

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

На правах рукописи

ЛЕСОВАЯ ЕКАТЕРИНА АНДРЕЕВНА

**МОДУЛИРОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО
РЕЦЕПТОРА В ХИМИОТЕРАПИИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ**

14.01.12 — онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук
Марианна Геннадиевна Якубовская

Москва – 2019 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ В ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ	15
1.1. Молекулярные основы применения глюкокортикоидов в терапии онкологических заболеваний	15
1.1.1. Функционирование глюкокортикоидов в организме	15
1.1.1.1. Регуляция синтеза и активности эндогенных глюкокортикоидов	15
1.1.1.2. Глюкокортикоидный рецептор	18
1.1.1.3. Механизмы действия глюкокортикоидов	18
1.1.2. Современное использование глюкокортикоидов в химиотерапии онкологических заболеваний.....	23
1.1.2.1. Использование глюкокортикоидов в качестве цитостатических препаратов при лечении опухолей кроветворной системы.....	23
1.1.2.2. Использование глюкокортикоидов в качестве противовоспалительных препаратов при терапии солидных опухолей	27
1.2. Роль глюкокортикоидного рецептора в регуляции сигнальных путей, определяющих злокачественную трансформацию клетки	31
1.2.1. Влияние глюкокортикоидов на пролиферативный потенциал клеток опухолей (клеточный цикл, рост-ингибирующие факторы, иммортализация)	31
1.2.2. Роль глюкокортикоидов в индукции апоптоза.....	33
1.2.3. Влияние глюкокортикоидов на неоангиогенез	39
1.2.4. Влияние глюкокортикоидов на эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию и метастазирование	41
1.2.5. Влияние глюкокортикоидов на клеточную дифференцировку	49
1.2.6. Глюкокортикоиды и генетическая нестабильность	53
1.2.7. Влияние глюкокортикоидов на сигнальные пути, связанные с развитием множественной лекарственной устойчивости	56
1.2.8. Влияние глюкокортикоидов на метаболизм опухолевой клетки	62
1.2.9. Подавление противоопухолевого иммунитета и эффекты глюкокортикоидов на этот процесс	68
1.3. Современные подходы к избирательной активации глюкокортикоидного рецептора в терапии злокачественных новообразований	73
1.3.1. Лиганды глюкокортикоидного рецептора, используемые в терапии или изучаемые в качестве перспективных новых средств	73

1.3.1.1. Классические агонисты и антагонисты глюкокортикоидного рецептора	73
1.3.1.2. Модифицированные глюкокортикоиды.....	74
1.3.1.3. Селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора.....	77
1.3.1.4. Механизмы действия селективного агониста глюкокортикоидного рецептора, CpдA	79
1.3.1.5. Перспективы использования CpдA в клинической практике.....	83
1.3.2. Ингибирование «генов побочных эффектов» глюкокортикоидов	89
1.3.2.1. Роль REDD1 в канцерогенезе и функционировании глюкокортикоидного рецептора	90
1.3.2.2. Основные эффекторы GR в реализации побочного действия глюкокортикоидов	94
1.3.2.3. Перепрофилирование лекарственных препаратов в онкологии и использование этого подхода при поиске ингибиторов побочных эффектов глюкокортикоидов	98
1.4. Заключение	108
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	109
2.1. Список используемых реактивов.....	109
2.2. Список используемых приборов.....	112
2.3. Синтез энантиомеров CpдA	112
2.4. Синтез химических производных CpдA	113
2.5. Синтез наночастиц золота и липопротеинов высокой плотности (HDL NP)	116
2.6. Клеточные линии.....	117
2.7. Определение цитотоксического эффекта и кинетики пролиферации.....	117
2.8. Определение уровня апоптоза	118
2.9. Выделение РНК и обратная транскрипция.....	118
2.10. Полуколичественный ПЦР-анализ	119
2.11. Количественный ПЦР-анализ	119
2.12. Электрофорез ДНК в агарозном геле	121
2.13. Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS.....	122
2.14. Вестерн блоттинг.....	122
2.15. Трансформация бактериальных клеток	122
2.16. Выделение плазмидной ДНК	123
2.17. Приготовление сред и растворов для работы с бактериями	123
2.18. Используемые генетические конструкции.....	123
2.19. Трансдукция клеток лентивирусными векторами	124
2.20. Определение активности люциферазы	124
2.21. Оценка связывания лигандов GR с рецептором.....	125
2.22. Бактериальный тест на мутагенную активность Эймса	125
2.23. Выделение моноцитарной фракции крови крови пациентов.....	126

