TGGGAGAGGTCGTAATGGGG
	<i>REDD1</i>	TAGCCTTTGGGACCGTTCTCGT CAGGTAAGCCGTGTCTTCCTCCG
	<i>RPL27</i>	ACCGCTACCCCGCAAAGTG CCCGTCGGGCCTTGCCTTA

### 2.8. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез проводили в 0,7–2%-ном агарозном геле при напряжении 60В в стандартном Трис-боратном буфере (ТВЕ), (рН 8), содержащем 0,089М Трис-НСl, 0,089М борной кислоты, 0,002 М EDTA. Для нанесения ДНК в лунки агарозного геля использовали 6-кратный буфер для нанесения проб, содержащий 0,25% бромфенолового синего, 0,25% ксилोलцианола, 30% глицерина. Для определения молекулярного веса фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярного веса pBR322/TaqI, pBR322/BsuRI, lambda/EcoRI, Hind III. Использовали агарозу высокого разрешения («Fisher Biotech»). Визуализацию ДНК в агарозном геле проводили с помощью окрашивания бромистым этидием.

### 2.9. Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS

Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS проводили в соответствии с методом, описанном Лэммли [121]. Концентрирующий гель содержал 4% полиакриламида, разделяющий гель – 12%. На каждую дорожку наносили 30 мкг белка. Для определения молекулярной массы белков использовали маркер молекулярного веса Page Ruler Plus.

### 2.10. Вестерн блоттинг

Для проведения вестерн блоттинга тотальные клеточные лизаты выделяли, используя RIPA буфер (10 мМ Трис, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,1% SDS, 0,5%

дезоксихолат натрия, 1% Тритон-Х 100, 10% глицерин); цитоплазматическую и ядерную фракции белков выделяли, используя буфер для выделения цитоплазматической (25 мМ Трис-НСl, 5 мМ КСl, 1 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 1% NP-40) и ядерной (20 мМ Трис-НСl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 400 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 0,05% NP-40, 1мМ EDTA, 10% глицерин) фракций соответственно. Концентрацию белка определяли с помощью реагента Bio-Rad Protein Assay («Bio-Rad», США). Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Thermo Fisher», США). Для иммуноблоттинга использовали антитела к GR-α (кроличьи антитела в разведении 1:500 и 1:2000 производства «Santa Cruz Biotechnology», США), расщепленной PARP, p-рpS6, p-4EBP1, p-p70S6K, p-GR (Ser211) (кроличьи антитела в разведении 1:1000 производства «Cell Signaling», США), REDD1 (кроличьи антитела в разведении 1:5000 производства «Proteintech Group», США). Для предотвращения неспецифической сорбции мембраны в течение 1 ч инкубировали с 5%-ным раствором блокирующего агента Blotto («BioRad», США) в TBS-буфере (20 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 150 мМ NaCl), затем инкубировали с первичными антителами в течение 6 ч при комнатной температуре. В качестве контроля использовали антитела к актину и GAPDH («Santa Cruz Biotechnology», США). Мембраны отмывали и инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой, образовавшиеся комплексы проявляли хемилюминесцентным реагентом. Визуализацию сигнала проводили с помощью прибора для гель-документирования ImageQuant LAS4000. Количественный анализ изображений проводили с помощью открыто распространяемого пакета программ ImageJ.

## 2.11. Трансформация бактериальных клеток

**Приготовление компетентных клеток *E. coli* XL-10 Gold.** Ночную культуру клеток *E. coli* XL-10 Gold выращивали в среде LB в течение 12 часов при 37°C. Затем ее разбавляли средой LB и снова выращивали для получения двухчасовой культуры. Затем клеточную суспензию центрифугировали при 2700 g в течение 15 мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в 200 мкл 0,1 М CaCl<sub>2</sub> (на 1,5 мл двухчасовой культуры). Полученную суспензию оставляли на 2 ч при 4°C.

**Трансформация.** К суспензии компетентных клеток добавляли 100 нг лигазной смеси. В качестве отрицательного контроля трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* без добавления плазмиды. В качестве положительного контроля использовали компетентные клетки с добавлением плазмиды с известной эффективностью трансформации (pUC19). Смесь оставляли во льду на 15 мин., затем инкубировали при 42°C

в течение 3 мин., а потом при 4 °С в течение 10 мин. В пробирки добавляли 800 мкл среды LB и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. Содержимое пробирок растирали на чашках Петри с L-агаром и ампицилином. Чашки оставляли в термостате при 37°С на ночь.

### 2.12. Выделение плазмидной ДНК

Ночную культуру клеток штамма *E. coli* XL-1, трансформированных плазмидой, выращивали в среде LB с ампициллином (100 мкг/мл). Выделение плазмиды осуществляли с помощью коммерческого набор реагентов QIAprep Spin Miniprep Kit в соответствии с прилагаемой инструкцией. Концентрация полученной ДНК с помощью спектрофотометра NanoDrop Lite по оптической плотности раствора.

### 2.13. Приготовление сред и растворов для работы с бактериями

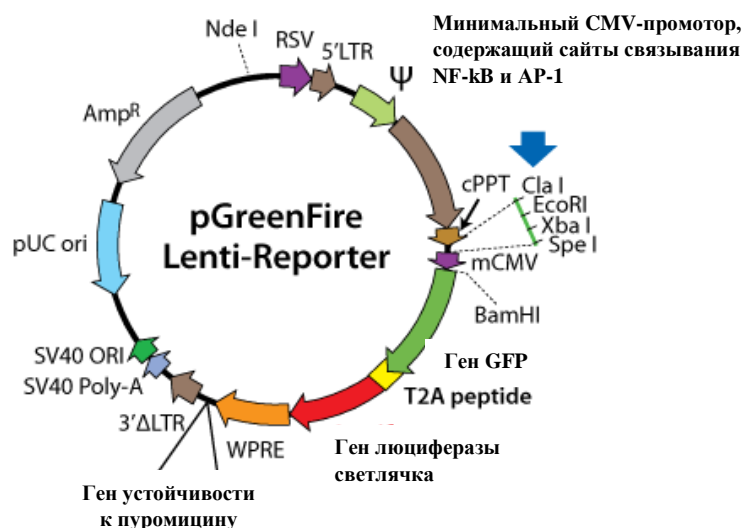
**Жидкая среда LB, 30 мл.** Для приготовления жидкой среды LB в 30 мл дистиллированной воды растворяли 0,3 г триптона, 0,15 г дрожжевого экстракта и 0,3 г NaCl. Среду автоклавировали и добавляли раствор ампициллина до конечной концентрации 0,1 мг/мл. Приготовление раствора ампициллина, 100 мг/мл 0,5 г лиофилизированного порошка ампициллина растворяли в 5 мл 48% этанола.

**Твердая среда L-агар, 100 мл.** Для приготовления жидкой среды LB в 100 мл H<sub>2</sub>O растворяли 1 г триптона, 0,5 г дрожжевого экстракта, 1 г NaCl и 1 г бактериологического агара. Среду автоклавировали и добавляли раствор ампициллина до конечной концентрации 0,1 мг/мл.

### 2.14. Используемые генетические конструкции

Для получения трансформированных клеток, экспрессирующих ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора, содержащего сайты связывания NF-κB и GR, использовали лентивирусный вектор («System Bioscience», США), представленный на рисунке 8.

Для сборки вирусных частиц были использованы упаковочная плазмида psPAX2 (плазмида №12260), и плазмиды pCMV-VSV-G (плазмида №8454) и pMD2.G (плазмида №12259), кодирующие оболочечные гликопротеины.



**Рисунок 8** - Структура используемой генетической конструкции

### 2.15. Трансдукция клеток лентивирусными векторами

Вирусные стоки высокого титра получали путем ко-трансфекции клеток линии 293Т лентивирусными векторами, описанными в разделе 3.3 («System Biosciences», США) совместно с пакующими плазмидами pMD2.G и psPAX2 («Addgene», США). Супернатант, содержащий вирусные частицы, собирали через 24-48 ч после трансфекции, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и использовали для трансдукции клеток. Трансформированные клетки МКЛ и ОЛЛ культивировали на селективной среде, содержащей антибиотик пурамицин. Эксперименты с полученными трансформированными клеточными линиями проводили через 7-14 суток после проведения трансдукции.

### 2.16. Определение активности люциферазы

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).

### 2.17. Оценка противоопухолевой активности *in vivo* на ксенографтах лимфомы у бестимусных мышей

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. В экспериментах, описанных в разделе 3.4., введение препаратов начинали по достижению опухолевыми узелками размера 50 мм<sup>3</sup> и проводили до достижения опухолью размера в 1500 мм<sup>3</sup>. Dex (1 мг/кг) или растворитель (30% PEG3350, 4% ДМСО, 5% Tween 20 в PBS) вводили внутривентриально каждые 48 ч, LY294002 (20 мг/кг) или Rara (5 мг/кг), выбранного в качестве препарата сравнения, вводили за 6 ч до введения Dex. Изменения массы тела регистрировали два раза в неделю. 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.

### **2.18. Оценка атрофических и воспалительных процессов *in vivo* у мышей**

Самок мышей Balb/c в возрасте 12-ти недель (филиал "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) делили на группы по 10 голов в каждой. Глюкокортикоид-индуцированный остеопороз моделировали как описано в [142]. Животным вводили внутривентриально каждые 48 ч LY294002 (20 мг/кг), Rara (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. Изменения массы тела регистрировали два раза в неделю. 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, как описано ранее [32]. Было проанализировано как минимум 30 независимых микрофотографий на каждую группу.

### **2.19. Гистологический и иммуногистохимический анализ**

Для подготовки гистологических срезов использовали стандартный протокол гистологического анализа: после выделения ткани фиксировали в забуференном 10%

формалине («BioVitrum», Россия) в течение не менее 3-х суток. Затем образцы тканей обезвоживали спиртами (70°; 96° –1, 96° – 2; 100° – 1, 100° – 2), хлороформом, заливали в гистомикс (Histomix extra, «BioVitrum», Россия). Удаление парафина и окрашивание гистологических препаратов проводили по следующей схеме: Ксилол –1; Ксилол –2; спирты (100°, 96°, 70°), гематоксилин-эозин. Обезвоживание и заключение препаратов в бальзам проводили по следующей схеме: спирты (100°, 96°, 70°); Ксилол –1; Ксилол –2; монтирующая среда Bio-Mount. Для иммуногистохимического анализа гистологические срезы опухолей депарафинировали и регидратировали по стандартной методике с помощью последовательной обработки ксилолом и спиртом. Для «демаскировки» антигенов срезы прогревали в течение 30 минут в нагретом до 95-99°С цитратном или Tris-буфере (в соответствии с рекомендациями производителя антител), после чего охлаждали при комнатной температуре в течение 15-20 минут и обрабатывали в дистиллированной воде в течение 5 минут. Срезы обводили парафиновым карандашом и переносили в PBS на 5 минут. Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 5 минут в темноте с 3% перекисью водорода и промывали 5 минут в PBS. Для блокирования неспецифического связывания антител срезы инкубировали 15 минут с 1% раствором бычьего сывороточного альбумина. После чего наносили первичные антитела к каспазе 3 и Ki67 (кроличьи антитела в разведении 1:200, «Cell Signaling», США) и инкубировали при 4°С в течение 16 часов, после чего стекла промывали 2 раза по 5 минут в фосфатном буфере. Для проявления антител стекла инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой, образовавшиеся комплексы проявляли хемилюминесцентным реагентом. Срезы докрашивали гематоксилином, дегидратировали при помощи проводки через серию растворов этанола и ксилола и заключали под покровное стекло. Визуализацию и микроскопический анализ изображений проводили с использованием микроскопа Zeiss AxioPlan2.

## 2.20. Морфометрический анализ

Количественный анализ толщины эпидермиса, количество Casp3- и Ki67-положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином, как описано ранее [32]. Было проанализировано как минимум 30 независимых микрофотографий на каждую группу.

## 2.21. Статистическая обработка данных

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  $p < 0,05$ .



### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование было направлено на изучение биологических эффектов потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1*. Поскольку фармакологические ингибиторы *REDD1* в зарубежных и отечественных литературных источниках ранее не описаны, основой выбора препаратов для исследования стал проведенный ранее в отделе химического канцерогенеза биоинформатический скрининг ингибиторов экспрессии *REDD1* среди уже зарегистрированных лекарственных препаратов. В настоящее время перепрофилирование лекарственных препаратов является активно развиваемым направлением медицины, поскольку дает возможность значительно уменьшить перечень требуемых исследований, и, следовательно, снизить затраты на них. Это непосредственно связано с тем, что для уже зарегистрированных препаратов ранее были проведены все необходимые для внедрения в клиническую практику исследования, включающие в себя, к примеру, оценку канцерогенности, фармакокинетики и фармакодинамики, токсичности и др.

#### **3.1. Анализ данных биоинформатического скрининга потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1***

Ранее сотрудниками отдела химического канцерогенеза 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 ингибиторов экспрессии *REDD1* среди 1300 зарегистрированных и применяемых в клинической практике лекарственных препаратов с использованием базы данных Connectivity Map (<https://www.broadinstitute.org/cmap/>). Было отобрано 20 соединений – потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* для тестирования возможности их использования для подавления побочных эффектов ГК-опосредованной терапии ЗНО СК. В частности, на примере рапамицина (Rapam) были получены данные, свидетельствующие о перспективности исследования эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на ГР-зависимые сигнальные пути, противоопухолевую активность ГК и побочные эффекты, вызываемые применением ГК [126]. Вторым независимым поиском, который позволил расширить панель потенциальных ингибиторов *REDD1*, был биоинформатический скрининг с помощью базы данных Library of INtegrated Cellular Signatures (LINCS, <https://lincsproject.org/LINCS/>) (как описано в [25]), которая содержит данные по эффектам более чем 20 000 препаратов в культивируемых *in vitro*

клетках 50 линий опухолей человека [67]. 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 [25, 126]. В представленном исследовании с целью анализа модулирующего влияния ингибиторов экспрессии *REDD1* на эффекты ГК были выбраны следующие препараты (Таблица 2): вортманнин (WM), LY294002 и AZD8055 – соединения класса ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), ключевой составляющей сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, контролирующего рост и жизнеспособность клеток. Также в качестве положительного контроля ингибирования *REDD1* был использован ингибитор mTOR, Rapamycin, эффекты которого были продемонстрированы ранее [126].

**Таблица 2** – Данные по опубликованным исследованиям ингибиторов экспрессии *REDD1*, выбранных на основе биоинформатического анализа с помощью базы данных Library of Integrated Cellular Signatures (LINCS)

Соединение	Число клеточных линий	Число экспериментов	Действие
Вортманнин (WM)	14	131	Ингибитор PI3K/Akt/mTOR
AZD8055	24	55	Ингибитор PI3K/Akt/mTOR
LY294002	6	28	Ингибитор PI3K/Akt/mTOR

### 3.2. Подбор оптимальных рабочих концентраций ингибиторов экспрессии *REDD1*

Для проведения исследований *in vitro* были выбраны клеточные линии острого лимфобластного лейкоза СЕМ и мантийноклеточной лимфомы Granta-519, широко используемые для скрининга новых химиотерапевтических препаратов для терапии ЗНО СК [127, 128, 183].

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 [25, 126]. Моноциты, полученные от здоровых доноров, были использованы для осуществления контроля действия ингибиторов на нормальные клетки.

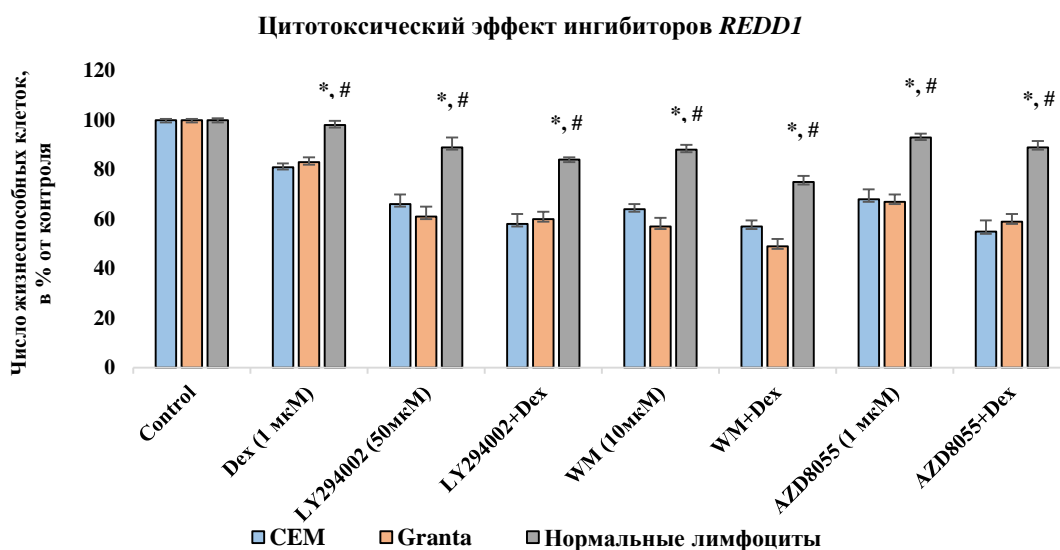
Выбранные соединения при концентрациях, не превышающих IC<sub>20</sub> (Таблица 3), (50 мкМ для LY294002, 1 мкМ для AZD8055 и 10 мкМ для WM) снижали выживаемость клеток линии СЕМ и Granta-519 как при индивидуальном применении, так и при комбинации с Dex

(1 мкМ, IC20), концентрация которого также была выбрана в соответствии с ранее проведенными исследованиями [25, 126]. При этом наблюдалась тенденция к кооперативному действию ингибиторов и Dex.

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 9).

**Таблица 3** – 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%



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 СЕМ, # - статистически значимое отличие от клеток линии Granta-519,  $p < 0,05$

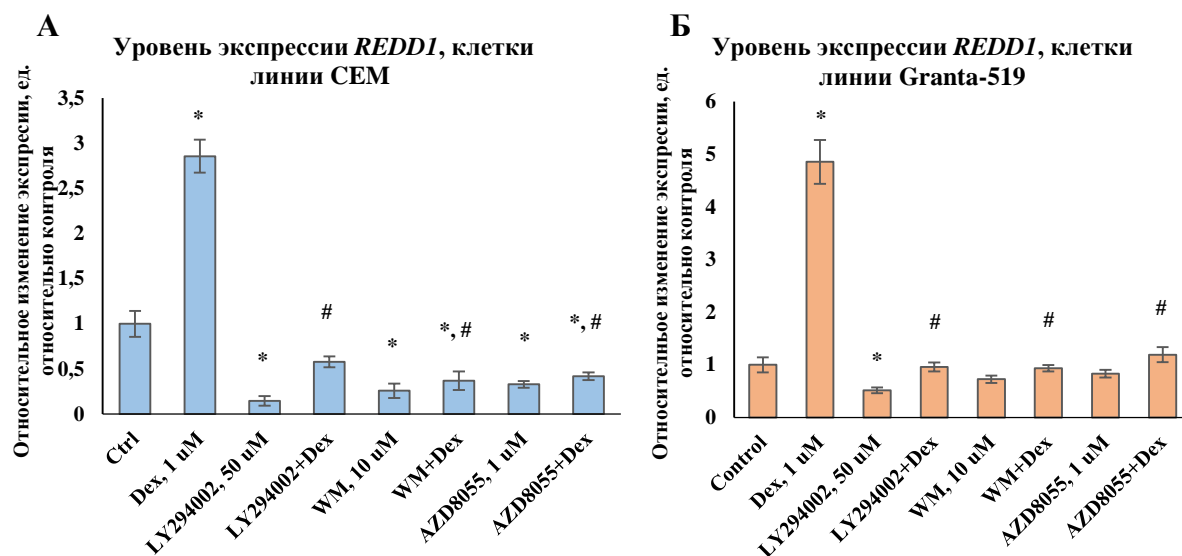
**Рисунок 9** – Сравнение цитотоксических эффектов потенциальных ингибиторов экспрессии REDD1 на клетки линии СЕМ, Granta-519 и моноциты здоровых доноров

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

#### 3.3.1. Оценка влияния потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* на уровень его экспрессии

Для выбранных потенциальных ингибиторов был оценен уровень экспрессии *REDD1 in vitro* методом количественной ПЦР, сопряженной с реакцией обратной транскрипции. Изменение количества ПЦР-продуктов оценивали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*RPL27*). *RPL27* является геном белка «домашнего хозяйства», хорошо экспрессирующимся во многих тканях человека [75].

На рисунке 10 А, Б представлены данные, полученные при культивировании клеток СЕМ и Granta-519 в присутствии растворителя, Dex, потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* (AZD8055, WM, LY294002), либо комбинации Dex и одного из ингибиторов.



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 10** – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на базальную и ГК-индуцированную экспрессию *REDD1* в клетках СЕМ (А) и Granta-519 (Б)

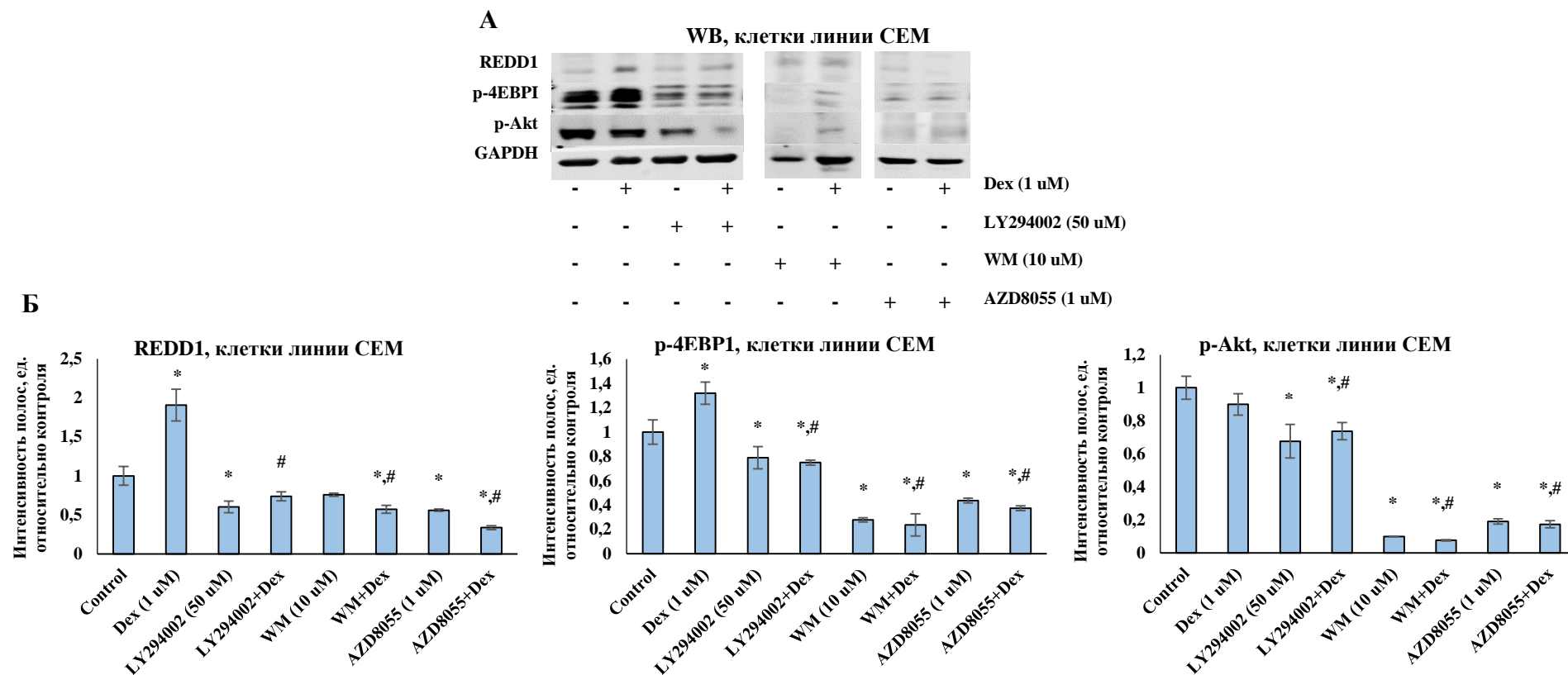
При обработке Dex уровень экспрессии *REDD1* в клетках СЕМ и Granta-519 возрастал в 2,9 и 4,9 раза по отношению к контролю соответственно. LY294002 при индивидуальной обработке снижал экспрессию *REDD1* в 6,7 раза в клетках линии СЕМ и 1,9 раза в клетках линии Granta-519, WM – в 3,4 и 1,4 раза, AZD8055 – 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 СЕМ 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 СЕМ и Granta-519 выбранные препараты ингибируют как базальный, так и ГК-индуцированный уровень экспрессии *REDD1* на уровне мРНК.

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

Также 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 СЕМ 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-BP1 (эукариотический фактор инициации 4E, связывающий белок 1) по Ser<sup>83</sup> и киназы Akt по Ser<sup>473</sup>, основном сайте связывания, регулирующем его активность. В клетках линии СЕМ (Рисунок 11) и Granta-519 фосфорилирование 4E-BP1 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 Ser<sup>473</sup> 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.

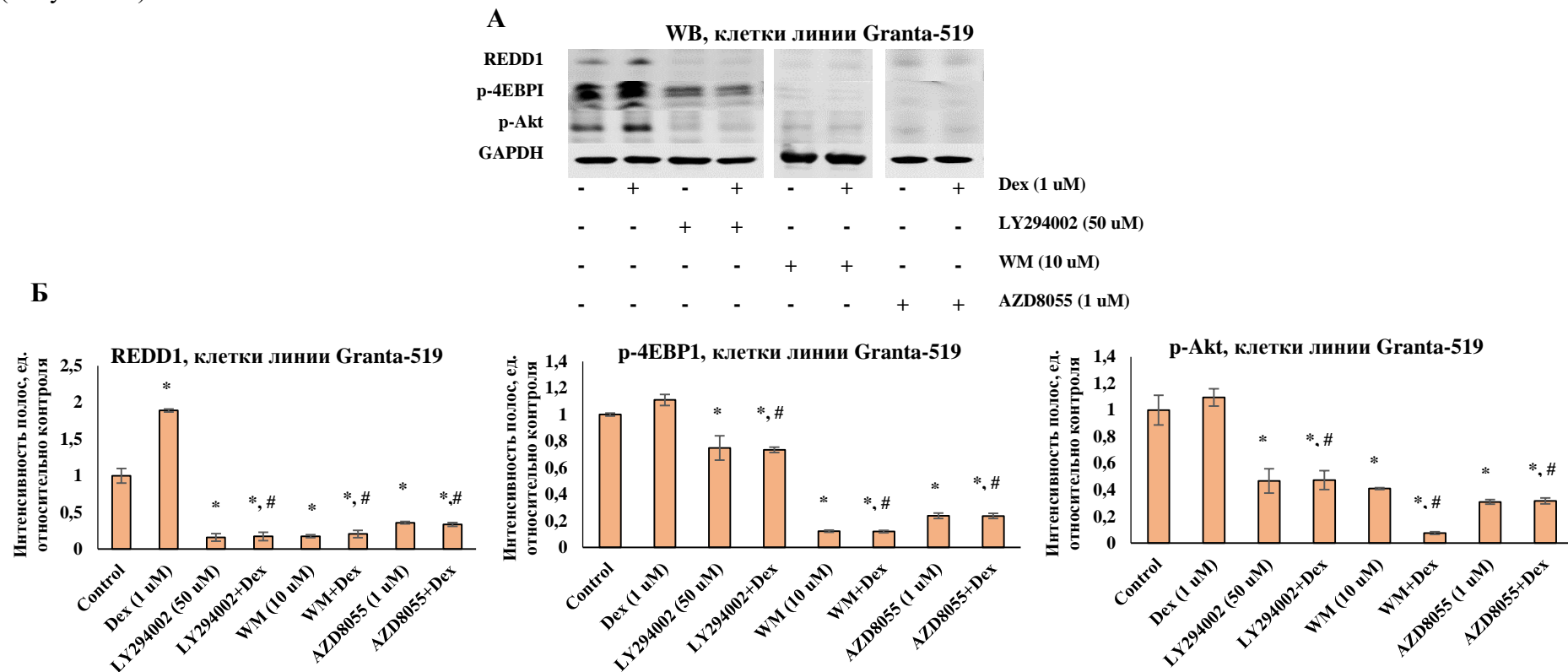


Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1 мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. (А) Экспрессию REDD1, p4EBP1, p-Akt анализировали методом вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали антитела к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от соответствующего контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex,  $p < 0,05$

**Рисунок 11** – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на функциональную активность ГР в клетках CEM

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 (Рисунок 12).

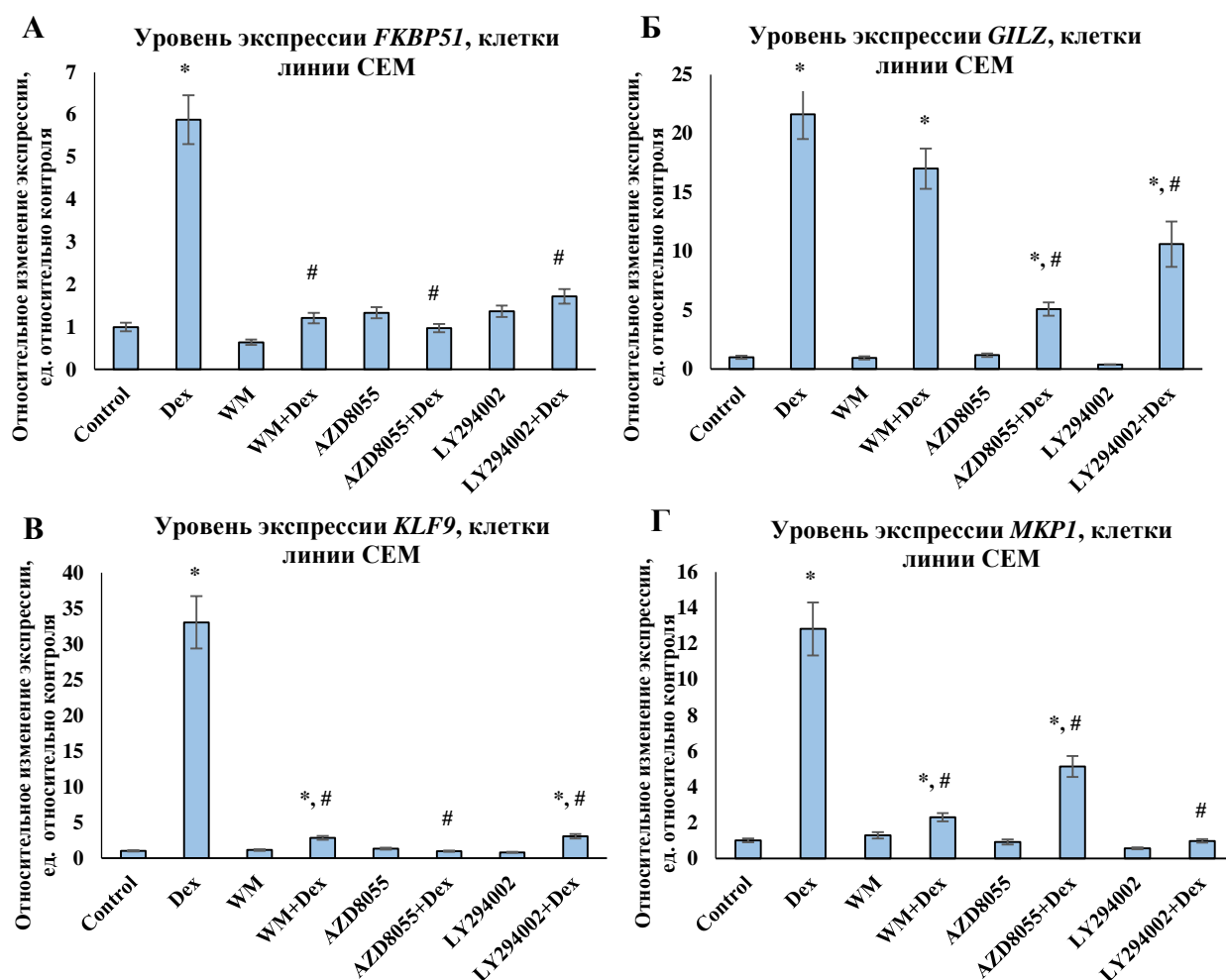


Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов REDD1 (AZD8055 (1 мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Экспрессию REDD1, p4EBP1, p-Akt анализировали методом вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали антитела к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от соответствующего контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex,  $p < 0,05$

**Рисунок 12** – Влияние ингибиторов экспрессии REDD1 на функциональную активность ГР в клетках Granta-519

### 3.3.3. Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на запуск механизмов транс-репрессии и транс-активации

Как было описано ранее (раздел 1.2.1.), комплексы «лиганд-рецептор» формируют гомодимеры и связываются с ГРЭ ДНК, запуская тем самым механизм транс-активации. Это приводит к повышению экспрессии ряда про-воспалительных и антиапоптотических генов. К таким генам – маркерам индукции механизма транс-активации относят следующие гены: белка-шаперона ГР *FKBP51* [25, 127], медиатора противовоспалительных эффектов ГК *GILZ* [76, 223], активатора транскрипции *KLF9* [123] и ингибитора продукции цитокинов *MKP1* [207] (Рисунки 13 и 14).

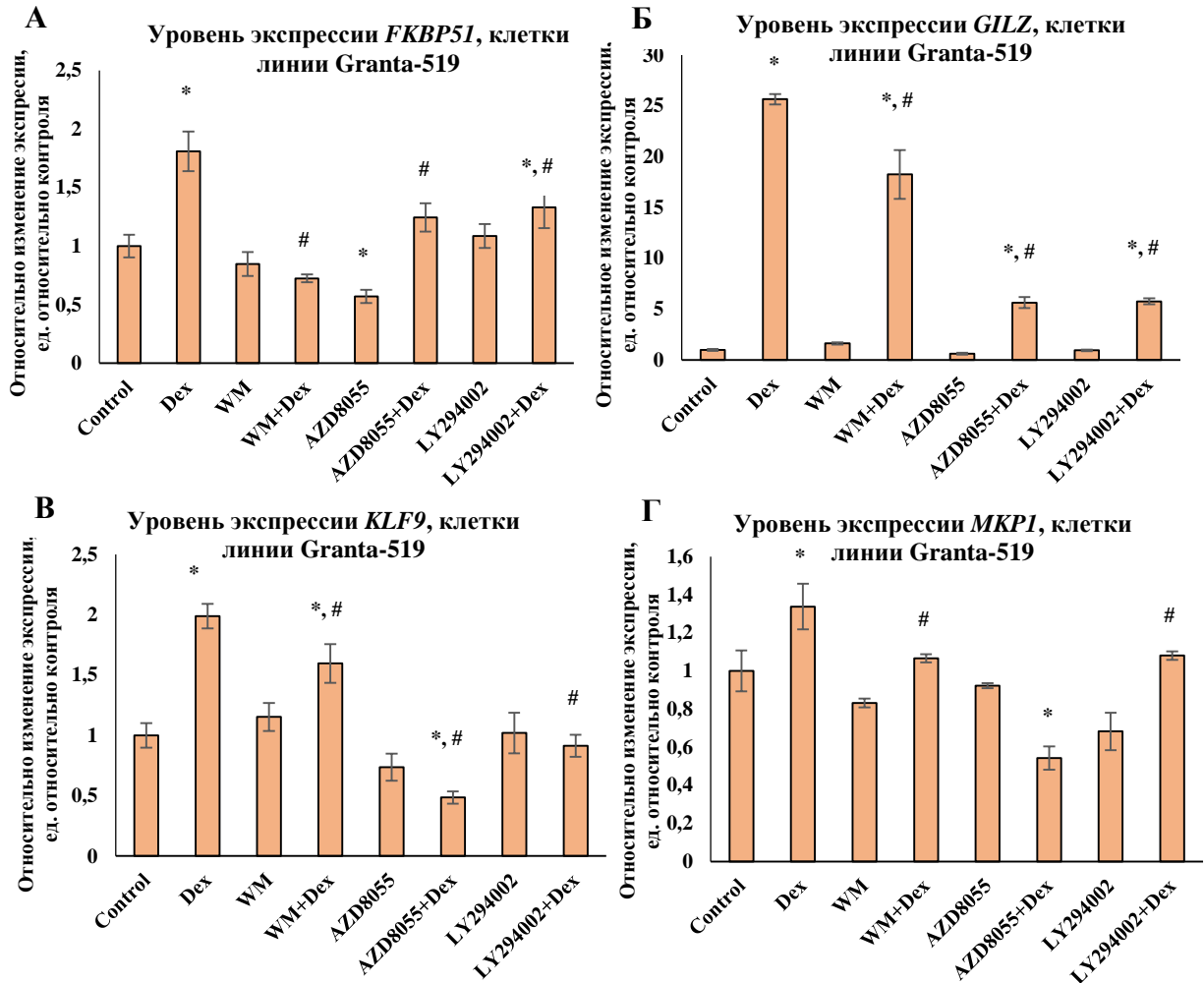


Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *FKBP51* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Изменение 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 13** – Влияние ингибиторов *REDD1* на экспрессию генов *FKBP51* (А), *GILZ* (Б), *KLF9* (В) и *MKP1* (Г) в клетках СЕМ



Было показано, что индивидуальное применение ингибиторов *REDD1* снижает экспрессию вышеперечисленных генов до базального уровня, а также комбинированное применение с Dex подавляет ГК-индуцированный запуск механизма транс-активации как в клетках линии СЕМ (*FKBP51* в 3,5-5,9 раза, *GILZ* в 1,3-4,3 раза, *KLF9* в 10,6-33,0 раза, *MKP1* в 2,5-12,8 раза), так и в клетках линии Granta-519 (*FKBP51* в 1,4-2,6 раза, *GILZ* в 1,4-4,6 раза, *KLF9* в 1,3-4,0 раза, *MKP1* в 1,2-2,6 раза).

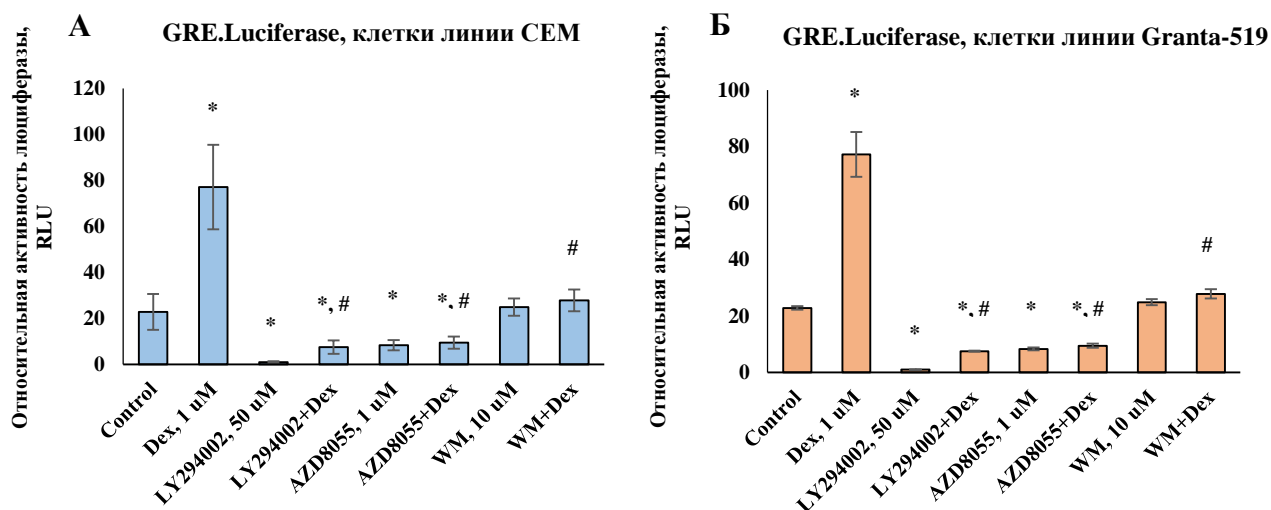


Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *REDD1* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Изменение 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 14** - Влияние ингибиторов *REDD1* на экспрессию генов *FKBP51* (А), *GILZ* (Б), *KLF9* (В) и *MKP1* (Г) в клетках Granta-519

В дополнение к количественной ПЦР было проведено исследование эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на транс-активацию ГР, с помощью трансдукции

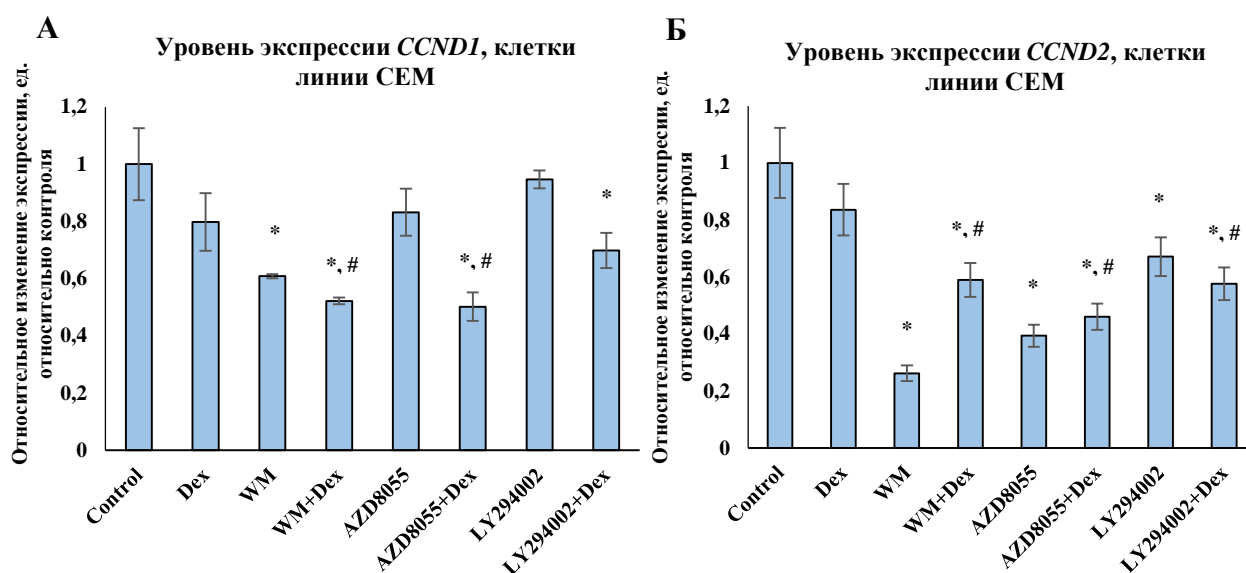
лентивирусных конструкций GRE.Luc в клетках линий CEM и Granta-519. Все выбранные соединения (WM, AZD8055 и LY294002) ингибировали Dex-индуцированную активность люциферазы ГРЭ (в 2,8-10,1 раза). Следует отметить, что как при индивидуальном применении, так и в комбинации с Dex, эффект подавления активности люциферазы был особенно выражен при обработке соединением LY294002 (Рисунок 15).



После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки CEM 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. Далее определяли активность люциферазы, как описано в разделе 2.17. 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 15** - Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на активность ГР в клетках CEM (А) и Granta-519 (Б)

Механизм ДНК-независимой транс-репрессии, запускаемой посредством ГР, опосредован белок-белковым взаимодействием ГР с различными факторами транскрипции [225]. Для оценки степени запуска механизма транс-репрессии в клетках линии CEM были использованы гены-регуляторы клеточного цикла – циклин D1 (*CCND1*) и циклин D2 (*CCND2*), содержащие в промоторной области сайты связывания NF-κB. Было продемонстрировано снижение ГК-индуцированной экспрессии вышеописанных генов (*CCND1* – в 1,1-1,6 раза, *CCND2* – в 1,3-1,6 раза), что свидетельствует снижении активности этих факторов и их эфферентных путей (Рисунок 16).

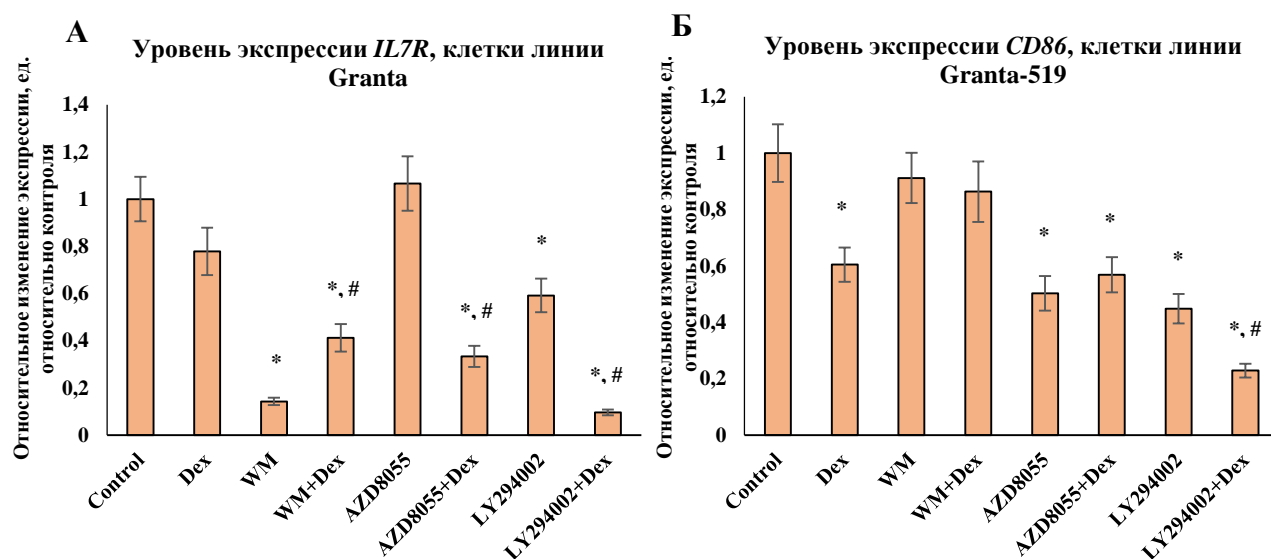


Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *REDD1* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Изменение 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 16** – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на экспрессию генов *CCND1* (А) и *CCND2* (Б) в клетках СЕМ

Как было описано ранее в разделе 1.1.2., хромосомная транслокация  $t(11;14)(q13;q32)$  при мантийноклеточной лимфоме (МКЛ) приводит к конститутивной гиперэкспрессии гена циклина D1 *CCND1*, а также данная нозология может нести транслокации в гене циклина D2 *CCND2*. Таким образом, использование данных маркеров для оценки степени запуска механизма транс-репрессии является нецелесообразным, поскольку повышенный уровень экспрессии вышеупомянутых генов не позволяет зафиксировать изменения даже при применении высоких доз ГК [22]. При исследовании степени запуска механизма транс-репрессии в клеточной линии Granta-519 в качестве маркеров были использованы ген рецептора интерлейкина 7 *IL7R* [130], участвующий в выживаемости лимфоидных клеток, и ген трансмембранного белка антиген-представляющих клеток *CD86*, являющийся маркером злокачественности лимфоидных клеток. На рисунке 17 представлены результаты оценки влияния ингибиторов экспрессии *REDD1* на уровень экспрессии данных маркеров: комбинация выбранных соединений с Dex осуществляет негативную регуляцию *IL7R* (снижали в 1,8-7,0 раза относительно индивидуального применения Dex), однако данный эффект менее выражен в случае

исследования гена *CD86* (при индивидуальном применении выбранные ингибиторы подавляли экспрессию в 1,1-2,0 раза, при комбинированном применении с Dex наиболее выраженным эффектом обладал LY294002, снижая уровень экспрессии в 3,0 раза) на уровне мРНК.