2.24. Анализ профилей экспрессии генов на ДНК-микрочипах Illumina	126
2.25. Биоинформатический скрининг потенциальных ингибиторов REDD1	126
2.26. Оценка противоопухолевой активности <i>in vivo</i> на ксенографтах лимфомы у бестимусных мышей.....	126
2.27. Оценка противоопухолевой активности CpдA-03 <i>in vivo</i> на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей	127
2.28. Оценка атрофических и воспалительных процессов <i>in vivo</i> у мышей.....	127
2.29. Оценка влияния глюкокортикоидов <i>in vivo</i> на кожу здоровых добровольцев.....	128
2.30. Гистологический и иммунохимический анализ.....	128
2.31. Морфометрический анализ	129
2.32. Статистическая обработка данных	129
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	130
3.1. Оценка противоопухолевого эффекта селективного агониста глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), 2-(4-ацетофенил)-2-хлор-N-метилдиэтиламмоний хлорида или CpдA	131
3.1.1. Оценка противоопухолевого эффекта CpдA <i>in vitro</i> и <i>ex vivo</i>	131
3.1.2. Исследование способности CpдA к запуску транс-репрессии и транс-активации глюкокортикоидного рецептора	137
3.1.3. Определение противоопухолевого эффекта CpдA <i>in vivo</i>	143
3.1.4. Исследование совместного влияния CpдA и противоопухолевых препаратов различных классов на жизнеспособность опухолевых клеток	145
3.2. Разработка подходов к получению новых SEGRA на основе молекулы CpдA.....	159
3.2.1. Получение наночастиц золота, содержащих CpдA, и оценка их противоопухолевого эффекта <i>in vitro</i>	159
3.2.2. Исследование противоопухолевой активности энантиомеров CpдA	161
3.2.2.1. Разработка подходов к получению энантиомеров CpдA	161
3.2.2.2. Оценка антипролиферативного и проапоптотического эффектов энантиомеров CpдA.....	164
3.2.2.3. Исследование способности энантиомеров CpдA к запуску транс-репрессии и транс-активации глюкокортикоидного рецептора.....	166
3.2.2.4. Исследование мутагенной активности энантиомеров CpдA	170
3.2.3. Исследование противоопухолевой активности химических производных CpдA.....	172
3.2.3.1. Разработка подходов к получению химических производных CpдA	173
3.2.3.2. Оценка противоопухолевого эффекта химических производных CpдA <i>in vitro</i>	174
3.2.3.3. Оценка влияния новосинтезированных химических производных CpдA на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора	177
3.2.3.4. Исследование мутагенной активности химических производных CpдA.....	184

3.2.3.5. Оценка противоопухолевого эффекта наиболее активного химического производного CpdA, CpdA-03, <i>in vivo</i>	189
3.3. Модулирование функции глюкокортикоидного рецептора с использованием направленной регуляции GR-зависимых генов	190
3.3.1. Анализ профилей экспрессии генов с целью поиска ключевых генов, регулирующих развитие побочных эффектов глюкокортикоидов	190
3.3.2. Биоинформатический скрининг баз данных для поиска потенциальных ингибиторов REDD1 и предварительный скрининг их биологических эффектов <i>in vitro</i>	193
3.3.3. Оценка влияния рапамицина на GR–зависимую экспрессию гена REDD1	199
3.3.4. Влияние ингибитора экспрессии REDD1 рапамицина на активацию GR	203
3.3.4.1. Действие рапамицина на ядерную транслокацию и фосфорилирование GR	203
3.3.4.2. Оценка степени запуска механизмов транс-репрессии и транс-активации	205
3.3.5. Исследование влияния рапамицина на эффекты глюкокортикоидов <i>in vivo</i>	208
3.3.5.1. Противоопухолевый эффект в комбинации глюкокортикоидов с рапамицином.....	208
3.3.5.2. Влияние рапамицина на GC-индуцированную атрофию кожного покрова.....	210
3.3.5.3. Оценка влияния рапамицина на GC-индуцированную атрофию кожного покрова и костной ткани при системном применении.....	215
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	217
4.1. Повышение противоопухолевых эффектов сигнального пути GR посредством использования SEGRA.....	217
4.1.1. Противоопухолевые свойства CpdA	217
4.1.2. Походы к разработке новых SEGRA.....	219
4.2. Модулирование функциональной активности глюкокортикоидного рецептора посредством ингибирования REDD1	222
4.2.1. Ингибирование REDD1 как результат использования биоинформатического подхода к поиску путей снижения побочных эффектов глюкокортикоидов.....	222
4.2.2. Влияние рапамицина на терапевтические и побочные эффекты глюкокортикоидов.....	223
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	227
ВЫВОДЫ.....	228
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	229
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	235

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

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

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

Схема молекулярных механизмов действия GR является довольно упрощенной, поскольку не все побочные эффекты ассоциированы с запуском транс-активации, равно как и не все терапевтические эффекты определяются транс-репрессией. Ряд GC-зависимых осложнений действительно реализуется за счет индукции транс-активации, в частности, гипергликемия и атрофические явления в кожной и мышечной ткани. У других GC-опосредованных побочных эффектов, таких как нарушения в работе гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, в основе лежит транс-репрессия, а вклад в развитие остеопороза вносят оба механизма. Тем не менее, описаны лиганды GR, которые могут избирательно индуцировать транс-репрессию без