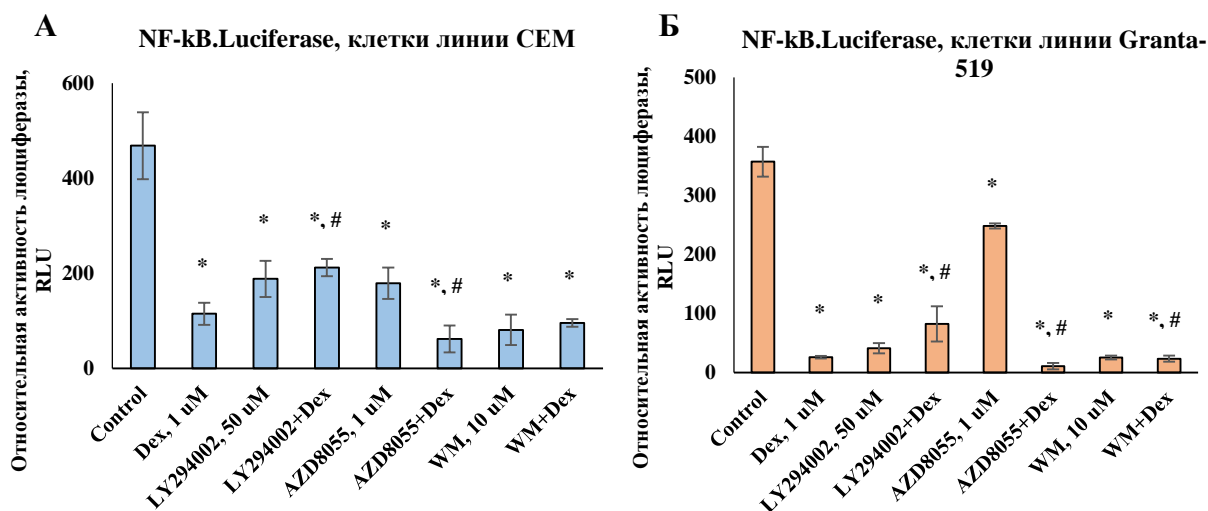


Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *REDD1* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Изменение 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 17** – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на экспрессию генов *IL7R* (А) и *CD86* (Б) в клетках Granta-519

Данные количественной ПЦР были также подтверждены результатами люциферазного репортерного анализа. Активность NF- $\kappa$ B.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 (Рисунок 18).

Таким образом, было показано, что ингибиторы экспрессии *REDD1* оказывают влияние на ГК-зависимые механизмы транс-репрессии и транс-активации, сдвигая эффект в сторону транс-репрессии, за счет которой и осуществляется основной терапевтический эффект ГК.



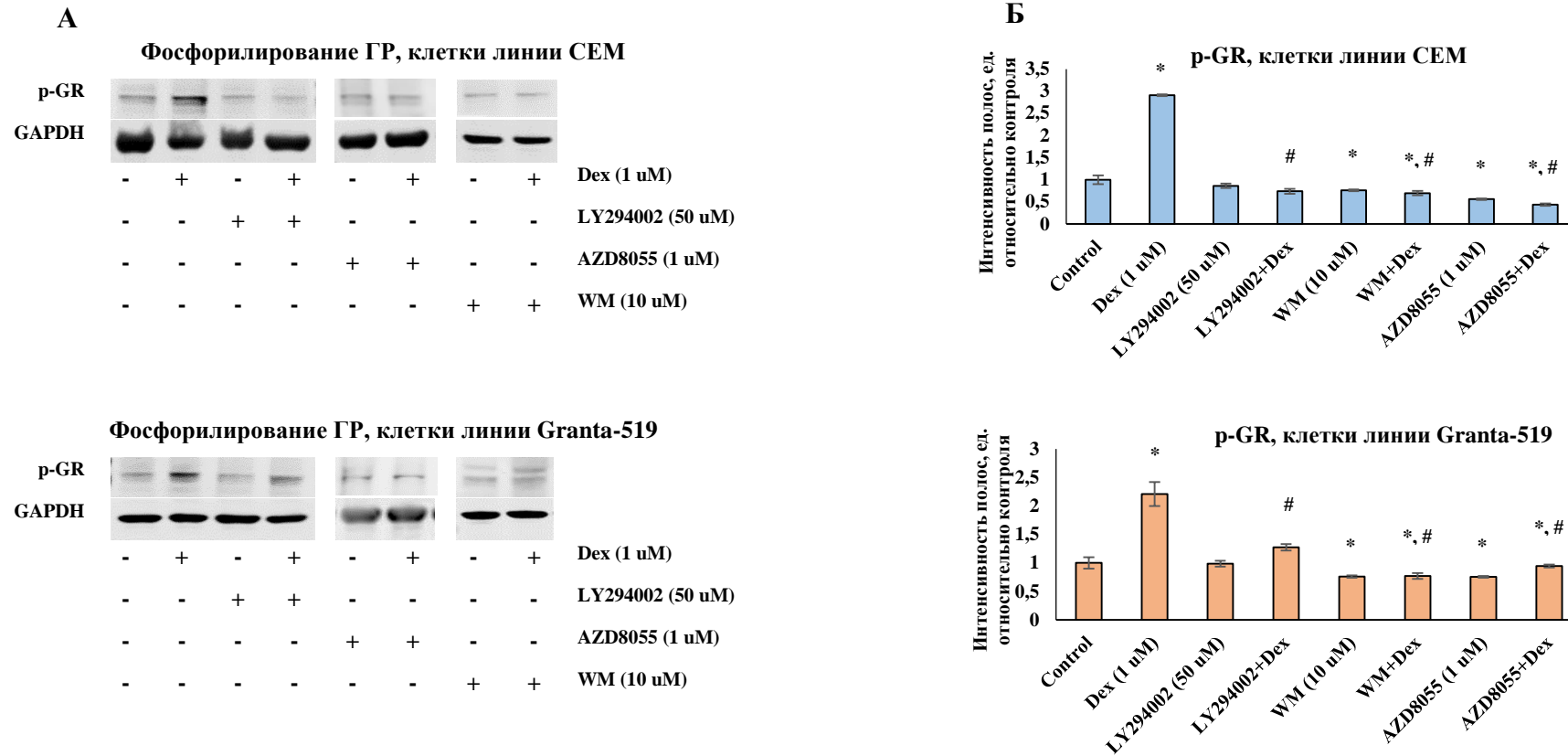
После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-NF-kB клетки CEM культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1 мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. При определении активности люциферазы для нормализации 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, # – статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex,  $p < 0,05$

**Рисунок 18** - Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на активность NF-kB в клетках CEM (А) и Granta-519 (Б)

### 3.3.4. 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 Ser<sup>211</sup> и его ядерную транслокацию, которые имеют решающее значение для индукции механизма транс-активации [50, 84].

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) (Рисунок 19).

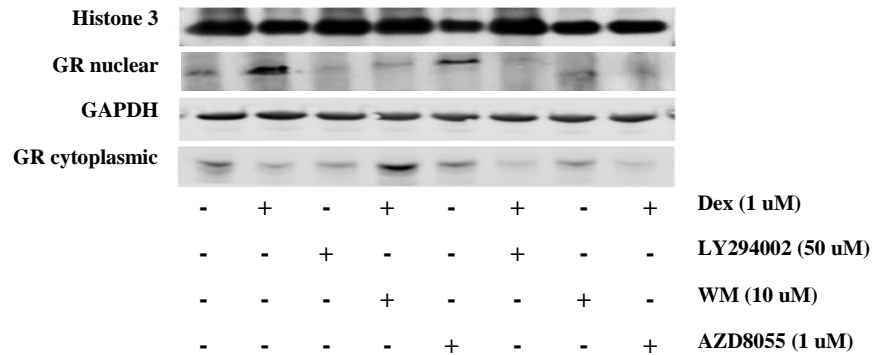


(А) Уровень экспрессии ГР (GR) и ф-ГР (p-GR) в клетках СЕМ после обработки ингибиторами *REDD1* и Dex анализировали с помощью Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали Вестерн блоттинг с антителами к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от соответствующего контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex,  $p < 0,05$

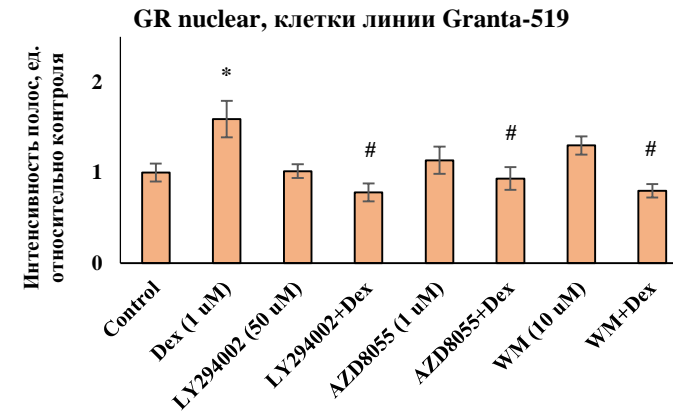
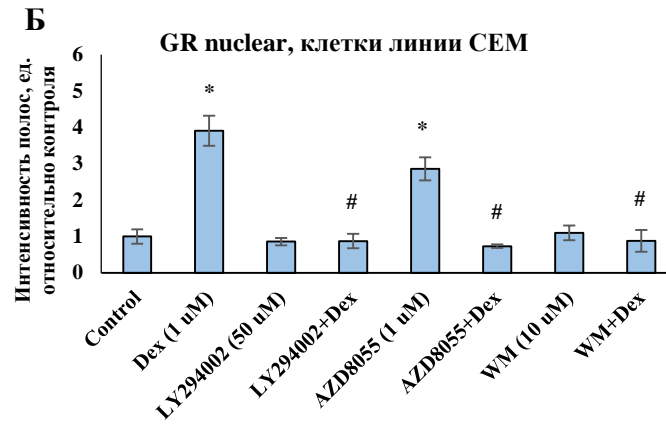
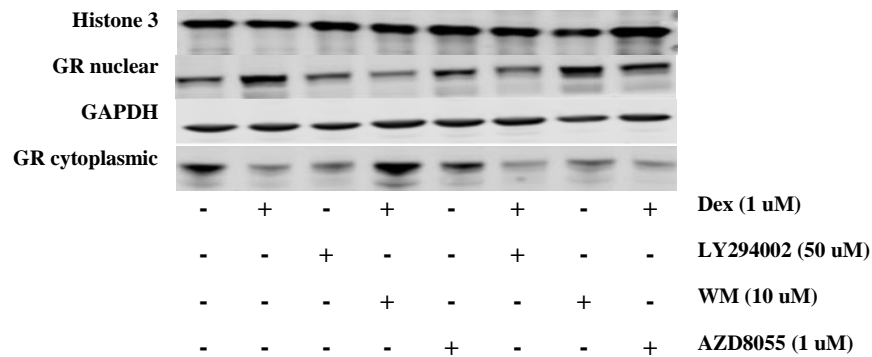
**Рисунок 19** – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на уровень фосфорилирования ГР в клетках СЕМ и Granta-519

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) (Рисунок 20).

#### А Ядерная транслокация ГР, клетки линии CEM



#### Ядерная транслокация ГР, клетки линии Granta-519



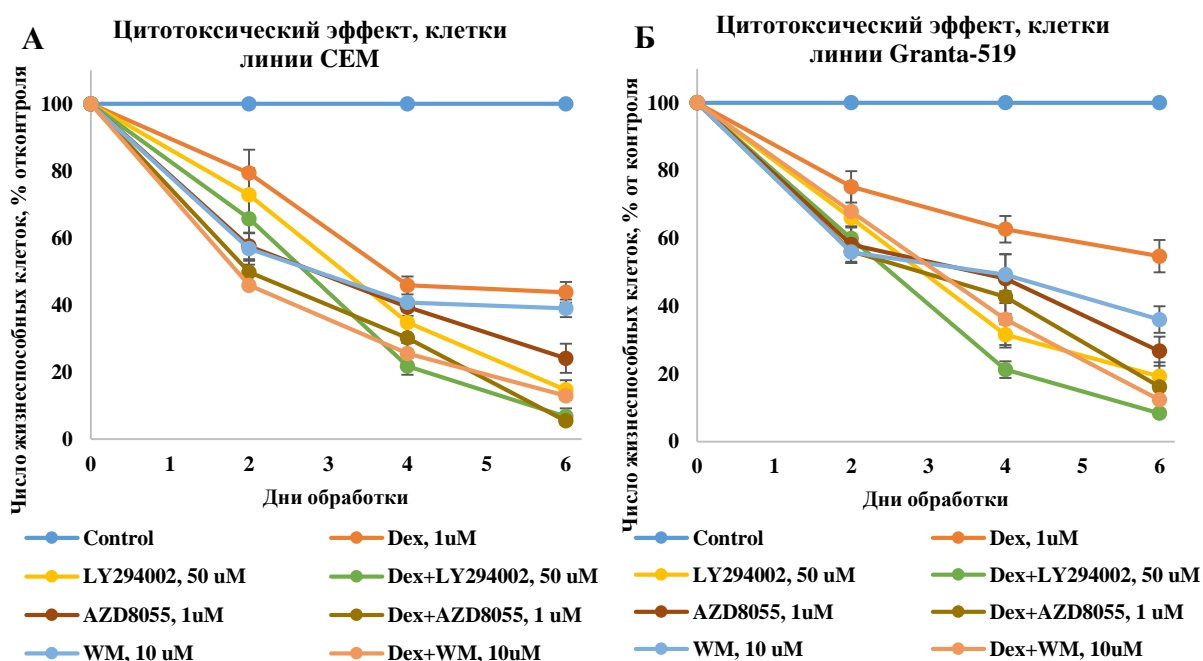
(А) Уровень экспрессии ГР (GR) и ф-ГР (p-GR) в клетках CEM после обработки ингибиторами *REDD1* и Dex анализировали с помощью вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали вестерн блоттинг с антителами к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от соответствующего контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex,  $p < 0,05$

**Рисунок 20** – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на степень транслокации ГР в клетках CEM и Granta-519

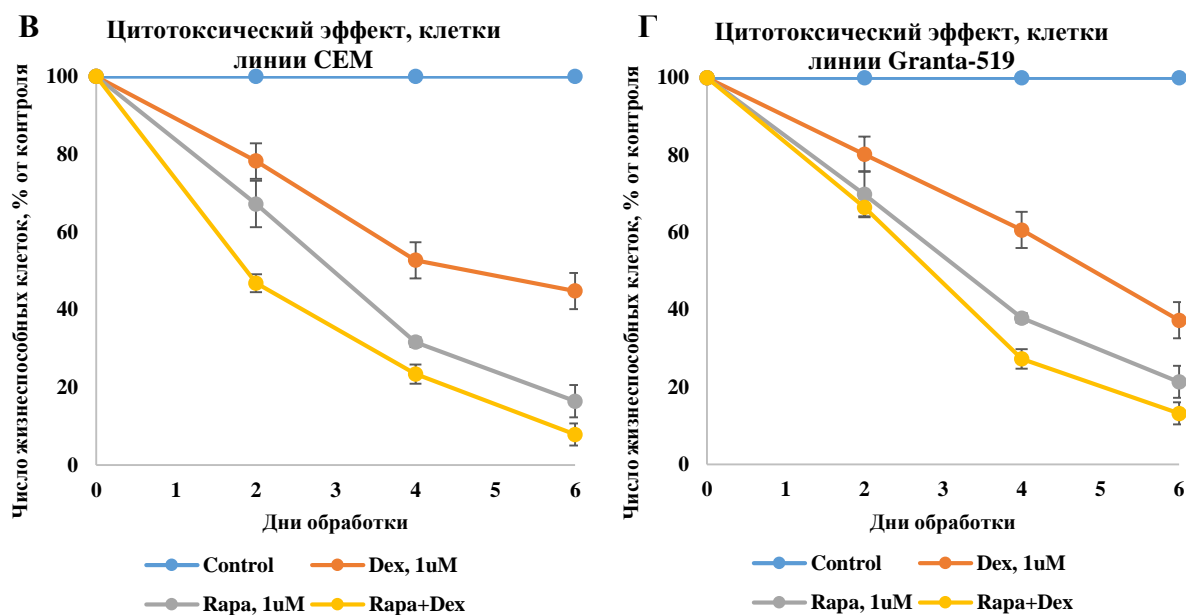
### 3.3.5. Определение совместного антипролиферативного и проапоптотического эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* и глюкокортикоидов

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).

На рисунке 21 представлены результаты оценки цитотоксического эффекта ингибиторов экспрессии *REDD1*. Все выбранные соединения демонстрировали антипролиферативное действие как на клетках линии СЕМ, так и на клетках линии Granta-519. По истечении 144 ч при индивидуальном применении наиболее эффективным соединением оказалось LY294002, он подавлял рост и жизнеспособность клеток линии СЕМ на 85,3%, клеток линии Granta-519 – на 83,8%. Комбинация ингибиторов *REDD1* и Dex усиливала данный эффект по сравнению с индивидуальным применением. Например, при комбинированном применении LY294002+Dex число жизнеспособных клеток составило 6,8% для клеток линии СЕМ и 8,4% для клеток линии Granta-519, при комбинации AZD8055+Dex – 5,4% и 16,2%, при комбинации WM+Dex – 12,9% и 12,3% соответственно. Аналогичный результат был получен и для Rapa, используемого в качестве контрольного соединения, биологические эффекты которого были изучены ранее в отделе химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России [126].







Число жизнеспособных клеток определяли с камеры Горяева в % от контроля. Клетки CEM (А, В) и Granta-519 (Б, Г) культивировали в течение 6 ч в присутствии растворителя (контроль) или ингибиторов экспрессии *REDD1* (AZD8055 (1μкМ), WM (10 μкМ), LY294002 (50 μкМ) и Rapa (1μкМ), затем добавляли растворитель или Dex (1μкМ) и инкубировали в течение 24-144 ч. Данные представлены как  $M \pm SD$  (n=3)

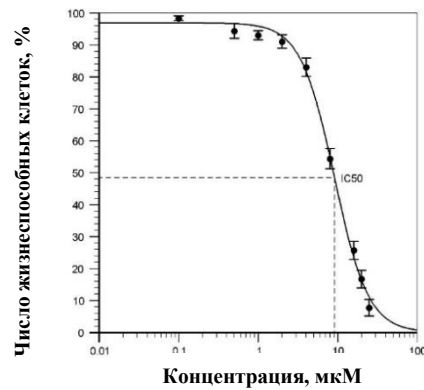
**Рисунок 21** – Цитотоксический эффект ингибиторов экспрессии *REDD1*

Для оценки типа взаимодействий между Dex и ингибиторами PI3K/Akt/mTOR при их совместном воздействии на клетки использовали значения  $IC_{50}$  для данных соединений и Dex после 48 часов обработки (таблица 4, рисунок 22), построили изоболограммы для определения синергизма, аддитивности или антагонизма между ингибиторами PI3K/Akt/mTOR и Dex (как описано в разделе 2.4.).

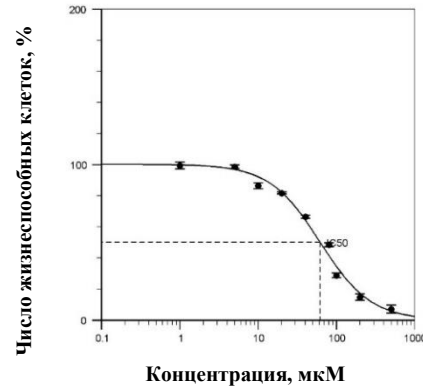
**Таблица 4** – Цитотоксический эффект вортманнина (WM), LY294002, AZD8055; значение  $IC_{50}$  после инкубации 48 ч, μкМ

Соединение	$IC_{50}$ , CEM, μкМ	$IC_{50}$ , Granta-519, μкМ
Вортманнин (WM)	9,145	11,944
LY294002	61,969	77,588
AZD8055	1,358	2,015

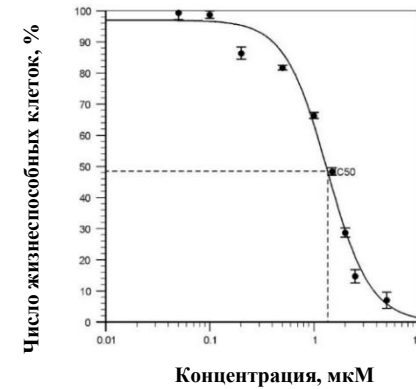
Цитотоксичность, WM, СЕМ



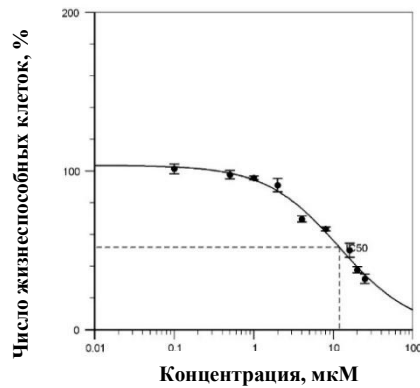
Цитотоксичность, LY294002, СЕМ



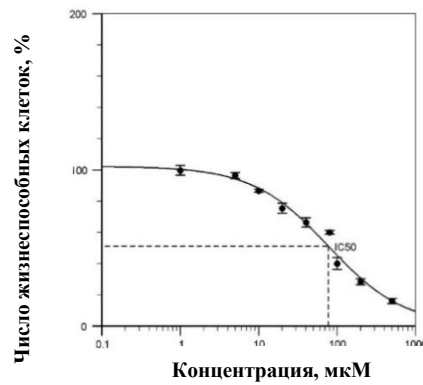
Цитотоксичность, AZD8055, СЕМ



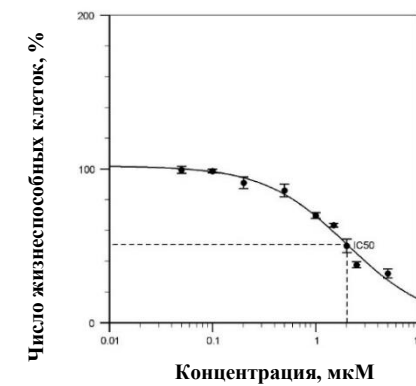
Цитотоксичность, WM, Granta-519



Цитотоксичность, LY294002, Granta-519



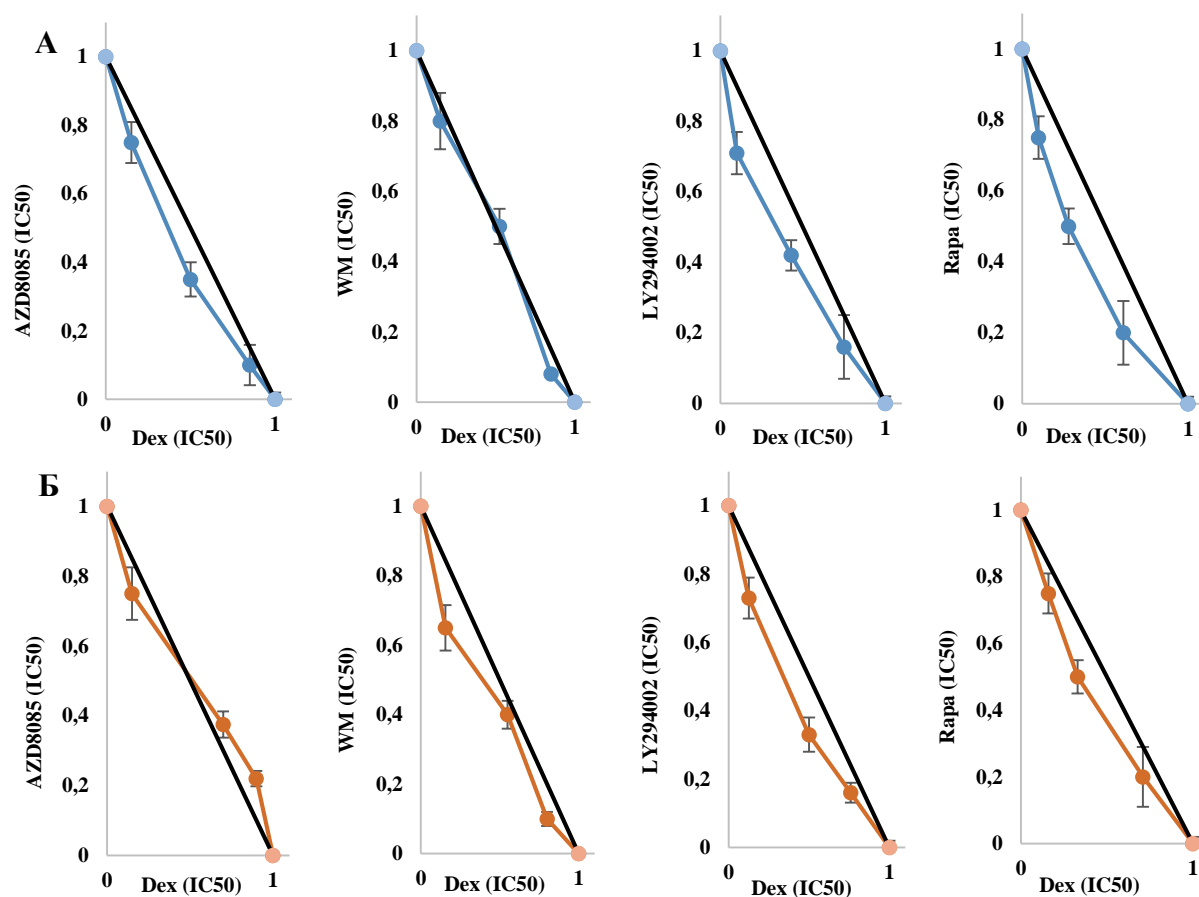
Цитотоксичность, AZD8055, Granta-519



Клетки СЕМ и Granta-519 предварительно обрабатывали растворителем (контроль), LY294002 (1-500 мкМ), WM (0,1-25 мкМ) и AZD8055 (0,05-5 мкМ) в течение 6 ч и обрабатывали либо растворителем, либо глюкокортикоидом Dex (1 мкМ) в течение 48 ч. МТТ-анализ повторяли трижды. Значения IC50 рассчитывали с использованием бесплатного программного обеспечения Quest Graph IC50 Calculator

**Рисунок 22** – Цитотоксический эффект вортманнина (WM), LY294002, AZD8055 на клетках линии СЕМ и Granta-519

Анализ изоболограмм выявил синергизм в антипролиферативных эффектах Dex и LY294002 в обеих типах клеток (Рисунок 23 А, Б). Эффекты комбинации обработки Dex и AZD8055/WM на выживаемость лимфомных клеток были в основном аддитивными, однако в случае применения комбинации Dex и AZD8055 на клеточной линии СЕМ был выявлен синергический эффект. Ранее синергизм был также определен для Dex и эталонного ингибитора экспрессии *REDD1* Rapa.