запуска транс-активации, что ведет к уменьшению риска системных побочных эффектов при сохранении противовоспалительной активности. Данные соединения относятся к классу селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA). Селективный характер фармакологического действия SEGRA в настоящее время рассматривается как новый подход для повышения качества химиотерапии лейкозов и адъювантной терапии онкологических заболеваний, позволяющий снизить побочные эффекты лечения GR-зависимыми препаратами. Другим подходом к снижению побочных эффектов при длительной высокодозной терапии GC является выявление генов, отвечающих за развитие таких осложнений и направленное подавление их экспрессии и/или активности кодируемых ими белков. Учитывая активное использование глюкокортикоидов при лечении онкологических заболеваний, исследование механизмов регуляции и функционирования генов, определяющих развитие GC-индуцированных осложнений и разработка стратегии подавления их экспрессии, а также изучение новых лигандов GR класса SEGRA со сниженными побочными эффектами являются актуальными задачами экспериментальной онкологии.

Степень разработанности проблемы

В области исследования SEGRA одним из наиболее изученных препаратов данного класса является CpdA (Compound A), синтетический аналог соединения, выделенного из африканского кустарника семейства амарантовых *Salsola tuberculatiformis Botschantzev*. CpdA представляет собой соединение нестероидной структуры, для которого была продемонстрирована аффинность к GR в условиях конкурентного связывания с использованием меченого дексаметазона. CpdA не индуцирует димеризацию GR и последующие процессы транслокации рецептора в ядро и активации транскрипции, а избирательно подавляет активность транскрипционных факторов. Описаны его противовоспалительные свойства на ряде моделей *in vitro* и *in vivo*, и доказано, что CpdA относится к классу SEGRA и вызывает развитие побочных эффектов GR в меньшей степени. Противоопухолевые свойства CpdA были изучены ранее на моделях рака предстательной железы и множественной миеломы. В задачи представленной работы входил анализ противоопухолевой активности CpdA, как индивидуально, так и в комбинации с различными противоопухолевыми препаратами, на моделях лейкозов и лимфом *in vitro* и *in vivo*, в сравнении с дексаметазоном (Dex), часто использующимся в протоколах химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы.

Однако CpdA обладает невысокой стабильностью в водных растворах. Кроме того, одним из продуктов распада CpdA является канцерогенно-опасный фенилазирин, что ограничивает его применение. Более того, молекула CpdA хиральна, то есть может существовать в виде двух оптических изомеров, которые одинаковы по своим физико-химическим характеристикам, но

могут обладать разными биологическими свойствами. В практическом аспекте необходимо отметить, что препараты, основное действующее вещество которых представляет собой хиральную молекулу, разрешены к реализации только в виде отдельных оптических изомеров. В этом отношении представляется перспективной разработка и изучение эффектов более стабильных аналогов *CpdA*, а также отдельных энантиомеров данной молекулы. Энантиомеры *CpdA*, а также более стабильные аналоги или производные *CpdA*, в литературе не описаны. В задачи работы входило расширение списка SEGRA на основе *CpdA* с использованием трех подходов: 1) получение наночастиц из липопротеинов высокой плотности, загруженных *CpdA*, 2) синтез оптических изомеров молекулы, 3) синтез химических аналогов *CpdA*, и оценка их биологических свойств.

Поиск «генов побочных эффектов» был проведен на клетках лейкоза, лимфомы, рака предстательной железы, множественной миеломы и др. путем анализа профилей экспрессии генов после воздействия данных лигандов [1, 2]. Среди генов, экспрессия которых значительно повышалась после воздействия GC, и которые по литературным данным были вовлечены в развитие побочных эффектов GC, был отмечен ген *REDD1*. Повышение экспрессии этого гена после применения GC ассоциировано с атрофическими явлениями: атрофии кожного покрова, мускулатуры, а также остеопороза. В проанализированных профилях экспрессии генов в 15% наиболее сильно индуцируемых при действии GC генов входил *REDD1*. Этот ген является консервативным GR-зависимым геном, его продукт ингибирует индуцируемый стрессом mTOR. Как показали исследования последних лет, при действии GC в ряде тканей, чувствительных к стероид-индуцированной атрофии, наблюдается повышение экспрессии гена *REDD1*. Мыши с нокаутом *REDD1* оказались резистентным к развитию GC-опосредованной атрофии кожи, в то время как противовоспалительные эффекты GC сохранились в полном объеме. Однако фармакологические ингибиторы экспрессии гена *REDD1* в настоящее время в литературе не описаны. В связи с этим перспективным направлением является поиск ингибиторов экспрессии *REDD1* и оценка их влияния на функциональную активность GR.

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

Цели и задачи исследования

Целью данного исследования являлся изучение молекулярных механизмов избирательной активации глюкокортикоидного рецептора *in vitro* и *in vivo* и определение возможностей использования селективного модулирования функциональной активности рецептора для

оптимизации химиотерапии гемобластозов.