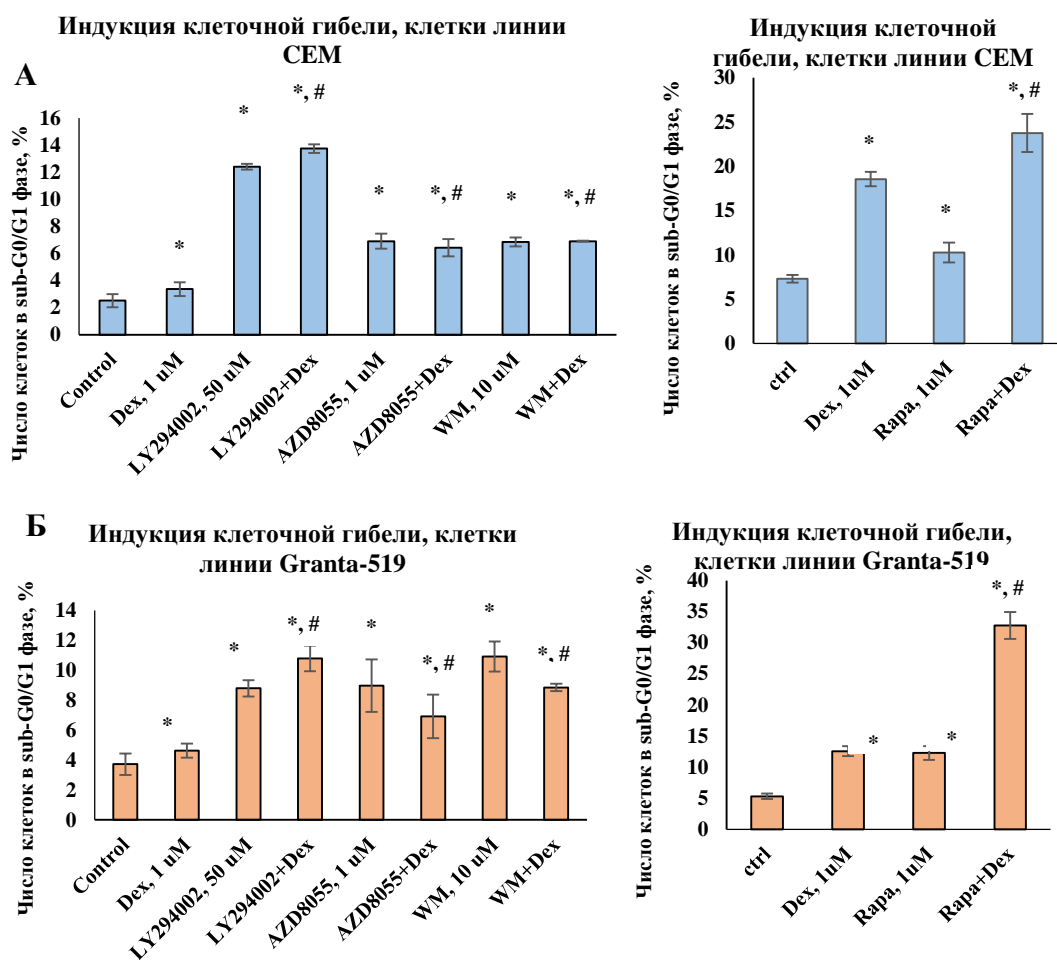


Число жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста в % от контроля. Клетки СЕМ (А) и Granta-519 (Б) культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ) и Rapa (1мкМ), затем добавляли растворитель или Dex (1мкМ) и инкубировали в течение 48 ч. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ )

**Рисунок 23** – Оценка типа взаимодействий комбинации ингибиторов экспрессии *REDD1* и Dex

Затем было исследовано влияние Dex в сочетании с LY294002, AZD8055, WM или Rapa на индукцию клеточной гибели (Рисунок 24 А, Б). 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-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. 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*.

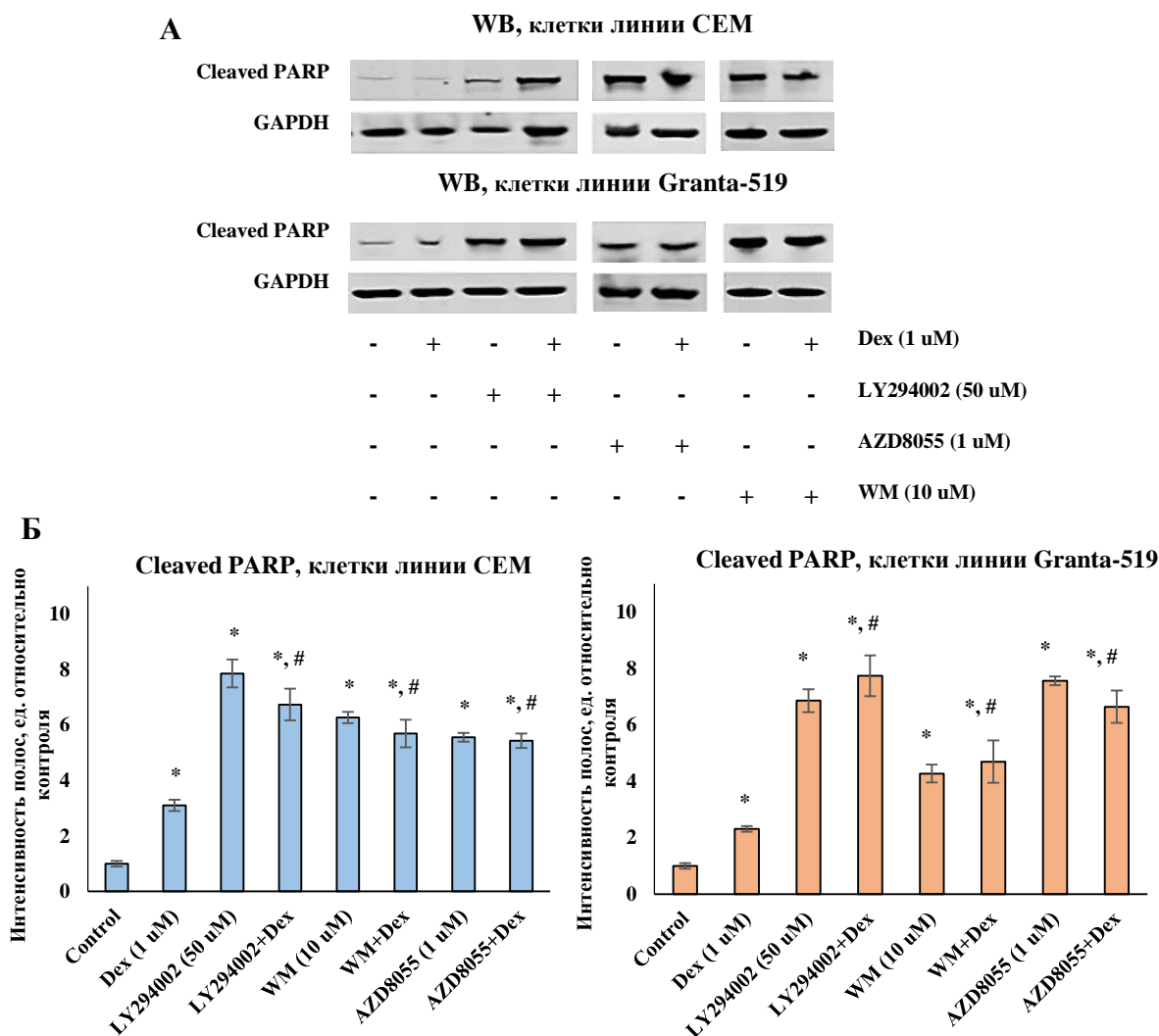


Число клеток определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием окраски пропидий йодидом по гиподиплоидному пику sub-G0/G1. Клетки CEM (А) и Granta-519 (Б) культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1  $\mu$ М), WM (10  $\mu$ М), LY294002 (50  $\mu$ М) и Rapa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

**Рисунок 24** –Индукция клеточной гибели ингибиторов экспрессии *REDD1*

Проапоптотический эффект был подтвержден при анализе расщепления PARP методом вестерн блоттинга (Рисунок 25 А, Б), 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 CEM и в 3,3 раза в клетках линии Granta-519. Вышеуказанные эффекты также

коррелировали с эффектами, полученными для соединения Rara, используемого в качестве положительного контроля.

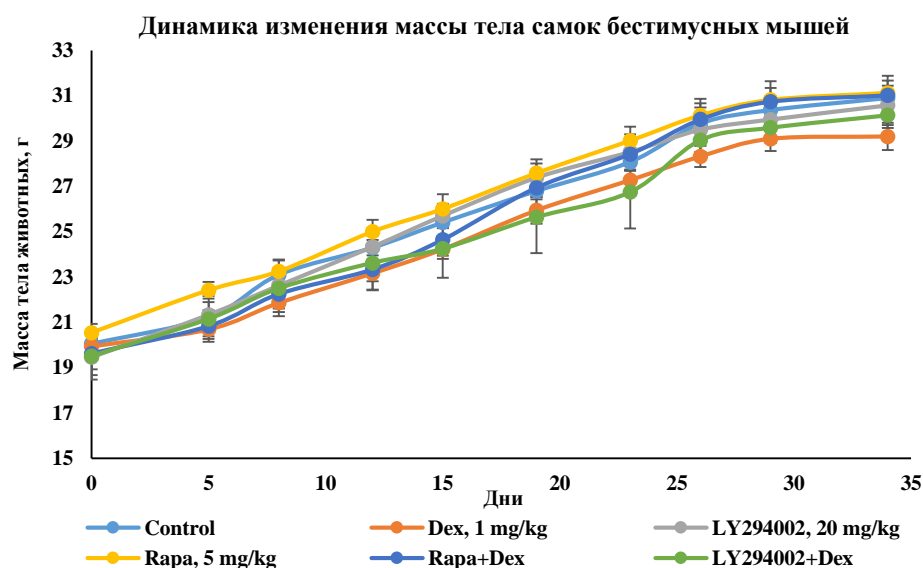


(А) Проапоптотический эффект определяли с помощью Вестерн блоттинга по расщеплению PARP. Клетки CEM (А) и Granta-519 (Б) культивировали в течение 6 ч в присутствии ингибиторов *REDD1* (AZD8055 (1 мкМ), WM (10 мкМ), LY294002 (50 мкМ)), затем добавляли растворитель или Dex (1 мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали Вестерн блоттинг с антителами к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex,  $p < 0,05$

**Рисунок 25** – Проапоптотический эффект ингибиторов экспрессии *REDD1*

### 3.4. Оценка противоопухолевого эффекта ГК в комбинации с ингибиторами экспрессии *REDD1*

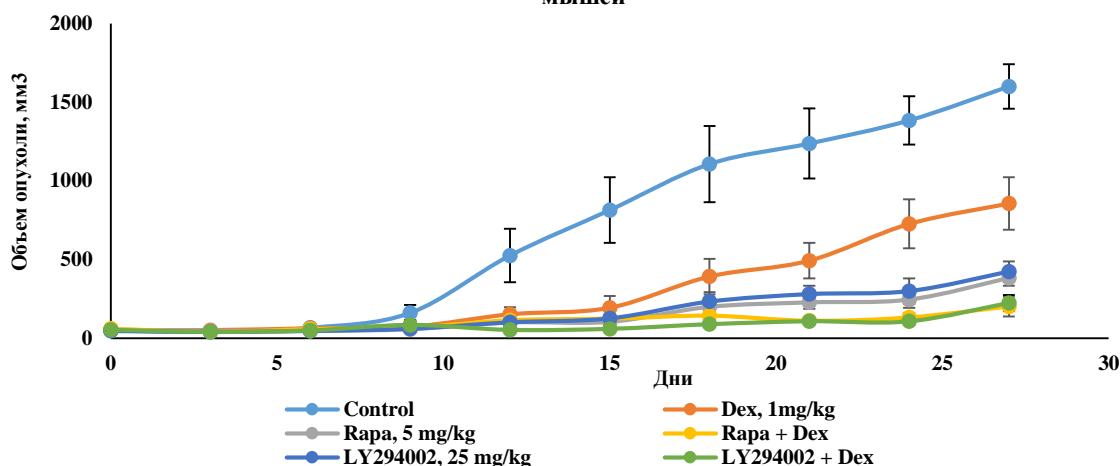
Для оценки степени взаимодействия противоопухолевых эффектов Dex и ингибиторов экспрессии *REDD1* на модели *in vivo* самкам бестимусных мышей *nu/nu* подкожно перевивали клетки линии мантиноклеточной лимфомы Granta-519 в количестве 10 миллионов клеток на мыш. Далее животные были рандомизированы в группы. Лечение начинали по достижении опухолевым узлом объема 50 мм<sup>3</sup>. 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 [126]. 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. Устойчивое увеличение массы тела животных контролировали два раза в неделю (Рисунок 26). Объем опухоли измеряли также два раза в неделю, терапию завершали при достижении в контрольной группе опухолевым узлом объема ~1500 мм<sup>3</sup> (Рисунок 27).



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 26** – Влияние LY294002, Rapa и Dex на массу тела самок бестимусных мышей

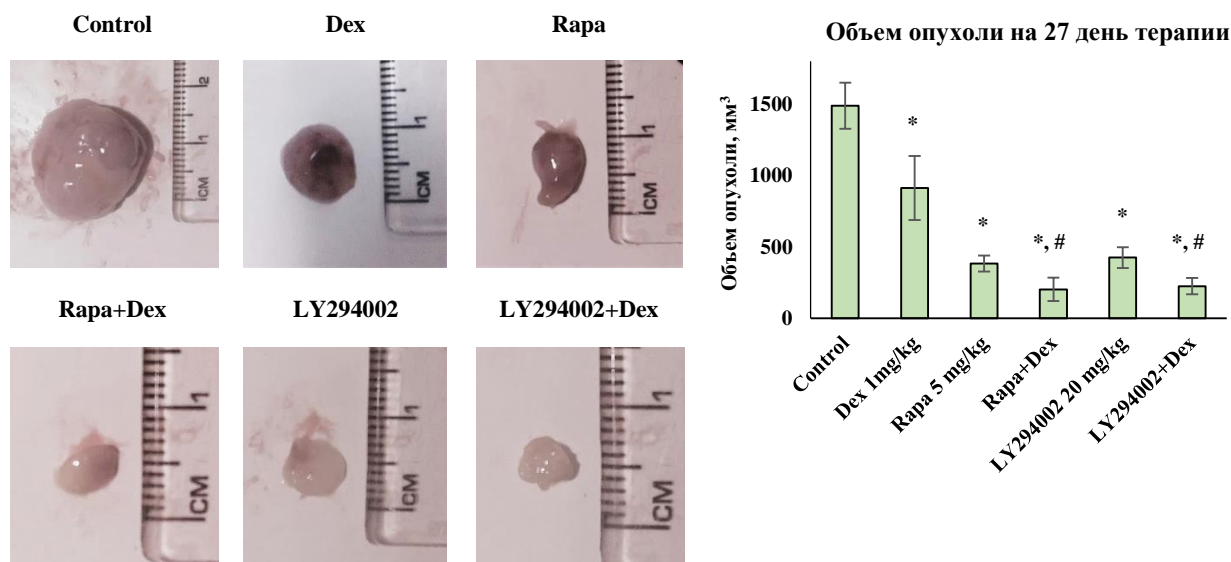
Противоопухолевый эффект LY294002, Rapa и Dex на модели бестимусных мышей



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=10)

**Рисунок 27** – Противоопухолевый эффект LY294002, Rapa и Dex на модели бестимусных мышей

На 27-й день эксперимента средний объем опухоли в контрольной группе составил  $1489 \pm 161,3 \text{ мм}^3$ . В группах, получавших индивидуально Dex или LY294002, объем опухоли уменьшился на ~ 40% и ~ 70% соответственно. (Рисунок 28)



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=10), \* - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex,  $p < 0,05$

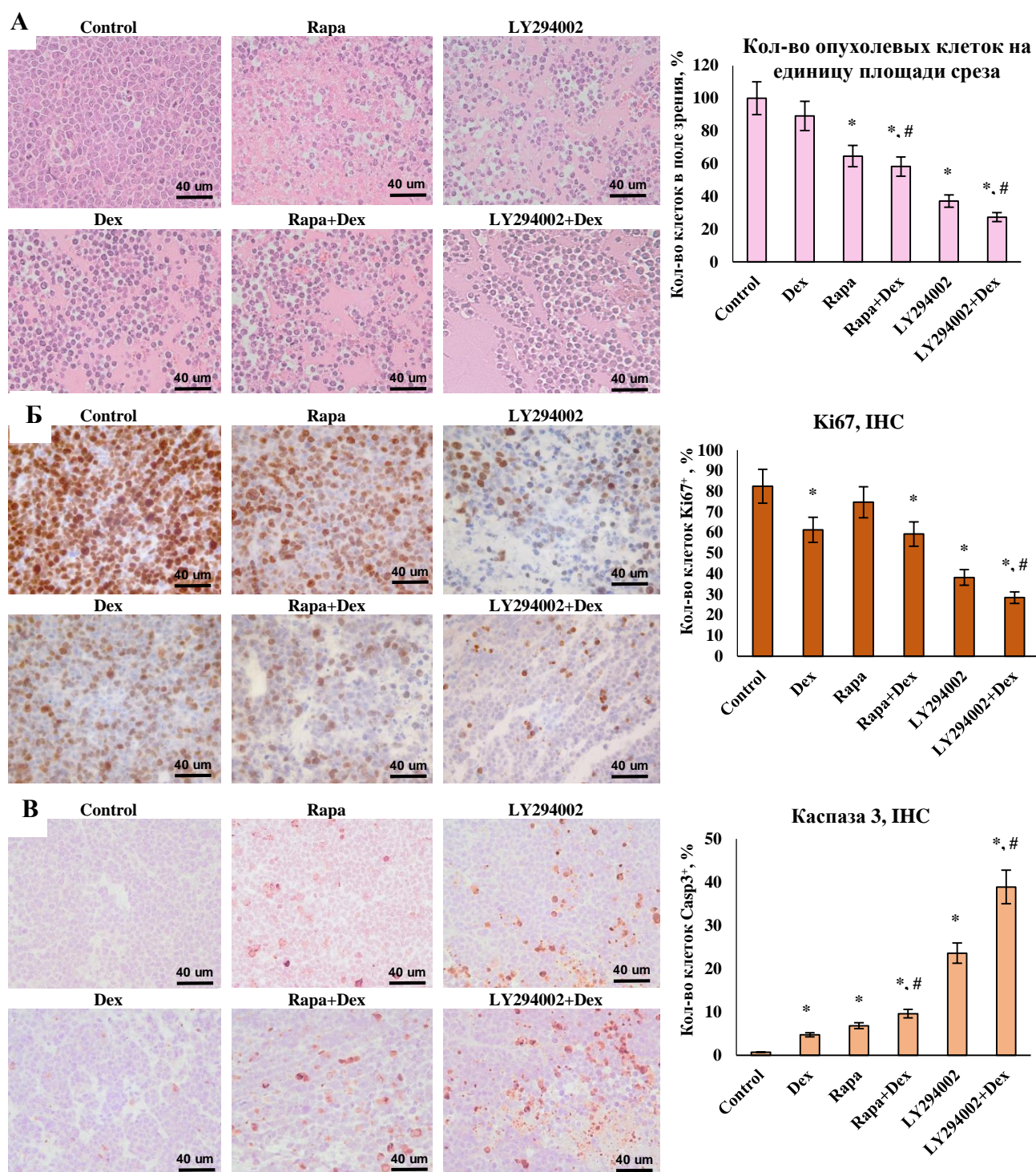
**Рисунок 28** – Торможение роста опухолевого узла на 27 день терапии

Было продемонстрировано заметное уменьшение объема опухоли на 85% в группе LY294002+Dex. Аналогичное противолимфомное действие наблюдалось для групп положительного контроля, получавших Rara и Dex (~ 75% уменьшение объема опухоли в группе, получающей Rara, и ~ 85% в группе, получающей Rara+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 29). 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+Rara (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.