В соответствии с основной целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Изучить молекулярные механизмы действия селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) на моделях лейкозов и лимфом:

- исследовать противоопухолевый эффект CpдA *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*;
- изучить влияние CpдA на функциональную активность GR;
- проанализировать биологические эффекты CpдA в сочетании с противоопухолевыми препаратами различных классов *in vitro* и *in vivo*.

2. Провести оценку противоопухолевого эффекта *in vitro* и *in vivo* новосинтезированных энантиомеров CpдA и химических производных CpдA:

- оценить GR-зависимый антипролиферативный эффект полученных соединений;
- проанализировать влияние полученных соединений на индукцию апоптоза на модельной системе злокачественных новообразований кроветворной системы *in vitro*;
- исследовать противоопухолевый эффект наиболее активных соединений *in vivo*.

3. Изучить влияние энантиомеров CpдA и химических производных CpдA на функционирование GR

- определить аффинность новосинтезированных химических производных CpдA к GR;
- исследовать эффект новосинтезированных химических производных CpдA на фосфорилирование GR;
- оценить влияние всех полученных соединений на индукцию механизмов транс-репрессии и транс-активации.

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

- отобрать среди зарегистрированных лекарственных препаратов потенциальные ингибиторы *REDD1*;
- изучить их эффекты на экспрессию *REDD1* и на функциональную активность GR;
- оценить противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* наиболее активных ингибиторов *REDD1* в комбинации с глюкокортикоидами;
- исследовать влияние ингибирования *REDD1* на системное и локальное действие глюкокортикоидов *in vivo*.

Научная новизна исследования

Научная новизна исследования обусловлена тем, что впервые изучены подходы к селективному модулированию функциональной активности глюкокортикоидного рецептора при злокачественных новообразованиях кроветворной системы. В частности, впервые

продемонстрировано, что CpдA является соединением класса SEGRA и оказывает противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* индивидуально и в комбинации с ингибитором протеасом бортезомибом на моделях лейкозов и лимфом. Впервые разработаны эффективные подходы к получению энантиомеров CpдA с использованием оптически активного субстрата, а эффективными подходами к синтезу производных CpдA являются четырехстадийный метод на основе 1-арилэтанонов и метод, где ключевой стадией является синтез аминспиртов по реакции азометинового илида с ароматическими альдегидами. При оценке биологических свойств полученных соединений было впервые показано, что новосинтезированные R- и S-энантиомеры хирального соединения CpдA, являются селективными агонистами GR, действующими преимущественно по механизму активации транс-репрессии, причем их противоопухолевые и проапоптотические эффекты, а также влияние на транс-реессию и транс-активацию сопоставимы с действием рацемической смеси, противоопухолевый и проапоптотический эффекты ряда новосинтезированных химических производных CpдA преимущественно опосредованы активацией глюкокортикоидного рецептора по механизму транс-репрессии. Необходимо отметить, что среди новосинтезированных производных CpдA соединение CpдA-03 обладает наиболее высокой аффинностью к глюкокортикоидному рецептору, сопоставимой с аффинностью исходного соединения, и проявляет наиболее выраженное противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы P388. С помощью биоинформатического скрининга впервые было отобрано 9 зарегистрированных лекарственных препаратов, потенциальных ингибиторов экспрессию *REDD1*. Для данных препаратов было впервые продемонстрировано, что они подавляют как базальную, так и GC-индуцированную экспрессию *REDD1*, из которых наиболее активным является рапамицин. Впервые было показано, что рапамицин влияет на функциональную активность GR, снижая GC-индуцированное фосфорилирование GR по остатку Ser211 и GC-зависимую транслокацию GR в ядро, а также подавляя запуск GC-индуцированной транс-активации; при этом степень запуска транс-репрессии либо не изменяется, либо усиливается. Также было продемонстрировано, что рапамицин в комбинации с дексаметазоном обладает синергическим противоопухолевым эффектом *in vitro* и *in vivo*, в то же время снижая степень GC-индуцированных побочных эффектов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

При выполнении данного исследования был получен ряд приоритетных данных. Было показано противоопухолевое действие соединения класса SEGRA, CpдA, *in vitro* и *in vivo* индивидуально и в комбинации с ингибитором протеасом бортезомибом на моделях лейкозов и лимфом. В ходе исследования были разработаны стратегии синтеза аналогов селективного

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

Методология и методы исследования

В качестве методологической основы исследования были использованы комплексный и системный подходы с применением современных физико-химических и молекулярно биологических методов исследования. В качестве модельной системы *in vitro* в представленной работе были использованы клетки линии Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза СЕМ и В-клеточной мантийноклеточной лимфомы Granta, а также сублинии данных клеток с подавленной с помощью короткой шпилечной РНК к гену GR экспрессией рецептора. Для получения лентивирусов использовали клетки эпителия почки человека HEK293-T, для моделирования воздействия GC на кожный покров *in vitro* использовали иммортализованные кератиноциты человека HaCaT. В качестве модельных систем *ex vivo* использовали первичные моноциты, выделенные из образцов крови пациентов НИИ ДОиГ и НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для моделирования системных и локальных побочных эффектов глюкокортикоидов *in vivo* использовали модели воспаления на ушах, глюкокортикоид-индуцированной атрофии кожного покрова, глюкокортикоид-индуцированного