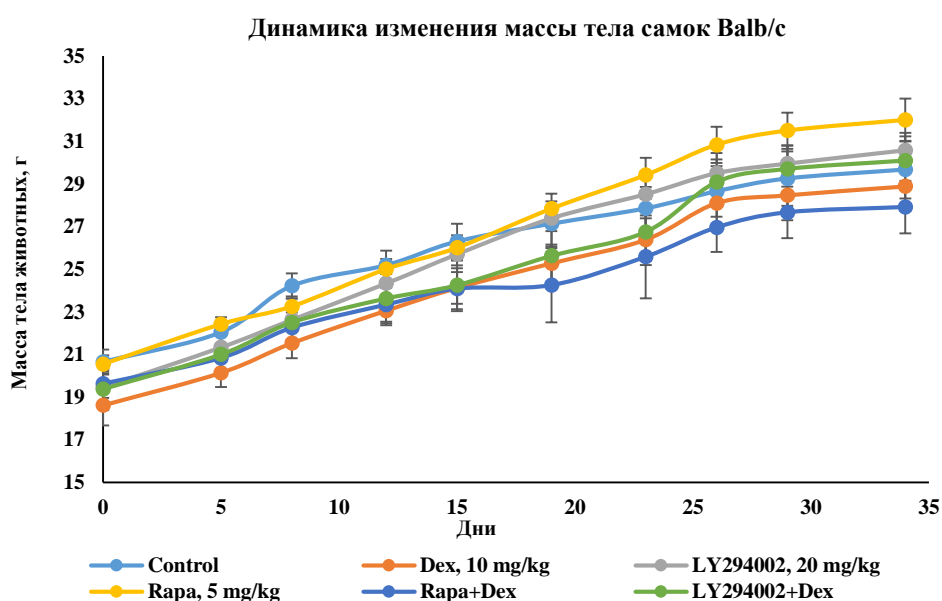


Количественный анализ плотности клеток в опухоли (А), Ki67- (Б) и Casp3- (В) положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином или специфическими антителами к Casp3. Животным вводили внутривенно Dex (1 мг/кг) каждые 48 ч, LY294002 (20 мг/кг) и 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 29** – Оценка эффективности терапии ингибиторами экспрессии *REDD1* и Dex

### 3.5. Исследование системного воздействия LY94002 на ГК-индуцированную атрофию

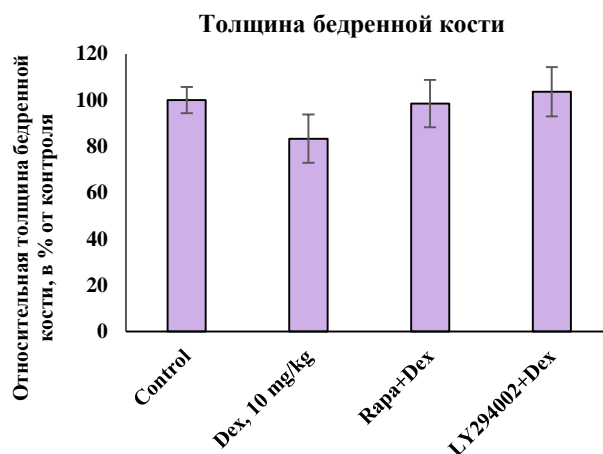
Чтобы оценить способность ингибиторов экспрессии *REDD1* снижать системные атрофические эффекты ГК, была использована ранее описанная модель ГК-индуцированного остеопороза у самок мышей Balb/c. [142] Также оценили атрофию как костей, так и кожи, вызванную инъекциями высоких доз Dex (10 мг/кг) каждые 48 ч в течение 5 недель. LY294002 (20 мг/кг) и Rapa (5 мг/кг) вводили за 6 ч до введения Dex. В ходе исследования так же, как и в предыдущем эксперименте, общее состояние здоровья животных оценивали по массе тела. Было показано устойчивое увеличение массы тела животных во всех группах во время эксперимента (Рисунок 30).



Животным вводили внутривенно 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  $M \pm SD$  (n=10)

**Рисунок 30** – Влияние LY294002, Rapa и Dex на массу тела самок мышей Balb/c

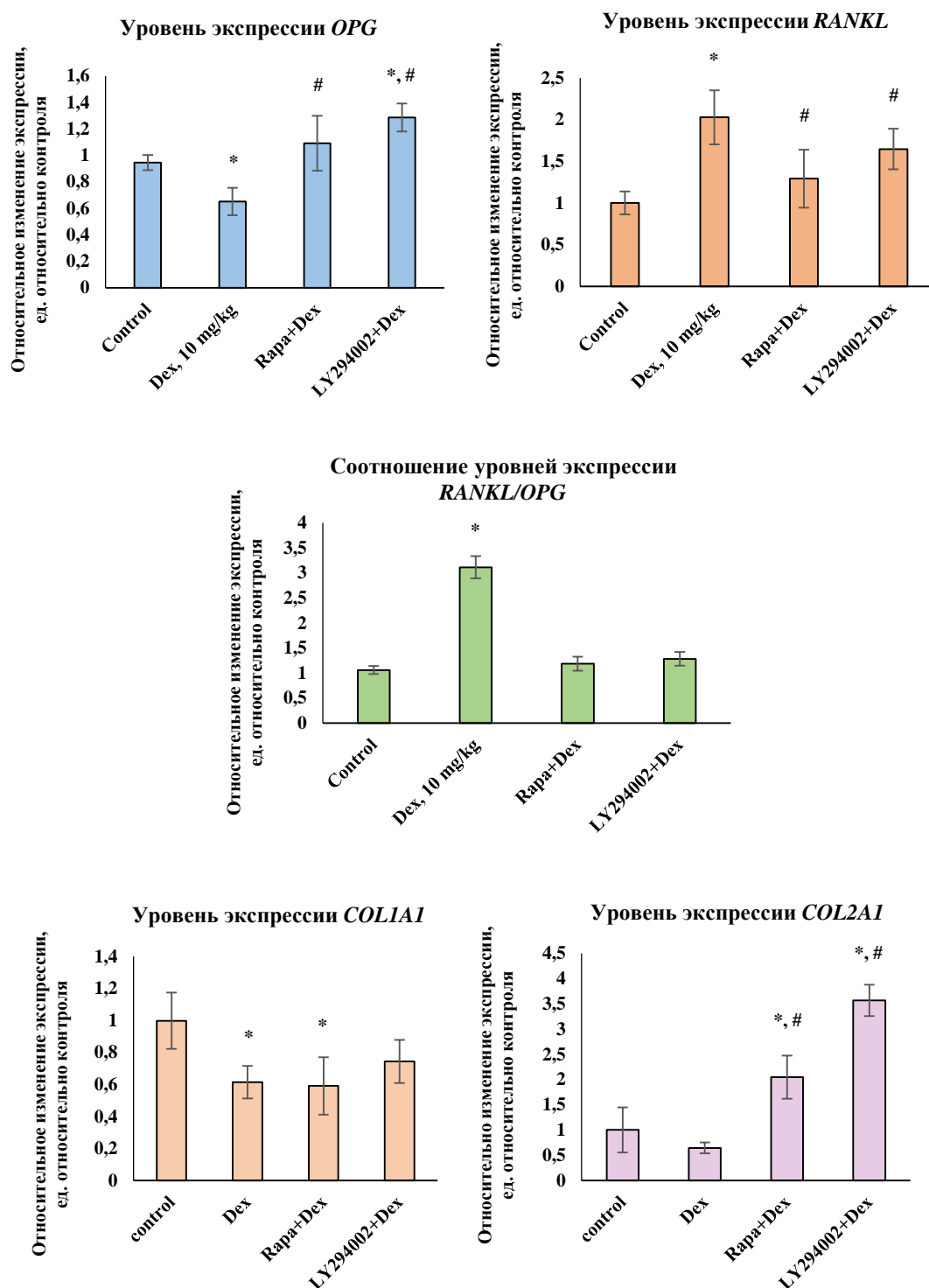
При исследовании влияния выбранных соединений на развитие ГК-индуцированных побочных эффектов была выявлена тенденция к уменьшению толщины бедренной кости между контрольной группой животных и группой, получавшей Dex, однако наблюдаемое изменение не было статистически значимым (Рисунок 31).



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

**Рисунок 31** – Влияние LY294002, Rara и Dex на толщину бедренной кости самок мышей Balb/c

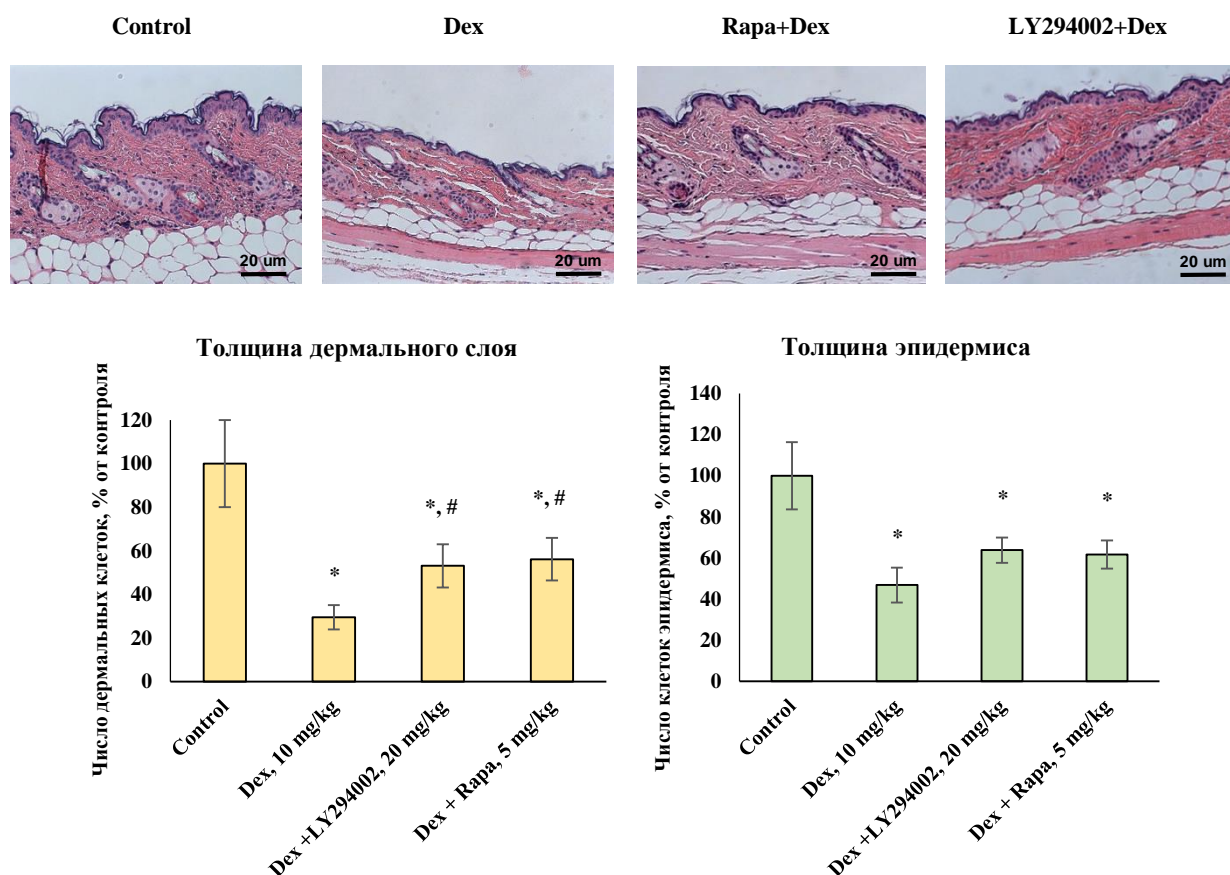
Также были изучены изменения уровней экспрессии широко распространенных маркеров развития остеопороза: гена мембранного белка, цитокина семейства факторов некроза опухоли *RANKL*, связанного с резорбцией кости, и остеопротегерина *OPG*, осуществляющего защитные функции против резорбции кости. Их соотношение (*RANKL/OPG*) показало, что в группе, получавшей Dex, кости бедренной кости начали подвергаться остеопорозу, поскольку соотношение *RANKL/OPG* значительно увеличилось после 5 недель лечения (Рисунок 32). Напротив, LY294002 способствовал подавлению экспрессии *RANKL* и повышению экспрессии *OPG*, что значительно снижало соотношение *RANKL/OPG* к базальному уровню. Более того, снижение экспрессии *COL1A1* и особенно *COL2A1* после хронического лечения Dex было восстановлено в образцах костей от животных, получавших LY294002.



Животным вводили внутривенно 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  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от группы, получавшей Dex,  $p < 0,05$

**Рисунок 32** – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* (А) на экспрессию *OPG* и *RANKL* в бедренной кости, а также (Б) на экспрессию *COL1A1* и *COL2A1* кожи самок мышей Balb/c

Для исследования защитных свойств LY294002 против развития атрофии кожи, вызванной длительной терапией Dex, были оценены морфологические изменения в коже самок мышей Balb/c. Было продемонстрировано, что длительная терапия Dex привела к значительной атрофии кожного покрова: толщина эпидермиса уменьшилась на ~ 50%, а жировая ткань дермы - на ~70% (Рисунок 33). Следует отметить, что LY294002 частично защищал кожу от гипопластических эффектов Dex: кожа, обработанная LY294002+Dex, продемонстрировала только 35% и 45% уменьшение толщины эпидермиса и дермы соответственно.



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

**Рисунок 33** – Влияние ингибиторов экспрессии *REDD1* на толщину эпидермального и дермального слоев кожи самок мышей Balb/c

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ГК эффективно применяются при различных ЗНО СК. Однако развитие побочных эффектов при использовании этих стероидных препаратов значительно ухудшает качество жизни онкопациентов этой группы, а в некоторых случаях делает проведение такой терапии невозможным. В связи с этим поиск подходов к снижению побочных эффектов при проведении противоопухолевой терапии с использованием ГК по-прежнему является актуальной проблемой современной медицины. Развитие побочных эффектов ГК зависит от множества факторов. В частности, важную роль в развитии этих эффектов играет длительность приема ГК, применяемые дозы, путь их введения и др. Наиболее подвержены развитию различных нежелательных метаболических реакций лица детского и юношеского возраста. Для данных возрастных категорий побочные эффекты длительного применения ГК являются особенно критичными, поскольку могут быть причиной задержки роста и полового созревания [212].

Вышеперечисленные проблемы актуализировали разработку новых стероидных и нестероидных селективных активаторов и модуляторов ГР (SEGRAMs) со сниженными побочными эффектами [8, 19, 21]. Разными группами ученых были синтезированы и исследованы многочисленные SEGRAMs, однако не все исследования увенчались успехом. Другим путем для решения поставленных задач были попытки ограничить системные побочные эффекты ГК с помощью пролекарств на основе ГК, которые действуют таргетно, а затем подвергаются дезактивации [158]. К сожалению, только несколько SEGRAMs прошли клинические испытания. К примеру, PF-04171327 (Фосдагрокорат) и AZD9567 проходили клинические испытания для лечения ревматоидного артрита, а AZD5423 и AZD7594 – для лечения хронической обструктивной болезни легких и астмы, соответственно [124]. Однако в клинической онкологии данный тип соединений исследован не был.

Альтернативным подходом к решению проблемы предупреждения развития побочных эффектов ГК является поиск и исследование генов, влияющих на сигнальные пути, вовлеченные в развитие различных побочных эффектов. В ранее проведенных исследованиях было показано, что в ответ на действие разных стрессорных факторов, включая ГК, происходит активация экспрессии гена *REDD1*. Известно, что комплекс «лиганд-рецептор» (ГК-ГР) может активировать экспрессию *REDD1* за счет взаимодействия с ГРЭ (механизм транс-активации). Известно, что ген *REDD1* оказывает воздействие на комплекс mTORC1, а изменение экспрессии данного гена вносит вклад в развитие нежелательных метаболических реакций и патогенез целого ряда заболеваний [42, 126, 186]. Это свидетельствует о необходимости изучения эффектов низкомолекулярных соединений, ингибирующих

экспрессию гена *REDD1*, с целью профилактики развития побочных эффектов ГК при их использовании в противоопухолевой терапии.

Для выбора наиболее перспективных ингибиторов экспрессии *REDD1* были использованы результаты биоинформатического анализа транскриптомов разрешенных лекарственных препаратов (около 20 тысяч) расширенной базы данных LINCS (Library of Integrated Cellular Signatures) [67]. Перепрофилирование лекарственных средств является широко используемым подходом современной фармацевтики [14, 18], поскольку позволяет значительно снизить время и затраты на доклинические исследования, так как для разрешенных препаратов они уже были проведены ранее. По данным биоинформатического скрининга около 50% потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* являются соединениями класса ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), ключевой составляющей сигнального пути PI3K/AKT/mTOR, контролирующего рост и жизнеспособность клеток, а также их злокачественную трансформацию. Для данного исследования среди наиболее активных предполагаемых ингибиторов экспрессии *REDD1* были выбраны 3 из наиболее активных препаратов – вортманнин (WM), LY294002 и AZD8055 [125]. В качестве положительного контрольного препарата по ингибированию *REDD1* был выбран Рара, эффекты которого были изучены ранее [126]. WM является противогрибковым препаратом, механизм действия которого заключается в индукции апоптоза путем ингибирования фосфоинозитид-3-киназ. В настоящее время изучают активность WM в качестве противоопухолевого препарата. В частности, было показано, что WM повышает противоопухолевый эффект доцетаксела в отношении клеток рака легкого H460 и предстательной железы PC3 *in vitro*, а также в отношении ксенотрансплантатов, формируемых этими клетками у бестимусных мышей [29]. Также проводятся исследования LY294002 на клеточных линиях и мышинных моделях рака желудка, предстательной и молочной железы [64, 103, 220]. По данным <https://clinicaltrials.gov/> LY294002 был включен в клинические испытания по лечению нейробластом. AZD8055 является ингибитором mTORC1/mTORC2 и PI3K. Ранее было показано, что AZD8055 проявляет цитостатический эффект на моделях ксенографтов различных типов опухолей человека, а также повышает чувствительность к химиопрепаратам клеток рака молочной железы [185, 216, 224]. В качестве ингибиторов экспрессии гена *REDD1* и модуляторов эффектов ГК данные соединения изучены не были.

Известно, что активация PI3K приводит к фосфорилированию и активации Akt, что, в свою очередь, индуцирует mTOR как в комплексе mTORC1, так и в mTORC2 [65]. Таким образом, было предположено, что выбранные ингибиторы могут в некоторой степени влиять на все ветви передачи сигналов PI3K/Akt/mTOR.

Для исследования эффектов потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* в клетках ЗНО СК были выбраны линии МКЛ Granta-519 и ОЛЛ СЕМ, которые широко используются для скрининга новых химиотерапевтических средств для лечения рака крови [127, 128, 183]. Основываясь на ранее проведенных исследованиях, в качестве оптимального режима обработки клеток был выбран следующий: обработка ингибиторами экспрессии *REDD1* в течение 6 ч с последующей обработкой Dex в течение 24 ч [25, 126].

Известно, что ингибиторы PI3K/Akt/mTOR могут значительно ингибировать экспрессию Akt/mTOR – генетического регулятора *REDD1*. В ранее проведенных исследованиях было показано, что экспрессия *REDD1* регулируется по механизму обратной связи как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Это подтверждает существование петли обратной связи в передаче сигналов Akt/mTOR [126]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляции транскрипции *REDD1* на базальном уровне посредством mTOR, еще изучены недостаточно. Известно также, что mTOR регулирует протеасомную деградацию *REDD1* и, таким образом, ингибиторы mTOR могут снижать стабильность белка *REDD1* [199].

На первом этапе данной работы были исследованы эффекты ингибиторов экспрессии *REDD1* на предмет их цитотоксической активности, а также для подбора оптимальных рабочих концентраций. Выбранные соединения в рабочих, близких к IC20 концентрациях (50 мкМ для LY294002, 1 мкМ для AZD8055 и 10 мкМ для WM) значительно снижали выживаемость клеток линии СЕМ и Granta-519 как при индивидуальном применении, так и при комбинации с Dex (1 мкМ, IC20), концентрация которого была выбрана на основании ранее проведенных исследований. При этом наблюдалась тенденция к кооперативному действию ингибиторов и Dex. В то же время нормальные лимфоциты, полученные от здоровых доноров, были значительно более устойчивы к цитотоксическим эффектам соединений при комбинированной обработке.

Для оценки типа взаимодействий между ГК и ингибиторами экспрессии *REDD1* были построены и проанализированы изоболограммы, в ходе чего был выявлен синергизм антипролиферативных эффектов Dex и LY294002 клетках обоих типов. Ранее синергизм был определен для эталонного ингибитора *REDD1* Rapa в комбинации с FA [126] и Dex [120]. Эффекты комбинации обработки Dex и AZD8055/WM на выживаемость лимфомных клеток были в основном аддитивными. В случае применения комбинации Dex и AZD8055 в клетках линии СЕМ был выявлен синергический эффект.

Индукцию клеточной гибели как при индивидуальной обработке Dex, так и в комбинации с ингибиторами экспрессии *REDD1*, оценивали по увеличению гиподиплоидного пика sub-G0/G1. Было показано, что все выбранные соединения индуцировали клеточную гибель в клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ и мантийноклеточной лимфомы



Granta-519. Эти данные коррелировали с полученным результатами по степени подавления роста и жизнеспособности *in vitro*. Проапоптотический эффект был исследован методом вестерн блоттинга по степени расщепления PARP. Исходя из полученных результатов, был сделан вывод о том, что проапоптотические эффекты между LY294002 и Dex в клетках линии СЕМ носят кооперативный характер.

Противоопухолевую активность исследуемого соединения *in vitro* в настоящее время оценивают по степени запуска цитотоксического и проапоптотического механизма на клеточных моделях. Таким образом, в данной работе была показана ГР-зависимая противоопухолевая активность ингибиторов экспрессии *REDD1 in vitro*. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что выбранные ингибиторы *REDD1* являются потенциальными кандидатами для доклинических исследований в качестве компонента комбинированной химиотерапии ЗНО СК.

Для исследования степени запуска механизмов, ответственных за развитие нежелательных побочных реакций и осуществление основного терапевтического эффекта, т.е. транс-активации и транс-репрессии, был выбран ряд генов, уровень экспрессии которых является маркером вышеупомянутых процессов. Поскольку комплексы «лиганд-рецептор» формируют гомодимеры и связываются с ГРЭ ДНК, запуская тем самым механизм транс-активации, то это приводит к повышению экспрессии ряда про-воспалительных и антиапоптотических генов. С помощью метода количественной ПЦР были оценены изменения экспрессии ГК-индуцируемых генов-мишеней: белка-шаперона ГР *FKBP51* [25, 127], медиатора противовоспалительных эффектов ГК *GILZ* [76, 223], активатора транскрипции *KLF9* [123] и ингибитора продукции цитокинов *MKP1* [207], являющихся маркерами индукции механизма транс-активации. Было показано, что комбинированное применение ингибиторов экспрессии *REDD1* с Dex подавляет ГК-индуцированный запуск механизма транс-активации *in vitro*.

Механизм ДНК-независимой транс-репрессии, основан на взаимодействии ГР с различными транскрипционными факторами, инициаторами пролиферации, воспаления, клеточной адгезии [225]. Для оценки степени запуска данного механизма в клетках линии острого лимфобластного лейкоза СЕМ были использованы гены семейства циклинов D-типа, играющих важную роль в регуляции клеточного цикла, дифференцировке и злокачественной трансформации, а также содержащие в промоторной области сайты связывания одного из основных ядерных транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B, – циклин D1 (*CCND1*) и циклин D2 (*CCND2*). В результате исследования их активности было показано снижение ГК-индуцированной экспрессии вышеописанных генов, что свидетельствует о снижении активности этих факторов и их сигнальных путей. Однако, как было описано ранее в разделе

1.1.2., хромосомная транслокация t(11;14)(q13;q32) при мантийноклеточной лимфоме приводит к конститутивной гиперэкспрессии гена циклина D1 *CCND1*, а также данная нозология может нести транслокации в гене циклина D2 *CCND2*. Таким образом, использование данных маркеров для исследования механизма транс-репрессии является нецелесообразным, поскольку повышенный уровень экспрессии вышеупомянутых генов не позволяет зафиксировать изменения даже при применении высоких доз ГК [22]. При исследовании степени запуска вышеуказанного механизма в клеточной линии Granta-519 в качестве маркеров были использованы ген рецептора интерлейкина 7 *IL7R* [130], участвующий в выживаемости лимфоидных клеток, и ген трансмембранного белка антиген-представляющих клеток *CD86*, являющийся маркером злокачественности лимфоидных клеток. Было показано, что комбинация выбранных ингибиторов экспрессии *REDD1* в комбинации с Dex осуществляет негативную регуляцию *IL7R*, однако данный эффект был менее выражен в случае исследования экспрессии гена *CD86*.

Чтобы идентифицировать молекулярные механизмы, лежащие в основе функциональных изменений ГР, вызванных ингибиторами PI3K/Akt/mTOR, было оценено, как эти соединения влияют на основные этапы активации ГР: фосфорилирование ГР по Ser211 и ядерную транслокацию, которые имеют решающее значение для механизма транс-репрессии [50, 84]. Ингибирование механизма транс-активации сопровождалось ингибированием фосфорилирования ГР и снижением его транслокации в ядро. Известно, что ГР фосфорилируется по множеству остатков митоген-активируемыми протеинкиназами (МАРК), циклин-зависимым киназами (CDK), казеинкиназой II (СК2) и киназой гликогенсинтазы-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) [50, 107]. Следует отметить также, что некоторые ингибиторы PI3K, такие как LY294002, действительно обладают нецелевыми эффектами, опосредованными связыванием с белками BET (белками бромодомена и экстра-терминального мотива), регулируемыми ацетилирование гистонов. Поскольку ГР также участвует в эпигенетической регуляции экспрессии генов, возможная перекрестная связь между передачей сигналов ГК/ГР и BET может влиять на экспрессию генов-мишеней ГР, особенно цитокинов и хемокинов, участвующих в противовоспалительном ответе ГК [62, 175, 176]. Также было показано, что ингибиторы PI3K/Akt/mTOR способны модифицировать функцию ГР, сдвигая активность в сторону терапевтически важного механизма транс-репрессии как в лимфоидных клетках, так и в эпителиальных клетках, оцененную путем люциферазного теста и изменений транскриптома [25, 126]. Полученные результаты также подтвердили эти данные. Эти эффекты могут лежать в основе механизма обратной связи в передаче сигналов PI3K/Akt/mTOR при воздействии ГК.

Ранее было показано, что Akt может непосредственно участвовать в фосфорилировании и влиянии на функции ГР [92]. Эти данные литературы позволяют предположить, что ингибиторы PI3K/Akt/mTOR влияют на процесс фосфорилирования ГР посредством киназ, поскольку известно о взаимодействии mTOR и Akt с сигнальными путями, в которые вовлечены p38 и GSK-3 $\beta$  [50, 107]. Также увеличение активации транс-репрессии, связанной с противовоспалительным и противоопухолевым действием ГК, свидетельствует о негативном эффекте ингибиторов PI3K на активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [25, 126].

Направленные изменения функции ГР, а именно подавление транс-активации, и, в частности, подавление экспрессии атрофогена REDD1, предполагают, что ингибиторы PI3K/Akt/mTOR действительно могут защищать ткани от стероидной атрофии.

Используя модели стероидной атрофии – атрофию кожи и остеопороз, были подтверждены защитные эффекты ингибиторов PI3K при системном действии ГК. Полученные в ходе проведенного исследования данные хорошо согласуются с результатами, полученными ранее, свидетельствующими о роли *REDD1* в атрофии кожи и мышц [32, 41], однако на модели остеопороза роль *REDD1* была продемонстрирована впервые. Механизмы атрофических эффектов ГК сложны и зависят от ткани. В коже и мышцах профиль экспрессии генов после активации ГР оказался схожим [32], и в тканях обоих типов ГК значительно смещают метаболизм в сторону катаболических процессов, которые влияют на липиды, сфинголипиды, белки [32, 186]. Атрофия кожи, вызванная стероидами, затрагивает все участки кожи и приводит к изменениям синтеза коллагена, атрофии эпидермиса и кожного жира [94, 115, 184].

В костной ткани ГК вызывают сдвиг популяций костных клеток в сторону остеокластов, резорбирующих кость, за счет увеличения образования остеокластов и ингибирования пролиферации костеобразующих остеобластов, что приводит к повышенному риску хрупкости и переломов костей [83]. Один из основных сигнальных путей, который регулирует образование остеокластов из их предшественников, а также их активацию и выживание во время нормального ремоделирования кости и при различных патологических состояниях, опосредуется передачей сигналов RANK (активатор рецептора ядерного фактора  $\kappa$ B)/RANKL (лиганд RANK) [39]. Другим важным регулятором остеокластов является цитокин остеопротегерин (OPG), который действует как рецептор-ловушка для RANKL. Таким образом, OPG защищает скелет от чрезмерной резорбции кости, а соотношение RANKL/OPG часто используется в качестве важного фактора, определяющего костную массу и целостность скелета [39]. Белки семейства коллагена (особенно Coll1A1, полиморфизм

которого связан с возрастным остеопорозом) также играют ключевую роль в формировании, структуре и минерализации костей [38, 52].

Путь PI3K/AKT/mTOR играет центральную роль в регуляции роста и выживания лимфоидных клеток, а конститутивная активация PI3K часто наблюдается при различных типах лимфоидных злокачественных новообразований [58, 164]. Важно отметить, что в нашей работе комбинация ГК с ингибиторами PI3K/AKT/mTOR усиливала противолимфомные эффекты Dex *in vitro* и *in vivo*, а терапевтические эффекты комбинаций ингибиторов экспрессии *REDD1* и Dex варьировали от аддитивных до синергических. Известно, что основными эффектами ГК в трансформированных лимфоидных клетках являются ингибирование роста и апоптоз [27, 162]. Таким образом, была оценена пролиферативную активность клеток на модели ксенографтов, а также апоптоз путем иммуноокрашивания маркера пролиферации Ki67 и апоптоза каспазы 3. Было продемонстрировано наименьшее количество Ki67-позитивных клеток и наибольший процент апоптотических клеток в группе животных, получавших комбинацию LY294002 и Dex, что дополнительно подтвердило, что совместное действие LY294009 усиливает противолимфомные эффекты дексаметазона.

Механизм, лежащий в основе кооперативной цитотоксичности ингибиторов PI3K и ГК, может включать ослабление ГК-индуцированной аутофагии, способствующей выживанию, и переход к ГК-зависимому апоптозу в клетках, с ингибированным *REDD1*. Интересно, что фармакологическое ингибирование PI3K, mTOR и Akt может преодолевать устойчивость и повышать чувствительность лейкозных клеток к ГК [145].

В целом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования соединений из класса ингибиторов PI3K/Akt/mTOR для предотвращения атрофических эффектов, вызванных хроническим системным лечением ГК. Комбинация ингибиторов экспрессии *REDD1* и ГК представляется особо перспективной для лечения лимфом благодаря их синергическому противолимфомному эффекту. Полученные в результате представленного исследования данные о профилактическом воздействии ингибиторов *REDD1* на развитие побочных атрофических эффектов ГК дают основание предположить, что и другие побочные эффекты ГК могут быть предупреждены воздействием препаратов изучаемой группы, что раскрывает новые направления исследований в области использования ГК в онкологической и общей медицинской практике.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ГК активно используются в терапии ряда ЗНО СК в качестве противоопухолевых препаратов и при химиотерапии различных ЗНО цитостатиками в качестве модификаторов токсических эффектов и эффективности терапии, позволяющих снизить токсические эффекты и повысить эффективность лечения. Это обуславливает необходимость длительного использования ГК в терапии ЗНО. Однако продолжительное применение ГК приводит к развитию тяжелых побочных эффектов, таких как асептический некроз, диабет, синдром Иценко-Кушинга, акромегалия, различные метаболические нарушения. Как известно, ГР регулирует экспрессию генов с помощью двух основных механизмов: (1) транс-активации, которая требует связывания гомодимера ГР с респонсивными элементами в промоторах генов, вызывая активацию их экспрессии и (2) транс-репрессии, опосредованной связыванием ГР с другими транскрипционными факторами, в том числе провоспалительными и пропролиферативными NF- $\kappa$ B, AP-1 и STAT, и ингибированием их активности, а также связыванием ГР с менее консервативными негативными респонсивными элементами. В последние годы было установлено, что одним из основных механизмов развития побочных эффектов хронического приема ГК является активация экспрессии гена *REDD1*, запускаемая по механизму транс-активации. Основная функция белкового продукта этого гена – ингибирование сигнального пути mTOR, функционирование которого важно в ответе клетки на различные стрессорные воздействия, такие как гипоксия, дефицит питательных веществ, повреждение ДНК, а также гормоны стресса, и ГК в том числе. Было продемонстрировано, что мыши с дефицитом *REDD1* более устойчивы к ГК-опосредованной атрофии мышц кожи, а также к остеопорозу.

Этот прогресс в понимании закономерностей функционирования ГР позволил предложить новый подход к решению проблемы преодоления побочного действия ГК путем подавления экспрессии гена *REDD1* какими-либо ингибиторами. Современный биоинформатический анализ эффектов лекарственных препаратов, разрешенных к применению в клинической практике, стал основой для выбора возможных ингибиторов экспрессии *REDD1*, а именно, вортманнина, AZD8055 и LY294002. Изучению влияния этих соединений на функционирование ГР посвящено представленное исследование: проведена оценка цитотоксичности этих препаратов и их влияния на функциональную активность ГР, изучены эффекты их комбинированного использования с ГК на опухолевые клетки ряда ЗНО СК *in vitro* и, наконец, проведен анализ их влияния на терапевтические и побочные эффекты ГК при моделировании опухолевого процесса, остеопороза и атрофии кожи *in vivo*. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы, изложенные ниже.

## 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 Ser<sup>211</sup> 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 СОКРАЩЕНИЙ**

- 14-3-3 – белок семейства консервативных регуляторных молекул
- АКТГ – адренкортикотропный гормон
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФК – активная форма кислорода
- БГ – болезнь Гентингтона
- БП – болезнь Паркинсона
- ВГЧ-4, 8 – вирус герпеса человека 4, 8 типа (HHV-4, 8 - Human herpesvirus 4, 8)
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека (HIV - Human immunodeficiency virus)
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ВЭБ – вирус Эпштейна-Барр (EBV - Epstein-Barr virus)
- ГГНС - гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
- ГК – глюкокортикоид
- ГР – рецептор глюкокортикоидов
- ГРЭ – глюкокортикоид респонсивный элемент
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ЗНО – злокачественное новообразование
- ЛБ – лимфома Беркитта
- ЛХ – лимфома Ходжкина
- МДС – миелодиспластический синдром
- МКБ-10 – Международная классификация болезней Десятого пересмотра
- МКБ-О – Международная классификация онкологических заболеваний
- МКЛ – мантийноклеточная лимфома
- МПН – миелопролиферативное новообразование
- МР – рецептор минералокортикоидов
- НАДФ - никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- НКЛ – нейтрофильная внеклеточная ловушка
- НХЛ – неходжкинская лимфома
- ОЛНКТ – острый лейкоз неуточненного клеточного типа
- ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
- ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
- ПКПР – плоскоклеточная карцинома полости рта

ПЛЦНС - первичная лимфома центральной нервной системы  
 ПТЛЗ – посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание  
 ПТСД – посттрансплантационный сахарный диабет  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 РНК – рибонуклеиновая кислота  
 САК – субарахноидальное кровоизлияние  
 СД – синдром Дауна  
 СК – система крови  
 СКВ – системная красная волчанка  
 ССЛ – семейная средиземноморская лихорадка  
 СФ – стрессовый фактор  
 УКМП – уротелиальная карцинома мочевого пузыря  
 ЭФМ – эмбриональные фибробласты мыши  
 4E-BP1 – белок 1, связывающий фактор инициации 4E у эукариот  
 5-HT1A – серотониновый рецептор подсемейства 5-HT1-рецепторов  
 $\alpha$ ENaC – эндотелиальный натриевый канал  $\alpha$   
 ABL1, 2 – тирозин-протеинкиназа 1, 2  
 АСС - ацетил-КоА-карбоксилаза  
 Akt – серин-треониновая протеинкиназа семейства В  
 AP1 – транскрипционный фактор, активирующий белок-1  
 AS160 – субстрат Akt 160 кДа  
 ATGL – липаза триглицерида жировой ткани  
 ATM – серин-треониновая протеинкиназа, мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок (ataxia telangiectasia mutated)  
 AZD8055 – ингибитор сигнального пути PI3K/Akt/mTOR  
 Bcl-x1 – антиапоптотический трансмембранный митохондриальный белок  
 BCR – фрагмент гибридного белка, продукта гибридного гена BCR-ABL1  
 BIRC3 – бакуловиральный белок, содержащий повтор IAP3  
 BNIP3L – BCL2 подобный белок 3  
 BRAF – протоонкоген B-Raf, серин-треониновая киназа  
 BTLA – белок, ассоциированный с В- и Т-лимфоцитами  
 c-Jun – протоонкоген Jun, субъединица фактора транскрипции AP-1  
 c-KIT – рецептор тирозинкиназ  
 CALR - кальретикулин  
 CBL – протоонкоген, убиквитин-протеинлигаза E3



CCND1/CCND2 – циклин D1/D2  
 CD200 – антиген, идентифицированный моноклональным антителом MRC OX-2  
 CD86 – антиген активации Т-лимфоцитов  
 CDKN2A/CDKN2B – циклинзависимый ингибитор киназы 2A/2B  
 CEBPА – альфа-связывающий белок-усилитель ССААТ  
 CIAP1, 2 – бакуловирусный белок, содержащий повторы IAP 1, 2  
 COL1A1,2 – альфа-1 коллаген 1/2 типа  
 COL7A1 – альфа-7 коллаген 1 типа  
 COMP – белок олигомерного матрикса хряща  
 CPT-1 – карнитин-О-пальмитоилтрансфераза  
 Cre – рекомбиназа  
 CREBBP – CREB-связывающий белок  
 CRLF2 – цитокиновый рецептороподобный фактор 2  
 CSF1R – рецептор колониестимулирующего фактора 1  
 Ctsk – катепсин К  
 DBD – ДНК-связывающий домен  
 Dex – дексаметазон  
 Dig2 – ген 2, индуцируемый дексаметазоном  
 DNMT3A – ДНК (цитозин-5 -) - метилтрансфераза 3 альфа  
 EBF1 – фактор транскрипции ранних В-клеток 1  
 Erk – внеклеточная регулируемая MAP-киназа  
 ET-1 – эндотелин-1  
 ETV6 – фактор транскрипции варианта ETS 6  
 EZH2 – энхансер субъединицы 2 репрессивного комплекса zeste 2 polycomb  
 FA - флуоцинолон ацетонид  
 FASN – синтаза жирных кислот  
 FBXW7 – белок 7, содержащий повтор F-box/WD  
 FGFR1 – фактор роста фибробластов  
 FIP1L1 – фактор, взаимодействующий с PAPOLA и CPSF1  
 FKBP51/FKBP52 – FK506-связывающий белок  
 FLT3 – CD135 или fms-подобная тирозинкиназа 3  
 FOXO – фактор транскрипции «коробка с вилкой»  
 G6Pase – глюкозо-6-фосфатаза  
 GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа  
 GATA1 - GATA-связывающий фактор 1

GFP – зеленый флуоресцентный белок  
 GILZ – глюкокортикоид-индуцируемая «лейциновая молния»  
 GPx3 – глутатионпероксидаза  
 GRP75 - белком, регулируемым глюкозой 75  
 HIF-1 $\alpha$  – субъединица альфа индуцируемого гипоксией фактора 1  
 HLA – человеческий лейкоцитарный антиген  
 HOXA – семейство белков, содержащих ДНК-связывающий гомеобоксный мотив  
 HSL – гормон-чувствительная липаза  
 HSP – белок теплового шока  
 IDH 1, 2, 6, 7 – изоцитратдегидрогеназа 1, 2, 6, 7  
 ID3 – ингибитор ДНК-связывающего белка  
 IFN- $\gamma$  – интерферон  $\gamma$   
 IGF1 – инсулиноподобный фактор роста 1  
 IGH – локус тяжелой цепи иммуноглобулина  
 IKZF1 – ДНК-связывающий белок ИКАРОС, белок цинкового пальца 1  
 IL 1, 2, 3, 6, 8, 10 – интерлейкин 1, 2, 3, 6, 8, 10  
 IP3R – рецептор инозитолтрифосфата 3  
 IRS1 – субстрат 1 рецептора инсулина  
 KLF1 – эритроидный фактор транскрипции  
 KMT2A – гистон лизин-N-метилтрансфераза 2A  
 KRAS – протоонкоген KRAS, ГТФаза  
 JAK2 – Janus2 киназа  
 LBD – лиганд-связывающий домен  
 LC3-II – связанного с микротрубочками белка 1A/1B легкой цепи  
 LINC5 – библиотека интегрированных сетевых клеточных сигнатур  
 LMO 1, 2, 3 – ромботин 1, 2, 3  
 Lrp 4, 5 – белок 4, 5, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности  
 LY94002 – ингибитор сигнального пути PI3K/Akt/mTOR  
 LYL1 – регулятор гемопоэза, ассоциированный с лимфобластным лейкозом 1  
 Lyz2 – лизоцим C  
 MALT-лимфома – лимфома из лимфоидной ткани, ассоциир. со слизистыми оболочками  
 МAM – мембраны эндоплазматического ретикулума, ассоциированного с митохондриями  
 MAP2K1 – митоген-активируемая протеинкиназа киназа 1 с двойной специфичностью  
 MEFV – регулятор врожденного иммунитета пирин  
 MKP1 – митоген-активированная протеинкиназа фосфатаза 1

MLL – гистонметилтрансфераза  
 MPL – рецептор тромбопоэтина  
 mTOR – механистическая мишень рапамицина млекопитающих  
 mTORC1,2 – механистическая мишень рапамицина комплекса 1, 2  
 MTT – 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ел)-2,5-дифенилтетразолиум бромид  
 MuRF-1 – убиквитин-протеинлигаза 1, член семейства белков «цинковых пальцев» RING  
 MYC – протоонкоген, фактор транскрипции bHLH  
 NSD2 – белок 2 домена SET, связывающий ядерный рецептор  
 NF-κB - ядерный фактор «каппа-би»  
 NF1 – нейрофибромин 1  
 NOTCH1 – трансмембранный рецепторный белок  
 Nox-1 – НАДФН-оксидаза 1  
 NPM1 – нуклеофозмин 1  
 NR3C1 – член 1 группы С ядерных рецепторов подсемейства 3  
 NRAS – протоонкоген NRAS, ГТФаза  
 Nrf2 – ядерный фактор, связанный с эритроидом 2  
 NTD – N-концевой домен  
 OPG - остеопротегерин  
 OPG-L – остеопротегериновый лиганд  
 Parkin – убиквитинликаза E3  
 PAX5 – белок-активатор, специфичный для линии В-клеток  
 PBX1 – фактор транскрипции пре-В-клеточной лейкемии 1  
 PDGFRA/PDGFRB – рецептор фактора роста тромбоцитов альфа/бета  
 PDK1 – киназа пируватдегидрогеназы 1  
 PGC-1α – рецептора, активируемого пролиферацией пероксисом  
 PGF – фактор роста плаценты  
 Ph – Филадельфийская хромосома  
 PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа  
 PP2A - серин-треониновая протеинфосфатаза 2A  
 PPARγ2 – гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом  
 PRAS40 - богатый пролином субстрат Akt 40 кДа  
 PTPN11 – протеинтирозинфосфатаза нерцепторного типа 11  
 RAD21 – компонент когезинового комплекса RAD21  
 RANKL (TNFSF11) - Член 11 надсемейства TNF  
 Rapam – рапамицин

Raptor – регуляторный TOR-ассоциированный белок  
 RB1 – транскрипционный корепрессор RB1  
 REDD1 – белок 1, регулируемый при развитии и повреждении ДНК  
 RPOR – фосфорелейный белок NPr  
 RST – хронический сдерживающий стресс  
 RTP801 – гомолог REDD1 у крысы  
 RU-486 – мифепристон  
 RUNX1 – фактор транскрипции 1 семейства RUNX  
 SEGRAM - селективный агонист и модулятор рецептора глюкокортикоидов  
 SETD2 – SET-домен, содержащий 2, гистон-лизинметилтрансферазу  
 SF3B1 – фактор сплайсинга 3b субъединица 1  
 SMC 1A, 3 – белок структурной поддержки хромосом 1A, 3  
 SREBP1c - фактор транскрипции 1, связывающего регуляторный элемент стерола  
 SRSF2 – богатый серином и аргинином фактор сплайсинга 2  
 STAG2 – стромальный антиген 2  
 STAT – белки из семейства передачи сигнала и активации транскрипции  
 TAL1, 2 – Т-клеточный белок острого лимфоцитарного лейкоза 1, 2  
 TCF3 – фактор транскрипции 3  
 TET2 – тетраметилцитозиндиоксигеназа 2  
 TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста бета  $\beta$   
 TLX1, 3 – белок фактора транскрипции 1, 3  
 TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$   
 TNFRSF14 – член суперсемейства рецепторов TNF 14  
 TP53 – опухолевый белок p53  
 TSC1, 2 – комплекс туберозного склероза 1, 2  
 TXNIP – белок, взаимодействующий с тиоредоксином  
 U2AF1 – вспомогательный фактор 1 малой ядерной РНК U2  
 Vav1 – член семейства факторов обмена гуаниновых нуклеотидов  
 VDAC1 - потенциал-зависимый анионный канал 1  
 VEGF – фактор роста эндотелия сосудов  
 WM – вортманнин, ингибитор сигнального пути PI3K/Akt/mTOR  
 WT – дикий тип (Wild Type)  
 WT1 – белок гена-супрессора опухоли Вильмса  
 ZRSR2 – фактор сплайсинга, цинковый палец CCHC-типа, РНК-связывающий мотив богатый серином/аргинином 2

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Антипова, А.С. Острые лейкозы со смешанным фенотипом: клинико-лабораторные особенности и прогноз / А.С. Антипова, О.Ю. Баранова, М.А. Френкель и др. // Клиническая онкогематология. – 2015. – Т. 8. – № 2. – С. 136-150.
2. Белицкий, Г.А. Химический канцерогенез / Г.А. Белицкий // Методы скрининга канцерогенов. – 2016. – Т. 20. – № 1. – С. 1-14.
3. Белохвостикова, Т.С. Случай диагностики первичной выпотной лимфомы у ВИЧ-инфицированной пациентки / Т.С. Белохвостикова, О.В. Хороших, О.Н. Каня и др. // Клиническая Онкогематология. Редкие и сложные гематологические синдромы. – 2011. – Т. 4. – № 4. – С. 340-343.
4. Глузман, Д.Ф. Новое в классификации ВОЗ миелоидных новообразований и острых лейкозов (пересмотр 2016 г.) / Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко, Т.С. Ивановская и др. // Онкология. – 2016. – Т. 18. – № 3. – С. 184-191.
5. Глузман, Д.Ф. Классификация ВОЗ В-клеточных опухолей лимфоидной ткани (пересмотр 2016 г.) / Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко, Т.С. Ивановская и др. // Онкология. – 2017. – Т. 1. – № 47. – С. 70-72.
6. Гуляева, И.Л. Этиология, патогенез, принципы патогенетической терапии лейкозов / И.Л. Гуляева, М.С. Веселкова, О.Р. Завьялова // Научное обозрение. – 2019. – № 5. – С. 47-50.
7. Гурцевич, В.Э. Роль вируса Эпштейна-Барр в онкогематологических заболеваниях человека / В.Э. Гурцевич // Клиническая онкогематология. – 2010. – Т. 3. – № 3. – С. 222-234.
8. Жидкова, Е.М. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора SPDA на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов / Е.М. Жидкова, К.А. Кузин, Л.Р. Тилова и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16. – № 6. – С. 41-46.
9. Имянитов, Е.Н. Эпидемиология и биология лимфомы Ходжкина / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8. – № 2. – С. 53-56.
10. Карнабеда, О.А. ВИЧ-ассоциированные неходжскинские лимфомы / О.А. Карнабеда, Л.И. Гетьман, С.Н. Антоняк и др. // Клиническая онкология. – 2013. – Т. 2. – № 10. – С. 108-115.

11. Коновалова, А.А. Молекулярно-генетические механизмы образования филадельфийской хромосомы / А.А. Коновалова, Г.П. Погосян // Известия НАН РК. – 2009. – № 5. – С. 41-47.
12. Красильников, М.А. Сигнальный путь mTOR: новая мишень терапии опухолей / М.А. Красильников, Н.В. Жуков // Современная онкология. – 2010. – № 2. – С. 9-16.
13. Литвицкий, П.Ф. Гемобласты. Лейкозы лимфоидного происхождения. / П.Ф. Литвицкий, Т.Н. Жевак // Вопросы современной педиатрии. – 2016. – Т. 15. – № 5. – С. 457-470.
14. Лылова Е.С. Ингибирование экспрессии гена REDD1 для снижения побочных эффектов глюкокортикоидов / Е.С. Лылова, А.В. Савинкова, Е.М. Жидкова и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 73-81.
15. Меркулов, В.М. Изоформы рецептора глюкокортикоидов, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга и использования альтернативных стартов трансляции мРНК / В.М. Меркулов, Т.И. Меркулова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Т. 15. – № 4. – С. 621-632.
16. Миронова, Ж.А. Роль изоформ глюкокортикоидного рецептора в формировании стероидорезистентности у больных бронхиальной астмой / Ж.А. Миронова, В.И. Трофимов, Е.И. Всеволодская и др. // Пульмонология. – 2014. – № 1. – С. 97-101.
17. Рассохин, В.В. Злокачественные опухоли при ВИЧ-инфекции. Эпидемиология, патогенез, формы опухолей / В.В. Рассохин, А.В. Некрасова, Н.Б. Михайлова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2017. – Т. 9. – № 1. – С. 7-21.
18. Савинкова, А.В. Варианты и перспективы перепрофилирования лекарственных препаратов для использования в терапии онкологических заболеваний / А.В. Савинкова, Е.М. Жидкова, Л.Р. Тилова и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2018. – Т. 17. – № 3. – С. 77-87.
19. Савинкова, А.В. Противоопухолевый эффект энантиомеров CpdA *in vitro* на модели острого лимфобластного лейкоза / А.В. Савинкова, Л.Р. Тилова, О.И. Борисова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – Т. 16. – № 1. – С. 61-69.
20. Страчунский, Л.С. Глюкокортикоидные препараты. Методическое пособие / Л.С. Страчунский // Смоленск. гос. мед. академия. – 1997. – С. 24.
21. 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 и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25648>.