остеопороза. Для исследования противоопухолевого эффекта анализируемых соединений *in vivo* были использованы модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей и ксенографтов лимфомы у бестимусных мышей. Методическая база данной работы включала в себя такие молекулярно-биологические методы как: трансдукция лентивирусных конструкций, определение антипролиферативного и цитотоксического эффектов с помощью прямого подсчета клеток, МТТ- и МТС-тестов на цитотоксичность, полимеразная цепная реакция, Вестерн-блоттинг, люциферазный репортерный анализ, проточная цитофлуориметрия, гистология и иммуногистохимия, анализ профилей экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов и др. Синтез энантиомеров CpдА проводили на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова. Синтез химических производных CpдА проводили в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского. Получение наночастиц проводили в лаборатории Ш. Тэкстона, университет Норвестерн, Чикаго, США. Биоинформатический скрининг проводили в лаборатории Дж.Т. Дадли, госпиталь Маунт-Синай, Нью-Йорк, США. Достоверность результатов подтверждена адекватным выбором методов и использованием современных методов математической статистики.

Положения, выносимые на защиту

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

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

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

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

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

наиболее активным является рапамицин.

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами молекулярно-биологических исследований, полученные автором новые данные согласуются с имеющимися в литературе данными по изучению биологических свойств селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора. Достоверность полученных данных основана на адекватном выборе и корректном использовании в исследовании современных методов анализа, полученные результаты обработаны с использованием адекватных методов математической статистики. По материалам диссертации опубликовано 23 статьи в зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК. Результаты исследования были представлены и обсуждены на конференциях: ежегодная конференция Американского общества онкологов AACR (17-21 апреля 2010 г., Вашингтон, США, 2-6 апреля 2011 г., Орlando, США, 31 марта – 4 апреля 2012 г., Чикаго, США), ежегодная конференция Европейского общества дерматологов ESDR (19-22 сентября 2012 г., Венеция, Италия), ежегодная конференция Американского общества генетиков ASHG (6-10 ноября 2012 г., Сан-Франциско, США) всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» (20-21 марта 2014 г., Москва, Россия), XII-XV всероссийская научно-практическая конференция «Отечественные противоопухолевые препараты» (2-4 апреля 2015 г., 17-18 марта 2016 г., 16-17 марта 2017 г., 29-30 марта 2018 г., Москва, Россия), международная конференция «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (9-12 июля 2015 г., Томск, Россия), научная школа «Сигнальные пути ядерных рецепторов» (23-28 августа 2009 г., 23-28 августа 2015 г., 27 августа – 1 сентября 2017 г., о. Спетцес, Греция), I-IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (16-17 декабря 2015 г., 6-8 декабря 2016 г., 6-8 декабря 2017 г., 17-19 декабря 2018 г., Москва, Россия), V Съезд физиологов СНГ (6-10 октября, Дагомыс, Россия), II, III, IV Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (22-24 июня 2016 г., 23–24 июня 2017 г., Санкт-Петербург, Россия), X Съезд онкологов СНГ и Евразии (23-25 апреля 2018 г., Сочи, Россия), конгресс Европейского общества онкологов EACR (30 июня – 3 июля 2018 г.,

Амстердам, Нидерланды). Аprobация диссертации состоялась 26 марта 2019 года на объединенной научной конференции отдела химического канцерогенеза, отдела экспериментальной биологии опухолей, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза, лаборатории клинической биохимии НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ В ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Глюкокортикоидный рецептор (GR), в отличие от прочих рецепторов стероидных гормонов, не рассматривают в качестве онкогена. При раке молочной железы (РМЖ) избыточная пролиферация клеток, злокачественная трансформация, приобретение способности к инвазии и метастазированию во многих случаях опосредована активацией сигнального пути эстрогенового рецептора (ER); при раке предстательной железы подобную роль играет рецептор андрогенов (AR). Соответственно, терапия данных заболеваний в большинстве случаев основана на подавлении функции рецептора стероидного гормона. В свою очередь, глюкокортикоиды (GC) посредством активации GR подавляют рост и жизнеспособность опухолевых клеток, а также индуцируют в них апоптоз. GC особенно эффективны в отношении лимфоцитов и лимфобластов; их использование в терапии острых лимфобластных лейкозов, множественной миеломы, лимфом Ходжкина, неходжкинских лимфом и ряда других злокачественных новообразований кроветворной системы насчитывает несколько десятилетий. Однако GC, как и многие другие препараты, обладают плеiotропностью действия: активированный ими GR влияет практически на каждый процесс в органах и тканях, и, несомненно, оказывает эффект на сигнальные пути, изменения в которых являются отличительными свойствами опухолевой клетки. В настоящем обзоре проанализирована информация по физиологическим, биохимическим и молекулярным механизмам действия GC, а также рассмотрена химиотерапия злокачественных новообразований различных типов с использованием GC. Большая часть обзора посвящена анализу влияния GC на ключевые процессы, задействованные в злокачественной трансформации клетки и опухолевой прогрессии, а также подходам к повышению эффективности и безопасности терапии глюкокортикоидами и их реализации в настоящее время.