22. Тилова, Л.Р. Молекулярно-генетические нарушения в патогенезе опухолей системы крови и соответствующие им изменения сигнальных систем клетки / Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, Е.М. Жидкова и др. // Клиническая онкогематология. – 2017. – Т. 10. – № 2. – С. 235-249.

23. Чеснокова, Н.П. Лекция 1 Лейкозы: этиология и патогенез, общие закономерности развития / Н.П. Чеснокова, Т.Н. Жевак, Т.А. Невважай и др. // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 3. – С. 161-163.

24. Шептулина, А.Ф. Ядерные рецепторы в регуляции транспорта и метаболизма желчных кислот / А.Ф. Шептулина, Е.Н. Широкова, В.Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2013. – № 5. – С. 32-45.

25. Agarwal, S. PI3K inhibitors protect against glucocorticoid-induced skin atrophy / S. Agarwal, S. Mirzoeva, B. Readhead et al. // EBioMedicine. – 2019. – № 41. – P. 526-537.

26. Aletaha, D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis / D. Aletaha, J.S. Smolen // JAMA. – 2018. – Vol. 320. – № 13. – P. 1360-1372.

27. Amaral, J.D. Role nuclear steroid receptors in apoptosis / J.D. Amaral, S. Solá, C.J. Steer, C.M.P. Rodrigues // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – Vol. 16. – № 29. – P. 3886-3902.

28. Ashley, R.J. Steroid resistance in Diamond Blackfan anemia associates with p57<sup>Kip2</sup> dysregulation in erythroid progenitors / R.J. Ashley, H. Yan, N. Wang et al. // Journal of Clinical Investigation. – 2020. – Vol. 130. – № 4. – P. 2097-2110.

29. Au, K.M. Improving cancer chemoradiotherapy treatment by dual controlled release of wortmannin and docetaxel in polymeric nanoparticles / K.M. Au, Y. Min, X. Tian et al. // ACS Nano. – 2015. – Vol. 9. – № 9. – P. 8976-8996.

30. Baer, C. Molecular genetic characterization of myeloid/lymphoid neoplasms associated with eosinophilia and rearrangement of PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 or PCM1-JAK2 / C. Baer, V. Muehlbacher, W. Kern et al. // Haematologica. – 2018. – Vol. 103. – № 8. – P. 348-350.

31. Baida G. Sexual dimorphism in atrophic effects of topical glucocorticoids is driven by differential regulation of atrophogene REDD1 in male and female skin / G. Baida, S. Agarwal, B. Readhead et al. // Oncotarget. – 2020. – Vol. 11. – № 4. – P. 409-418.

32. Baida, G. REDD1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids / G. Baida, P. Bhalla, K. Kirsanov et al. // EMBO Molecular Medicine. – 2015. – Vol. 7. – № 1. – P. 42-58.

33. Baines, C.P. How and when do myocytes die during ischemia and reperfusion: the late phase / C.P. Baines // *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. – 2014. – Vol. 16. – № 3–4. – P. 239-243.
34. Bassan, R. Lymphoblastic lymphoma : an updated review on biology, diagnosis, and treatment / R. Bassan, E. Maino, S. Cortelazzo // *European Journal of Haematology*. – 2015. – №. 96. – P. 447-460.
35. Beger, C. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach / C. Beger, K. Gerdes, M. Lauten et al. // *British Journal of Haematology*. – 2003. – Vol. 122. – № 2. – P. 245–252.
36. Bertacchini, J. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia / J. Bertacchini, N. Heidari, L. Mediani // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2015. – Vol. 72. – № 12. – P. 2337-2347.
37. Borchmann, S. The genetics of Hodgkin lymphoma: an overview and clinical implications / S. Borchmann, A. Engert // *Current Opinion in Oncology*. – 2017. – Vol. 29. – № 5. – P. 307-314.
38. Boskey, A.L. Bone quality changes associated with aging and disease: a review / A.L. Boskey, L. Imbert // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 1410. – № 1. – P. 93-106.
39. Boyce, B.F. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin / B.F. Boyce, L. Xing // *Arthritis Research & Therapy*. – 2007. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-7.
40. Brafman, A. Inhibition of oxygen-induced retinopathy in RTP801-deficient mice / A. Brafman, I. Mett, M. Shafir et al. // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2004. – Vol. 45. – № 10. – P. 3796-3805.
41. Britto, F.A. REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy / F.A. Britto, G. Begue, B. Rossano et al. // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2014. – Vol. 307. – № 11. – P. 983-993.
42. Britto, F.A. Is REDD1 a metabolic double agent? Lessons from physiology and pathology / F.A. Britto, K. Dumas, S. Giorgetti-peraldi et al. // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2020. – Vol. 319. – № 5. – P. 807-824.
43. Brugarolas, J. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex / J. Brugarolas, K. Lei, R.L. Hurley et al. // *Genes & Development*. – 2004. – Vol. 18. – № 23. – P. 2893-2904.
44. Buckingham, J.C. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking / J.C. Buckingham // *British Journal of Pharmacology*. – 2006. – №. 147. – P. 258-268.



45. Burwick, N. Glucocorticoids in multiple myeloma: past , present , and future / N. Burwick, S. Sharma // *Annals of Hematology*. – 2019. – Vol. 98. – № 1. – P. 19-28.
46. Cai, S. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning / S. Cai, A.R. Tee, J.D. Short et al. // *Journal of Cell Biology*. – 2006. – Vol. 173. – № 2. – P. 279-289.
47. Canal, M. RTP801/REDD1: a stress coping regulator that turns into a troublemaker in neurodegenerative disorders / M. Canal, J. Romaní-aumedes, N. Martín-flores et al. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2014. – Vol. 8. – P. 1–8.
48. Caplan, A. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review: Gastrointestinal and endocrinologic side effects / A. Caplan, N. Fett, M. Rosenbach et al. // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2020. – Vol. 76. – № 1. – P. 11-16.
49. Cazzola, M. Myelodysplastic syndromes / M. Cazzola // *The New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 383. – № 14. – P. 1358-1374.
50. Chen, W. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression / W. Chen, T. Dang, R.D. Blind et al. // *Molecular Endocrinology*. – 2015. – Vol. 22. – № 8. – P. 1754-1766.
51. Chou, T. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors / T. Chou, P. Talalay // *Advances in Enzyme Regulation* – 1984. – Vol. 22. – P. 27-55.
52. Clancy, B.M. A gene expression profile for endochondral bone formation: Oligonucleotide microarrays establish novel connections between known genes and BMP-2-induced bone formation in mouse quadriceps / B.M. Clancy, J.D. Johnson, A.J. Lambert et al. // *Bone*. – 2003. – Vol. 33. – № 1. – P. 46-63.
53. Cogswell, P. Mutations of the ras protooncogenes in chronic myelogenous leukemia: a high frequency of ras mutations in bcr/abl rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia / P. Cogswell, R. Morgan, M. Dunn et al. // *Blood*. – 1989. – Vol. 74. – № 8. – P. 2629-2633.
54. Compston, J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update / J. Compston // *Endocrine*. – 2018. – Vol. 61. – № 1. – P. 7-16.
55. Corradetti, M.N. The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway / M.N. Corradetti, K. Inoki, K. Guan // *The journal of biological chemistry* – 2005. – Vol. 280. – № 11. – P. 9769-9773.
56. Coursin, D.B. Corticosteroid supplementation for adrenal insufficiency / D.B. Coursin, K.E. Wood // *JAMA*. – 2015. – Vol. 287. – № 2. – P. 326-240.

57. Critchley, J.A. Adjunctive steroid therapy for managing pulmonary tuberculosis / J.A. Critchley, L.C. Orton, F. Pearson // *Cochrane database of systematic reviews*. – 2014. – № 11. – P. 1-79.
58. Curran, E. Phosphoinositide 3-kinase inhibitors in lymphoma / E. Curran, S.M. Smith // *Current Opinion in Oncology*. – 2014. – Vol. 26. – № 5. – P. 469-475.
59. Curtis, J.R. Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use / J.R. Curtis, A.O. Westfall, J. Allison et al. // *Arthritis & Rheumatism*. – 2006. – Vol. 55. – № 3. – P. 420-426.
60. Cutolo, M. Glucocorticoids and chronotherapy in rheumatoid arthritis / M. Cutolo // *RMD Open*. – 2016. – Vol. 2. – № 1. – P. 1-9.
61. D'Amore P.A. Recent Developments Mechanisms of Retinal and Choroidal Neovascularization / P.A. D'Amore // *Investigative ophthalmology & visual science*. – 1994. – T. 35. – № 12. – C. 3974-3979.
62. Dai, J. Recruitment of Brd3 and Brd4 to acetylated chromatin is essential for proinflammatory cytokine-induced matrix-degrading enzyme expression / J. Dai, S. Zhou, Q. Ge et al. // *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. – 2019. – Vol. 14. – № 1. – P. 1-10.
63. Danielian, P.S. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors / P.S. Danielian, R. White, J.A. Lees et al. // *The EMBO Journal*. – 1992. – Vol. 11. – № 3. – P. 1025-1033.
64. Das, T.P. Activation of AKT negatively regulates the pro-apoptotic function of death-associated protein kinase 3 (DAPK3) in prostate cancer / T.P. Das, S. Suman, A. Papu et al. // *Cancer Letters*. – 2016. – Vol. 377. – № 2. – P. 134-139.
65. Dennis, M.D. REDD1 enhances protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Akt to repress mTORC1 signaling / M.D. Dennis, C.S. Coleman, A. Berg et al. // *Science signaling*. – 2015. – Vol. 7. – № 335. – P. 1-20.
66. Deyoung, M.P. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling / M.P. Deyoung, P. Horak, A. Sofer et al. // *Genes & development*. – 2008. – Vol. 22. – P. 239–251.
67. Duan, Q. LINCS Canvas Browser: interactive web app to query, browse and interrogate LINCS L1000 gene expression signatures / Q. Duan, C. Flynn, M. Niepel et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – № W1. – P. W449-W460.
68. Dumas, K. REDD1 deficiency protects against nonalcoholic hepatic steatosis induced by high-fat diet / K. Dumas, C. Ayachi, J. Gilleron et al. // *The FASEB Journal*. – 2020. – Vol. 34. – № 4. – P. 5046-5060.

69. Dungan, C.M. Biochemical and biophysical research communications lack of REDD1 reduces whole body glucose and insulin tolerance, and impairs skeletal muscle insulin signaling / C.M. Dungan, D.C. Wright, D.L. Williamson // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Vol. 453. – № 4. – P. 778-783.

70. Ediriweera, M.K. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: biological and therapeutic significance / M.K. Ediriweera, K.H. Tennekoon, S.R. Samarakoon // *Seminars in Cancer Biology*. – 2019. – Vol. 59. – P. 147-160.

71. Ellisen, L.W. REDD1, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species / L.W. Ellisen, K.D. Ramsayer, C.M. Johannessen et al. // *Molecular Cell*. – 2002. – Vol. 10. – № 5. – P. 995-1005.

72. Encio, I.J. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor / I.J. Encio, S.D. Detera-Wadleighs // *The journal of biological chemistry*. – 1991. – Vol. 266. – № 11. – P. 7182-7188.

73. Ersahin, T. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway / T. Ersahin, N. Tuncbag, R. Cetin-Atalay // *Molecular BioSyste*. – 2015. – Vol. 11. – № 7. – P. 1946-1954.

74. Escoter-Torres, L. Fighting the fire: mechanisms of inflammatory gene regulation by the glucocorticoid receptor / L. Escoter-Torres, G. Caratti, A. Mechtidou et al. // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – № 10 – P. 1-17.

75. Fagerberg, L. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics / L. Fagerberg, B.M. Hallstro, P. Oksvold et al. // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2014. – Vol. 13. – № 2. – P. 397-406.

76. Fan, H. Macrophage migration inhibitory factor inhibits the antiinflammatory effects of glucocorticoids via glucocorticoid-induced leucine zipper / H. Fan, W. Kao, Y.H. Yang et al. // *Arthritis & Rheumatology*. – 2014. – Vol. 66. – № 8. – P. 2059-2070.

77. Fattahi S. et al. PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: Epigenetics and beyond / S. Fattahi, F. Amjadi-Moheb, R. Tabaripour et al. // *Life Sciences*. – 2020. – Vol. 262. – P. 118513.

78. Favier, F.B. Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia / F.B. Favier, F. Costes, A. Defour et al. // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2010. – Vol. 298. – № 6. – P. 1659-1667. doi:10.1152/ajpregu.00550.2009.

79. Feng, Y. REDD1 overexpression in oral squamous cell carcinoma may predict poor prognosis and correlates with high microvessel density / Y. Feng, K. Song, W. Shang et al. // *ONCOLOGY LETTERS*. – 2020. – № 19. – P. 431-441.

80. Fiel, S. B. Systemic corticosteroid therapy for acute asthma exacerbations / S.B. Fiel, W. Vincken // *Journal of Asthma*. – 2006. – Vol. 43. – № 5. – P. 321-331.
81. Flotho, C. RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) / C. Flotho, S. Valcamonica, S. Mach-Pascual et al. // *Leukemia*. – 1999. – № 3. – P. 32-37.
82. Frangou E. REDD1/autophagy pathway promotes thromboinflammation and fibrosis in human systemic lupus erythematosus (SLE) through NETs decorated with tissue factor (TF) and interleukin-17A (IL-17A) / E. Frangou, A. Chrysanthopoulou, A. Mitsios et al. // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2019. – Vol. 78. – № 2 – P. 238-248.
83. Frenkel, B. Glucocorticoid-induced osteoporosis / B. Frenkel, W. White, J. Tuckermann // *HHS Public Access*. – 2015. – T. 176. – № 1. – P. 179-215.
84. Galliher-Beckley, A.J. Critical review emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease / A.J. Galliher-Beckley, J.A. Cidlowski // *IUBMB Life*. – 2009. – Vol. 61. – № 10. – P. 979-986.
85. Ganguly, B. Mutations of myelodysplastic syndromes ( MDS ): An update up-to- date / B. Ganguly, N. Kadam // *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. – 2016. – № 769. – P. 47-62.
86. Gao, C. TXNIP/Redd1 signalling and excessive autophagy: a novel mechanism of myocardial ischaemia reperfusion injury in mice / C. Gao, R. Wang, B. Li et al. // *Cardiovascular Research*. – 2020. – Vol. 116. – № 3. – P. 645-657.
87. Gessner, P.K. Isobolographic analysis of interactions: applications and utility an update on applications and utility / P.K. Gessner // *Toxicology*. – 1995. – Vol. 105. – № 2–3. – P. 161-179.
88. Goichot, B. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during and after steroid therapy: recent data and critical review / B. Goichot, C. Wicky, F. Grunenberger et al. // *The Annales d'Endocrinologie*. – 2000. – Vol. 61. – № 5. – P. 452-458.
89. Gordon, B.S. Emerging role for regulated in development and DNA damage 1 (REDD1) in the regulation of skeletal muscle metabolism / B.S. Gordon, J.L. Steiner, D.L. Williamson et al. // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2016. – Vol. 311. – № 1. – P. 157-174.
90. Gras, M-P. Downregulation of human type VII collagen (COL7A1) promoter activity by dexamethasone Identification of a glucocorticoid receptor binding region / M-P. Gras, F. Verrecchia, J. Uitto, A. Mauviel // *Experimental Dermatology*. – 2001. – Vol. 10. – № 1. – P. 28-34.

91. Gross, K.L. Regulation of antiapoptotic genes in osteosarcoma cells: a new mechanism for glucocorticoid resistance / K.L. Gross, R.H. Oakley, A.B. Scoltock et al. // *Molecular Endocrinology*. – 2011. – Vol. 25. – № 7. – P. 1087-1099.
92. Habib, T. AKT1 has dual actions on the glucocorticoid receptor by cooperating with 14-3-3 / T. Habib, A. Sadoun, N. Nader et al. // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2017. – Vol. 439. – P. 431-443.
93. Hayashi, R. Effects of glucocorticoids on gene transcription / R. Hayashi, H. Wada, K. Ito et al. // *European Journal of Pharmacology*. – 2004. – № 500. – P. 51-62.
94. Hengge, U.R. Adverse effects of topical glucocorticosteroids / U.R. Hengge, T. Ruzicka, R.A. Schwartz et al. // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2006. – Vol. 54. – № 1. – P. 1-15.
95. Henzen, C. Early report suppression and recovery of adrenal response after short-term, high-dose glucocorticoid treatment / C. Henzen, A. Suter, E. Lerch et al. // *Lancet*. – 2000. – Vol. 355. – № 9203. – P. 542-545.
96. Hiraiwa, M. mTORC1 activation in osteoclasts prevents bone loss in a mouse model of osteoporosis / M. Hiraiwa, K. Ozaki, T. Yamada et al. // *Frontiers in Pharmacology*. – 2019. – № 10. – P. 1-10.
97. Hollenberg, S.M. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor / S.M. Hollenberg, R.M. Evans // *Cell*. – 1988. – Vol. 55. – № 5. – P. 899-906.
98. Hoppe-Seyler, K. Induction of dormancy in hypoxic human papillomavirus-positive cancer cells / K. Hoppe-Seyler, F. Bossler, C. Lohrey et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2016. – Vol. 114. – № 6. – P. 990-998.
99. Horak, P. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis / P. Horak, A.R. Crawford, D.D. Vadysirisack et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 10. – P. 4675-4680.
100. Huang, P. Redd1 protects against post - infarction cardiac dysfunction by targeting apoptosis and autophagy / P. Huang, J. Fu, L. Chen et al. // *International journal of molecular medicine*. – 2019. – Vol. 44. – № 6. – P. 2065-2076.
101. Hudson, W.H. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression / W.H. Hudson, C. Youn, E.A. Ortlund // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 20. – № 1. – P. 53-58.
102. Hurley, D.M. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance / D.M. Hurley, D. Accili et al. // *The Journal of clinical investigation*. – 1991. – Vol. 87. – № 2. – P. 680-686.

103. Hussain, A.R. XIAP over-expression is an independent poor prognostic marker in Middle Eastern breast cancer and can be targeted to induce efficient apoptosis / A.R. Hussain, A.K. Siraj, M. Ahmed et al. // *BMC Cancer*. – 2017. – Vol. 17. – № 1. – P. 1-13.
104. Hussein, K. Myeloproliferative neoplasien / K. Hussein, G. Büsche, J. Schlue et al. // *Pathologe*. – 2012. – Vol. 33. – № 6. – P. 508-517.
105. Huynh, H. mTORC1 impedes osteoclast differentiation via calcineurin and NFATc1 / H. Huynh, Y. Wan // *Communications Biology*. – 2018. – Vol. 1 – № 1. – P. 1-15.
106. Inoki, K. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling / K. Inoki, Y. Li, T. Zhu et al. // *Nature Cell Biology*. – 2003. – Vol. 4. – № 9. – P. 648-657.
107. Ismaili N., Garabedian M.J. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation / N. Ismaili, M.J. Garabedian // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 1024. – № 1. – P. 86-101.
108. Jackman, R.W. The molecular basis of skeletal muscle atrophy / R.W. Jackman, S.C. Kandarian // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2004. – Vol. 287. – № 4. – P. 834-843.
109. Jia, W. REDD1 and p-AKT over-expression may predict poor prognosis in ovarian cancer / W. Jia, B. Chang, L. Sun et al. // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2014. – Vol. 7. – № 9. – P. 5940-5949.
110. Jin, H. Induction of HSP27 and HSP70 by constitutive overexpression of Redd1 confers resistance of lung cancer cells to ionizing radiation / H. Jin, S. Hong, J. Kim et al. // *Oncology Reports*. – 2019. – Vol. 41. – № 5. – P. 3119-3126.
111. Kadmiel, M. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease / M. Kadmiel, J. A. Cidowski // *Trends in pharmacological sciences*. – 2013. – Vol. 34. – № 9. – P. 518–530.
112. Kato, M. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia / M. Kato, A. Manabe // *Pediatrics International*. – 2018. – Vol. 60. – № 1. – P. 4-12.
113. Kim, J.-R. Identification of amyloid  $\beta$ -peptide responsive genes by cDNA microarray technology: Involvement of RTP801 in amyloid  $\beta$ -peptide toxicity / J.R. Kim, S.R. Lee, H.J. Chung et al. // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2003. – Vol. 35. – № 5. – P. 403-411.
114. Kim, M. Gadd45 $\beta$  is a novel mediator of cardiomyocyte apoptosis induced by ischaemia/hypoxia / M. Kim, E. Seo, D. Lee et al. // *Cardiovascular Research*. – 2010. – Vol. 87. – № 1. – P. 119-126.
115. Kimura, T. Dorsal Skin Reactions of Hairless Dogs to with Corticosteroids / T. Kimura, K. Doi // *Toxicologic Pathology*. – 1999. – Vol. 27. – № 5. – P. 528-535.

116. Kojima, M. Topographic distribution of prednisolone in the lens after organ culture / M. Kojima, Y.B. Shui, K. Sasaki // *Ophthalmic Research*. – 1995. – Vol. 27. – № 1. – P. 25-33.
117. Kouchkovsky, I De. Acute myeloid leukemia : a comprehensive review and 2016 update / I De Kouchkovsky, M. Abdul-Hay // *Blood Cancer Journal*. – 2016. – №. 6. – P. 1-10.
118. Kuo, S. Novel insights of lymphomagenesis of helicobacter pylori-dependent gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma / S. Kuo, M. Wu, K. Yeh et al. // *Cancers (Basel)*. – 2019. – Vol. 11. – № 4. – P. 1-20.
119. Küppers, R. The biology of Hodgkin's lymphoma / R. Küppers // *Nature Reviews Cancer*. – 2009. – Vol. 9. – № 1. – P. 15-27.
120. Kuwajima, K. Synergistic cytoprotection by co-treatment with dexamethasone and rapamycin against proinflammatory cytokine-induced alveolar epithelial cell injury / K. Kuwajima, K. Chang, A. Furuta et al. // *Journal of Intensive Care*. – 2019. – Vol. 7. – № 12. – P. 1-13.
121. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680-685.
122. Lan, Y. Zoledronic acid-induced cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress triggered REDD1-mTOR pathway in breast cancer cells / Y. Lan, C. Chang, M. Sung et al. // *Anticancer Research*. – 2013. – № 33. – P. 3807-3814.
123. Leigh, R. An inhaled dose of budesonide induces genes involved in transcription and signaling in the human airways : enhancement of anti- and proinflammatory effector genes / R. Leigh, M.M. Mostafa, E.M. King et al. // *Pharmacology Research & Perspectives*. – 2016. – Vol. 4. – № 4. – P. 1-18.
124. Lesovaya, E.A. The long winding road to the safer glucocorticoid receptor (GR) targeting therapies / E.A. Lesovaya, D. Chudakova, G. Baida et al. // *Oncotarget*. – 2022. – Vol. 13. – P. 408-424.
125. Lesovaya E.A. et al. 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. Savinkova, O.V. Morozova et al. // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2020. – Vol. 19. – № 9. – P. 1898–1908.
126. Lesovaya, E. Rapamycin modulates glucocorticoid receptor function, blocks atrophogene REDD1, and protects skin from steroid atrophy / E. Lesovaya, S. Agarwal, B. Readhead et al. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2019. – Vol. 138. – № 9. – P. 1935-1944.
127. 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 et al. // *Cell Cycle*. – 2013. – Vol. 12. – № 1. – P. 133-144.

128. 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 et al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 31. – P. 30730-30744.

129. Lewis-Tuffin, L.J. Human glucocorticoid receptor  $\beta$  binds RU-486 and is transcriptionally active / L.J. Lewis-Tuffin, C.M. Jewell, R.J. Bienstock et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2007. – Vol. 27. – № 6. – P. 2266-2282.

130. Ligons, D.L. CD8 lineage-specific regulation of interleukin-7 receptor expression by the transcriptional repressor Gfi1 / D.L. Ligons, C. Tuncer, A. Brett et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 41. – P. 34386-34399.

131. Lipina, C. Is REDD1 a metabolic éminence grise ? / C. Lipina, H.S. Hundal // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2016. – Vol. 27. – № 12. – P. 868-880.

132. Lu, N.Z. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms / N.Z. Lu, J.A. Cidlowski // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 1024. – № 1. – P. 102-123.

133. Luisi, B.F. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA / B.F. Luisi, W.X. Xu, Z. Otwinowski et al. // *Nature*. – 1991. – Vol. 352. – № 6335. – P. 497-505.

134. Mak, T. The immune response / T. Mak, M. Saunders // *Part I: Basic Immunology*. – 2006. C. 373-401.

135. Malagelada, C. RTP801 is induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation / C. Malagelada, Z.H. Jin, L.A. Greene // *The Journal of Neuroscienc*. – 2008. – Vol. 28. – № 53. – P. 14363-14371.

136. Malagelada, C. RTP801 / REDD1 Regulates the Timing of Cortical Neurogenesis and Neuron Migration / C. Malagelada, M.A. Lo, R.T. Willett et al. // *The Journal of Neuroscience*. – 2011. – Vol. 31. – № 9. – P. 3186-3196.

137. Malagelada, C. RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation / C. Malagelada, E.J. Ryu, S.C. Biswas et al. // *The Journal of Neuroscience*. – 2006. – Vol. 26. – № 39. – P. 9996-10005.

138. Mangelsdorf, D. J. The nuclear receptor superfamily: the second decade / D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato et al. // *Cell*. – 1995. – Vol. 83, № 6. – P. 835-839.

139. Mantovani, A. Previews macrophage metabolism shapes angiogenesis in tumors / A. Mantovani, M. Locati // *Cell Metabolism*. – 2016. – Vol. 24. – № 5. – P. 653-654.



140. Martín-García, D. CCND2 and CCND3 hijack immunoglobulin light chain enhancers in cyclin D1-negative mantle cell lymphoma / D. Martín-García, A. Navarro, R. Valdés-Mas et al. // *Blood*. – 2019. – Vol. 133. – № 9. – P. 940-951.
141. Mast, K. J. Pathologic features of down syndrome myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group protocol AAML0431. / K. J. Mast, J. W. Taub, T. A. Alonzo et al. // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2019. – P. 1-7.
142. Mclaughlin, F. Glucocorticoid-induced osteopenia in the mouse as assessed by histomorphometry, microcomputed tomography, and biochemical markers / F. Mclaughlin, J. Mackintosh, B.P. Hayes et al. // *Bone*. – 2002. – Vol. 30. – № 6. – P. 924-930.
143. Miesfeld, R. Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation / R. Miesfeld, P.J. Godowski, B. A. Maler et al. // *Science*. – 1987. – Vol. 236, № 4800. – P. 423-427.
144. Miller, W.P. The stress response protein REDD1 promotes diabetes-induced oxidative stress in the retina by Keap1-independent Nrf2 degradation / W.P. Miller, S. Sunilkumar, J.F. Giordano et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295. – № 21. – P. 7350-7361.
145. Molitoris, J.K. Glucocorticoid elevation of dexamethasone-induced gene 2 (Dig2/RTP801/REDD1) protein mediates autophagy in lymphocytes / J.K. Molitoris, K.S. McColl, S. Swerdlow et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 34. – P. 30181-30189.
146. Munck, A. Activation of steroid hormone–receptor complexes in intact target cells in physiological conditions / A. Munck, R. Foley // *Nature*. – 1979. – Vol. 278. – № 5706. – P. 752-754.
147. Niu, M. An integrative transcriptome study reveals Ddit4/Redd1 as a key regulator of cancer cachexia in rodent models / M. Niu, L. Li, Z. Su et al. // *Cell Death & Disease*. – 2021. – Vol. 12. – № 7. – P. 1-12.
148. Nosedá, R. DDIT4/REDD1/RTP801 Is a Novel Negative Regulator of Schwann Cell Myelination / R. Nosedá, S. Belin, I. Vaccari et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – Vol. 33. – № 38. – P. 15295-15305.
149. Oakley, R.H. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids / R.H. Oakley, J.A. Cidlowski // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 5. – P. 3177-3184.

150. Oakley, R.H. Molecular genetics : the human glucocorticoid receptor isoform: expression, biochemical properties, and putative function / R.H. Oakley, M. Sar, J.A. Cidlowski // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 16. – P. 9550-9559.
151. Oakley, R.H. Expression and subcellular distribution of the  $\beta$ -isoform of the human glucocorticoid receptor / R.H. Oakley, J.C. Webster, M. Sar et al. // *Endocrinology*. – 1997. – Vol. 138. – № 11. – P. 5028-5038.
152. Olaloko, O. Evaluating the use of corticosteroids in preventing and treating bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates / O. Olaloko, R. Mohammed, U. Ojha // *International Journal of General Medicine*. – 2018. – №. 11. – P. 265-274.
153. Onwubalili, J.K. High incidence of post-transplant diabetes mellitus in a single-centre study / J.K. Onwubalili, E.N. Obineche // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 1992. – Vol. 7. – № 4. – P. 346-349.
154. Oray, M. Long-term side effects of glucocorticoids / M. Oray, K. Abu Samra, N. Ebrahimiadib et al. // *Expert Opinion on Drug Safety*. – 2016. – Vol. 15. – № 4. – P. 457-465.
155. Ota, K.T. REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior / K.T. Ota, R.-J. Liu, B. Voleti et al. // *Nature Medicine*. – 2014. – Vol. 20. – № 5. – P. 531-535.
156. Pan, Z. Histiocytic and dendritic cell neoplasms / Z. Pan, M.L Xu // *Surgical Pathology Clinics*. – 2019. – Vol. 12. – № 3. – P. 805-829.
157. Pastor, F. Implication of REDD1 in the activation of inflammatory pathways / F. Pastor, K. Dumas, M.-A. Barthélémy et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-12.
158. Peene, I. Risks and benefits of corticosteroids in arthritic diseases in the clinic / I. Peene, D. Elewaut, L. Vereecke // *Biochemical Pharmacology*. – 2019. – Vol. 165. – P. 112-125.
159. Pereira, R.M.R. Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases / R.M.R. Pereira, J.F. De Carvalho, E. Canalis // *Clinics*. – 2010. – Vol. 65. – № 11. – P. 1197–1205.
160. Picard, D. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor / D. Picard, K.R. Yamamoto // *The EMBO Journal*. – 1987. – Vol. 6. – № 11. – P. 3333-3340.
161. Pieri, B. Effects of physical exercise on the P38MAPK/REDD1/14-3-3 pathways in the myocardium of diet-induced obesity rats / B. Pieri, D. Souza, T. Luciano et al. // *Hormone and Metabolic Research*. – 2014. – Vol. 46. – № 09. – P. 621-627.
162. Ploner, C. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia / C. Ploner, S. Schmidt, E. Presul et al. // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 93. – № 2–5. – P. 153-160.

163. Poiesz, B. HTLV-II-associated cutaneous T-cell lymphoma in a patient with HIV-1 infection / B. Poiesz, D. Dube, S. Dube et al. // *The New England Journal of Medicine*. – 2000. – Vol. 342. – № 13. – P. 930-936.
164. Polak, R. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: Implications for therapeutic strategies in leukemia / R. Polak, M. Buitenhuis // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – № 4. – P. 911-923.
165. Polman, J.A.E. Two populations of glucocorticoid receptor-binding / J.A.E. Polman, E.R. De Kloet, N.A. // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154. – № 5. – P. 1832-1844.
166. Prada-Arismendy, J. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia / J. Prada-Arismendy, J.C. Arroyave, S. Röthlisberger // *Blood Reviews*. – 2017. – Vol. 31. – № 1. – P. 63-76.
167. Pratt, W.B. Transformation of glucocorticoid and progesterone receptors to the DNA-binding state / W.B. Pratt // *Journal of cellular biochemistry*. – 1987. – № 268. – P. 51-68.
168. Pratt, W.B. Handbook of experimental / W.B. Pratt, Y. Morishima, M. Murphy, M. Harrell // *Pharmacology*. – 2006. – P. 111-138.
169. Pratts, W.B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor / W.B. Pratts // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – № 268. – P. 21455-21458.
170. Qiao, S. REDD1 loss reprograms lipid metabolism to drive progression of RAS mutant tumors / S. Qiao, S. Koh, V. Vivekanandan et al. // *Genes & Development*. – 2020. – Vol. 34. – № 11-12. – P. 751-766.
171. Ray, A. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- $\kappa$ B and the glucocorticoid receptor / A. Ray, K.E. Prefontaine // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1994. – Vol. 91. – № 2. – P. 752-756.
172. Regazzetti, C. Regulated in development and DNA damage responses-1 (REDD1) protein contributes to insulin signaling pathway in adipocytes / C. Regazzetti, K. Dumas, Y. Marchand-Brustel et al. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 12. – P. 1-10.
173. Richardson, C.T. Pathogenetic factors in peptic ulcer disease / C.T. Richardson // *The American Journal of Medicine*. – 1985. – Vol. 79. – № 2. – P. 1-7.
174. Rigaud, G. In vivo footprinting of rat TAT gene: dynamic interplay between the glucocorticoid receptor and a liver-specific factor / G. Rigaud, J. Roux, R. Pictet et al. // *Cell*. – 1991. – Vol. 67. – № 5. – P. 977-986.

175. Sacta, M.A. Glucocorticoid signaling: an update from a genomic perspective / M.A. Sacta, Y. Chinenov, I. Rogatsky // *Annual Review of Physiology*. – 2016. – Vol. 78. – № 1. – P. 155-180.
176. Sacta, M.A. Gene-specific mechanisms direct glucocorticoid-receptor-driven repression of inflammatory response genes in macrophages / M.A. Sacta, B. Tharmalingam, M. Coppo et al. // *Elife*. – 2018. – Vol. 7. – P. 1-25.
177. Salipante, S.J. Recurrent somatic loss of TNFRSF14 in classical Hodgkin lymphoma / S. J. Salipante, A. Adey, A. Thomas et al. // *Genes, Chromosomes and Cancer*. – 2016. – Vol. 55. – № 3. – P. 278-287.
178. Saracino, P.G. Biochemical and Biophysical Research Communications Hormonal regulation of core clock gene expression in skeletal muscle following acute aerobic exercise / P.G. Saracino, M.L. Rossetti, J.L. Steiner et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 508. – № 3. – P. 871-876.
179. Savukaitytė, A. siRNA Knockdown of REDD1 Facilitates Aspirin-Mediated Dephosphorylation of mTORC1 Target 4E-BP1 in MDA-MB-468 Human Breast Cancer Cell Line / A. Savukaitytė, G. Gudoitytė, A. Bartnykaitė et al. // *Cancer Management and Research*. – 2021. – № 13. – P. 1123-1133.
180. Sayegh, R. Nucleic acids, protein synthesis, and molecular genetics-glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone / R. Sayegh, S.D. Auerbach, X. Li et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – № 18. – P. 12431-12437.
181. Schacke, H. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids / H. Schacke, W.D. Döcke, K. Asadullah // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2002. – Vol. 96. – № 1. – P. 23-43.
182. Schakman, O. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy / O. Schakman, S. Kalista, C. Barbé et al. // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2013. – Vol. 45. – № 10. – P. 2163-2172.
183. Scheijen, B. Molecular mechanisms contributing to glucocorticoid resistance in lymphoid malignancies / B. Scheijen // *Cancer Drug Resist.* – 2019. – Vol. 2. – № 3. – P. 647-664.
184. Schoepe, S. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy / S. Schoepe, H. Schacke, E. May et al. // *Experimental Dermatology*. – 2006. – Vol. 15. – № 6. – P. 406-420.
185. Sharma, S. Prevention of BMS-777607-induced polyploidy/senescence by mTOR inhibitor AZD8055 sensitizes breast cancer cells to cytotoxic chemotherapeutics / S. Sharma, H. Yao, Y. Zhou et al. // *Molecular Oncology*. – 2013. – Vol. 8. – № 3. – P. 469-482.

186. Shimizu, N. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle / N. Shimizu, N. Yoshikawa, N. Ito et al. // *Cell Metabolism*. – 2011. – Vol. 13. – № 2. – P. 170-182.
187. Shoshani, T. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis / T. Shoshani, A. Faerman, I. Mett et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2002. – Vol. 22. – № 7. – P. 2283-2293.
188. Singavi, A.K. Post-transplant lymphoproliferative disorders / A.K. Singavi, A.M. Harrington, T.S. Fenske // *Cancer Treatment and Research*. – 2015. – №165 – P. 305-327.
189. Sinha, I. Methylseleninic acid elevates REDD1 and inhibits prostate cancer cell growth despite AKT activation and mTOR dysregulation in hypoxia / I. Sinha, J. Allen, J. Pinto et al. // *Cancer Medicine*. – 2014. – Vol. 3. – № 2. – P. 252-264.
190. Sivaprasad, S. Intravitreal steroids in the management of macular oedema / S. Sivaprasad, P. Mccluskey, S. Lightman // *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. – 2006. – Vol. 84. – № 6. – P. 722-733.
191. Skendros, P. Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) links stress with IL-1 $\beta$ -mediated familial Mediterranean fever attack through autophagy-driven neutrophil extracellular traps / P. Skendros, A. Chrysanthopoulou, F. Rousset et al. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2017. – Vol. 140. – № 5. – P. 1378-1387.
192. Skendros, P. Autoinflammation: Lessons from the study of familial Mediterranean fever / P. Skendros, C. Papagoras, I. Mitroulis et al. // *Journal of Autoimmunity*. – 2019. – Vol. 104. – P. 1-9.
193. Sofer, A. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1 / A. Sofer, K. Lei, C.M. Johannessen et al. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25. – № 14. – P. 5834-5845.
194. Spivak, J.L. Myeloproliferative neoplasms / J.L. Spivak // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Vol. 376. – № 22. – P. 2168-2181.
195. Srinivasan, B. Explicit Treatment of Non Michaelis-Menten and Atypical Kinetics in Early Drug Discovery / B. Srinivasan // *ChemMedChem*. – 2021. – Vol. 16. – № 6. – P. 899-918.
196. Stokes, J.B. Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and steroids: organ , tissue , and steroid heterogeneity / J.B. Stokes, R.D. Sigmund, B. John et al. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 1998. – Vol. 274. – № 6. – P. 1699-1707.
197. Su, J. Increased REDD1 facilitates neuronal damage after subarachnoid hemorrhage / J. Su, M. Wang, Y. Yan et al. // *Neurochemistry International*. – 2019. – Vol. 128. – P. 14-20.

198. Surjit, M. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist- liganded glucocorticoid receptor / M. Surjit, K.P. Ganti, A. Mukherji et al. // *Cell*. – 2011. – Vol. 145. – № 2. – P. 224-241.
199. Tan, C.Y. mTORC1 dependent regulation of REDD1 protein stability / C.Y. Tan, T. Hagen // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 5. – P. 1-8.
200. Tefferi, A. Mechanisms of disease myelodysplastic syndromes / A. Tefferi, J. Vardiman // *The new england journal of medicine*. – 2009. – Vol. 361. – № 19. – P. 1872-1885.
201. Ten Boekel, E. Lack of association between glucocorticoid receptor polymorphisms and erythropoiesis / E. Ten Boekel, R.K. Schindhelm, P. van Veen et al. // *International Journal of Laboratory Hematology*. – 2014. – Vol. 36. – № 6. – P. 84-86.
202. Tresckow, B. Dose-intensification in early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the german Hodgkin study group HD14 Trial / B. Tresckow, A. Plu, M. Fuchs et al. // *Journal of clinical oncology*. – 2012. – Vol. 30. – № 9. – P. 907-913.
203. Tubbs, E. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance / E. Tubbs, P. Theurey, G. Vial et al. // *Diabetes*. – 2014. – Vol. 63. – № 10. – P. 3279-3294.
204. Vardiman, J.W. Myelodysplastic syndromes, chronic myeloproliferative diseases, and myelodysplastic/myeloproliferative diseases / J.W. Vardiman // *Seminars in Diagnostic Pathology*. – 2003. – Vol. 20. – № 3. – P. 154-179.
205. Vega-Rubin-de-Celis, S. Structural analysis and functional implications of the negative mTORC1 regulator REDD1 / S. Vega-Rubin-de-Celis, Z. Abdallah, L. Kinch et al. // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 49. – № 11. – P. 2491-2501.
206. Vogt, N. The molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma / N. Vogt, B. Dai, T. Erdmann et al. // *Leukemia & Lymphoma*. – 2016. – Vol. 58. – № 7. – P. 1530-1537.
207. Vollmer, T.R. Anti-inflammatory effects of mapracorat , a novel selective glucocorticoid receptor agonist, is partially mediated by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) / T.R. Vollmer, A. Stockhausen, J. Zhang // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, № 42. – P. 35212-35221
208. Voorhees, J.L. Chronic restraint stress upregulates erythropoiesis through glucocorticoid stimulation / J.L. Voorhees, N.D. Powell, L. Moldovan et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 10. – P. 1-12.
209. Walfisch, A. Multiple courses of antenatal steroids: risks and benefits / A. Walfisch, M. Hallak, M. Mazor // *Obstetrics & Gynecology*. – 2001. – Vol. 98. – № 3. – P. 491-497.
210. Wang, Q. Downregulation of microRNA-124-3p suppresses the mTOR signaling pathway by targeting DDIT4 in males with major depressive disorder / Q. Wang, G. Zhao, Z.

Yang et al. // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2018. – Vol. 41. – № 1. – P. 493-500.

211. Wang, Z. Dexamethasone-induced gene 2 (dig2) is a novel pro-survival stress gene induced rapidly by diverse apoptotic signals / Z. Wang, M.H. Malone, M.J. Thomenius et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278. – № 29. – P. 27053-27058.

212. Ward, L.M. Growth, pubertal development, and skeletal health in boys with Duchenne Muscular Dystrophy / L.M. Ward, D.R. Weber // *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. – 2020. – Vol. 26. – № 1. – P. 1-17.

213. Webster, J.C. Dexamethasone and tumor necrosis factor- $\alpha$  act together to induce the cellular inhibitor of apoptosis-2 gene and prevent apoptosis in a variety of cell types / J.C. Webster, R.M. Huber, R.L. Hanson et al. // *Endocrinology*. – 2002. – Vol. 143. – № 10. – P. 3866-3874.

214. Weinstein, R.S. Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis / R.S. Weinstein // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. – 2012. – Vol. 41. – № 3. – P. 595-611.

215. Whittier, X. Glucocorticoid-induced osteoporosis / X. Whittier, K.G. Saag // *Rheumatic Disease Clinics of North America*. – 2016. – Vol. 42. – № 1. – P. 177-189.

216. Willems, L. The dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD8055 has anti-tumor activity in acute myeloid leukemia / L. Willems, N. Chapuis, A. Puissant et al. // *Leukemia*. – 2011. – Vol. 26. – № 6. – P. 1195-1202.

217. Wissink, S. Regulation of the rat serotonin-1A receptor gene by corticosteroids / S. Wissink, O. Meijer, D. Pearce et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – № 2. – P. 1321-1326.

218. Wolach, O. Mixed-phenotype acute leukemia : current challenges in diagnosis and therapy / O. Wolach, R.M. Stone // *Current Opinion in Hematology*. – 2017. – Vol. 24. – № 2. – P. 139-145.

219. Wu, Y. REDD1 Is a major target of testosterone action in preventing dexamethasone-induced muscle loss / Y. Wu, W. Zhao, J. Zhao et al. // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 151. – № 3. – P. 1050-1059.

220. Xing, C. Effects of LY294002 on the invasiveness of human gastric cancer in vivo in nude mice / C. Xing, B. Zhu, X. Fan et al. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 15. – № 40. – P. 5044-5052.

221. Xu, W. HIF-1 $\alpha$  Regulates Osteoporosis Through PDK1/AKT/mTOR Signaling Pathway / W. Xu, H. Zheng, R. Yang et al. // *Frontiers in Endocrinology*. – 2020. – №. 10. – P. 1-12.

222. Xu, Z. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy / Z. Xu, X. Han, D. Ou et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 104. – № 2. – P. 575-587.
223. Yang, N. Role of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) in inflammatory bone loss. / Yang, N., Baban, B., Isales, C. M., Shi, X. // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol.12. – № 8. – P. 1–14.
224. Yates, J.W.T. A pharmacokinetic-pharmacodynamic model predicting tumour growth inhibition after intermittent administration with the mTOR kinase inhibitor AZD8055 / J.W.T. Yates, S.V. Holt, A. Logie et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2017. – Vol. 174. – № 16. – P. 2652-2661.
225. Yemelyanov, A. Novel steroid receptor phyto-modulator Compound A inhibits growth and survival of prostate cancer cells / A. Yemelyanov, J. Czornog, L. Gera et al. // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 12. – P. 4763-4774.
226. Yoshida, T. Rtp801, a suppressor of mTOR signaling, is an essential mediator of cigarette smoke – induced pulmonary injury and emphysema / T. Yoshida, I. Mett, A.K. Bhunia et al. // *Nature Medicine*. – 2010. – Vol. 16. – № 7. – P. 767-773.
227. Yoshiuchi, I. Mutation/polymorphism scanning of glucose-6- phosphatase gene promoter in noninsulin-dependent / I. Yoshiuchi, R. Shingu, H. Nakajima et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1998. – Vol. 83. – № 3. – P. 1016-1019.
228. You, M.J. T-lymphoblastic leukemia/lymphoma / M J. You, L J. Medeiros, E. D. Hsi // *American Journal of Clinical Pathology*. – 2015. – Vol. 144. – № 3. – P. 411-422.
229. Yun, S. Melatonin enhances arsenic trioxide-induced cell death via sustained upregulation of Redd1 expression in breast cancer cells / S. Yun, S. Hyeok, S. Take et al. // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2015. – № 422 – P. 64-73.
230. Zeng, Q. Inhibition of REDD1 sensitizes bladder urothelial carcinoma to paclitaxel by inhibiting autophagy / Q. Zeng, J. Liu, P. Cao et al. // *Clinical cancer research*. – 2018. – Vol. 24. – № 2. – P. 445-460.
231. Zhang, X. B lymphoblastic leukemia/lymphoma: new insights into genetics, molecular aberrations, subclassification and targeted therapy / X. Zhang, P. Rastogi, B. Shah et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 39. – P. 66728-66741.
232. Zhang, Y. mTORC1 inhibits NF- $\kappa$ B/NFATc1 signaling and prevents osteoclast precursor differentiation, in vitro and in mice / Y. Zhang, S. Xu, K. Li et al. // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 2017. – Vol. 32. – № 9. – P. 1829-1840.
233. Zhang, Z. RTP801 is a critical factor in the neurodegeneration process of A53T  $\alpha$ -synuclein in a mouse model of Parkinson's disease under chronic restraint stress / S.-F. Chu, S.-



S. Wang, Y.-N. Jiang et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2018. – Vol. 175. – № 4. – P. 590-605.

234. Zhidkova, E.M. Nutritional Sensor REDD1 in Cancer and Inflammation: Friend or Foe? / E.M. Zhidkova, E.S. Lylova, D.D. Grigoreva et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – P. 1-13.

235. Zhou, Y. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia / Y. Zhou, M J. You, K. H. Young et al. // *Human Pathology*. – 2012. – Vol. 43. – № 9. – P. 1347-1362.