1.1. Молекулярные основы применения глюкокортикоидов в терапии онкологических заболеваний

1.1.1. *Функционирование глюкокортикоидов в организме*

1.1.1.1. Регуляция синтеза и активности эндогенных глюкокортикоидов

Глюкокортикоиды принадлежат к семейству стероидных гормонов, которое также включает в себя минералокортикоиды, андрогены, эстрогены и прогестерон. По своей химической структуре стероидные гормоны схожи за счет четырехзвенной циклопентанфентантроновой структуры. Биологически активные стероиды синтезируются из холестерина в процессе мультиферментного процесса – стероидогенеза [2]. Выработка глюкокортикоидов в эндокринных железах контролируется рядом ферментов и их кофакторов,

экспрессируемых гормон-продуцирующими клетками. При синтезе глюкокортикоидов в коре надпочечников ключевыми ферментами синтеза являются 17-гидроксилаза, 3-бета-гидроксистероид, дегидрогеназа, 21-гидроксилаза и 11-бета-гидроксилаза. В организме человека биологически активным глюкокортикоидом является гидрокортизон (hydrocortisone, HCS) в то время как основным медиатором активности GR у грызунов является кортикостерон. Синтез GC в коре надпочечников регулируется гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) (Рисунок 1). В ответ на сигнал от нейронов или цитокинов происходит высвобождение кортикотропин-рилизинг-гормона или кортиколиберина (corticotropin-releasing hormone, CRH), который, в свою очередь, стимулирует высвобождение аденокортикотропного гормона (АКТГ) из передней доли гипофиза [3]. АКТГ индуцирует синтез GC в надпочечниках и их последующую секрецию в кровеносное русло, что и обуславливает развитие системных эффектов GC. Необходимо отметить, что эффекты HPA реализуются по классическому механизму отрицательной обратной связи: увеличение уровня гидрокортизона в циркулирующей крови приводит к уменьшению экспрессии CRH и АКТГ (Рисунок 1). Функционирование системы HPA подчинено циркадным ритмам. В организме человека уровень гидрокортизона (HCS) в крови максимален в утренние часы, постепенно снижается в течение дня и ночью достигает минимума. У грызунов, часто используемых в исследованиях эффектов глюкокортикоидов, наблюдается обратная зависимость: уровень кортикостерона максимален в ночное время, а сниженные концентрации наблюдаются в течение дня.

Также одной из основных функций системы HPA является ответ на стрессовые состояния, когда при физическом или эмоциональном стрессе наблюдается увеличение секреции GC. Стимулами также могут являться провоспалительные цитокины, в частности интерлейкин-1 (IL-1), фактор некроза опухоли α (TNF α), интерлейкин-6 (IL-6), и интерфероны типа I (IFN α и IFN β) [4], которые высвобождаются в ответ на какой-либо патоген и/или повреждение тканей. Индуцируемая цитокинами секреция HCS снижает развитие последующего иммунного ответа, что также объясняется механизмом отрицательной обратной связи. Нарушения этого механизма ведут к чрезмерной или, наоборот, сниженной секреции GC, что в свою очередь приводит к развитию синдрома Иценко-Кушинга и болезни Аддисона.

Уровень секреции GC играет важную роль в развитии системных эффектов HCS, однако активность и распределение HCS также регулируется непосредственно на тканевом или клеточном уровне [5]. У здорового человека 80-90% циркулирующего HCS находится в связанном состоянии с кортикостероид-связывающим глобулином (транскортином, CBG), 5-10% связаны с альбумином; и только 5% от циркулирующего HCS находятся в активном состоянии. Таким образом, тканеспецифический эффект эндогенного HCS зависит от уровня синтеза и

концентрации CBG. На клеточном уровне активность глюкокортикоидов регулируется ферментами семейства 11 β -гидроксистероид дегидрогеназ (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β -HSD). Два фермента из указанного семейства, 11 β -HSD1 и 11 β -HSD2, регулируют конверсию биологически активного HCS из его неактивного предшественника кортизона. В физиологических условиях, 11 β -HSD1 способствует превращению HCS из кортизона, таким образом увеличивая активность глюкокортикоидов локально, вне зависимости от общего поддерживающегося уровня HCS в крови [6]. В отличие от 11 β -HSD1, 11 β -HSD2 катализирует процесс превращения HCS в кортизон, тем самым снижая активность GC в клетках, экспрессирующих данный фермент. Таким образом, баланс между уровнем экспрессии 11 β -HSD1 и 11 β -HSD2 является регулятором активности GC на клеточном уровне. Более того, экспрессия генов 11 β -HSD1 и 11 β -HSD2 регулируется цитокинами, которые одновременно повышают уровень 11 β -HSD1 и снижают уровень 11 β -HSD2 в местах воспаления, что обеспечивает более высокую активность и интенсивность противовоспалительного действия GC [7].

Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ось НРА)

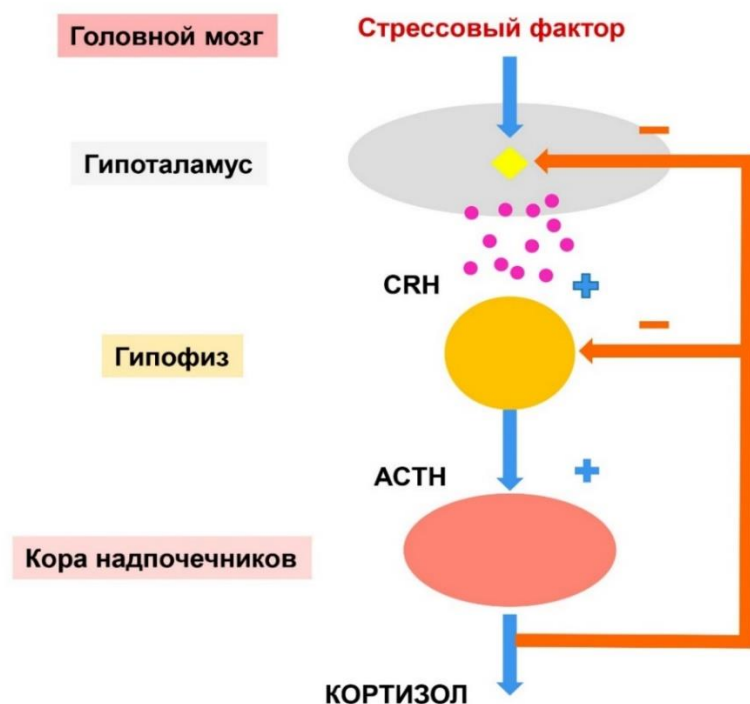


Рисунок 1 - Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (адаптировано из [4])

1.1.1.2. Глюкокортикоидный рецептор

Эффекты глюкокортикоидов реализуются посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR), принадлежащего к надсемейству ядерных рецепторов. GR является белковым продуктом трансляции гена *GR*, причем за счет альтернативного сплайсинга и альтернативной инициации трансляции образуется большое количество белковых изоформ рецептора. Более того, после завершения трансляции GR подвергается пост-трансляционным модификациям, таким как фосфорилирование, сумоилирование, убиквинилирование и ацетилирование, каждая из которых изменяет функциональную активность GR [8] (Рисунок 2). Необходимо отметить, что чувствительность и специфичность глюкокортикоидов во многом зависит от типа клеток, на которые в данный момент воздействует гормон.

Белок GR состоит из трех функциональных доменов: N-концевой транс-активационный домен (NTD), центральный ДНК-связывающий домен (DBD), и С-концевой лиганд-связывающий домен (LBD) (Рисунок 2) [9]. NTD несет в себе большинство сайтов для пост-трансляционных модификаций, а также активаторный участок AF1, который отвечает за связывание рецептора с ко-регуляторами и регуляцию транскрипции. DBD содержит в себе два мотива «цинковые пальцы», который обуславливают связывание рецептора с ДНК. LBD имеет в своем составе гидрофобный «карман» для связывания с гормоном и активаторный участок, необходимый для лиганд-зависимого связывания GR с ко-регуляторами. GR содержит в себе два участка, отвечающих за ядерную транслокацию GR, NL1 и NL2, которые находятся в доменах DBD и LBD.

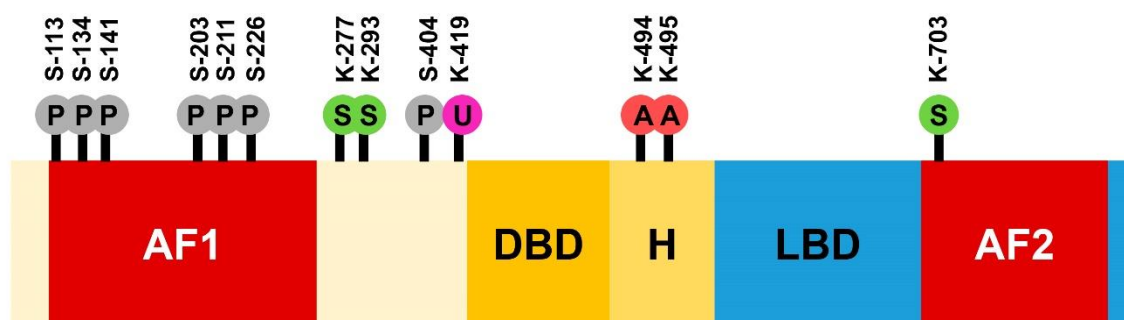


Рисунок 2 - Доменная структура глюкокортикоидного рецептора (адаптировано из [8, 9]). AF1, AF2 – активаторные участки 1 и 2, DBD – ДНК-связывающий домен, H – «шарнирный» домен (hinge region), LBD – лиганд-связывающий домен

1.1.1.3. Механизмы действия глюкокортикоидов

В отсутствие лиганда GR локализован в цитоплазме в составе белкового комплекса с шаперонами - белками теплового шока (heat shock protein, HSP) HSP70 и HSP90, иммунофилинами FKBP51 и FKBP52, а также нерецепторными тирозин-киназами c-Src [10]. В

данном состоянии GR неактивен, но высокоаффинен к связыванию с лигандом. После связывания с гормоном конформация белка меняется, что вызывает диссоциацию белкового комплекса. Эффекты GR в комплексе с лигандом подразделяются на два типа: 1) транслокацию рецептора в ядро, обуславливающее геномные эффекты; 2) высвобождение компонентов белкового комплекса, которые являются в то же время звеньями основных сигнальных путей, что обуславливает достаточно быстрые внегеномные эффекты (Рисунок 3).

Ядерная транслокация GR приводит к развитию геномных эффектов, заключающихся в усилении или подавлении транскрипции гена-мишени. Транс-активация является формой регуляции транскрипции, при которой гомодимер комплекса GC-GR связывается с определенными последовательностями ДНК, так называемыми глюкокортикоид-респонсивными элементами (glucocorticoid-responsive element, GRE) (Рисунок 3). Последовательности типичных GRE представляет собой неполный палиндром GGAACAnnnTGTTCT, состоящий из двух участков, соединенных тринуклеотидным спейсером. Каждая субъединица гомодимера GR связывается с одним из участков. GRE присутствуют в промоторах, интронах или экзонах генов-мишеней, и связывание GR с GRE приводит к реорганизации хроматина, активации ко-регуляторов и изменению активности РНК-полимеразы II [11]. Наиболее распространенными ко-регуляторами транскрипции при действии GR являются гистоновая ацетилтрансфераза CBP/p300, ко-активатор-ассоциированная аргининовая метилтрансфераза, а также ко-активаторы рецепторов стероидных гормонов. Взаимодействие GR с GRE ранее соотносили с активацией транскрипции, однако в ходе исследования в области полномасштабного анализа генома было показано, что связывание GR с каноническими GRE не обязательно усиливает экспрессию генов, а более того, может приводит к подавлению их транскрипции [12].

Взаимодействие активированного GR с GRE может происходить по нескольким механизмам за счет взаимодействия:

- 1) непосредственно с последовательностью GRE в промоторах GR-регулируемых генов;
- 2) с составными GRE (tethering GRE), которые содержат несколько сайтов связывания нерецепторных транскрипционных факторов, но не содержат GRE. В данном случае GR образует комплекс с данными факторами транскрипции, тем самым влияя на их транскрипционную активность. Этот механизм регуляции экспрессии генов не требует взаимодействия GR с ДНК [13–15]. Примером такого взаимодействия может служить подавление транскрипции субъединицы AP-1, c-Jun, когда GR связывается с GRE, наиболее близко расположенному к промотору гена коллагеназы и далее взаимодействует с c-Jun. Аналогичным образом осуществляется подавление экспрессии транскрипции гена IL-8, когда GR связывается с p65, субъединицей транскрипционного комплекса NFκB, который находится в связанном состоянии с сайтами κB [13].

3) с комплексными GRE (composite GRE), которые состоят из 1 или более GRE и одного или чаще нескольких сайтов связывания нерецепторных факторов транскрипции. Это инициирует процесс взаиморегуляции транскрипционных факторов разных классов, что в свою очередь влияет на конечный результат регуляции экспрессии генов [13–15]. Первый комплексный GRE был описан в гене пролиферина, экспрессия которого индуцируется GR только в присутствии транскрипционного комплекса AP-1. Также наиболее изученным примером такого взаимодействия является GR-опосредованное подавление активности провоспалительных транскрипционных факторов NF- κ B [16]. Связывание GR с одной из субъединиц NF- κ B, p65, подавляет экспрессию провоспалительных генов за счет ряда механизмов, включая взаимодействие с ко-активаторами и блокировку транскрипционного аппарата [10]. Аналогичным образом осуществляется GR-зависимая регуляция ряда генов, кодирующих белки из семейства передачи сигнала и активации транскрипции (signal transducer and activator of transcription, STAT) [17, 18] (Рисунок 3).

Диаметральная противоположность эффектов GR на экспрессию генов может быть объяснена наличием регуляторных элементов в ДНК, не относящихся к GRE. Так, в ряде недавних исследований было показано, что GR может подавлять транскрипцию за счет связывания с негативными GRE (nGRE) в промоторах генов-мишеней [19] (Рисунок 3). Данная форма регуляции осуществляется посредством связывания мономеров GR с nGRE, которые также представляют собой палиндромные последовательности типа CTCC(n)₀₋₂GGAGA с более коротким спейсером длиной от 0 до 2 пар оснований [10].

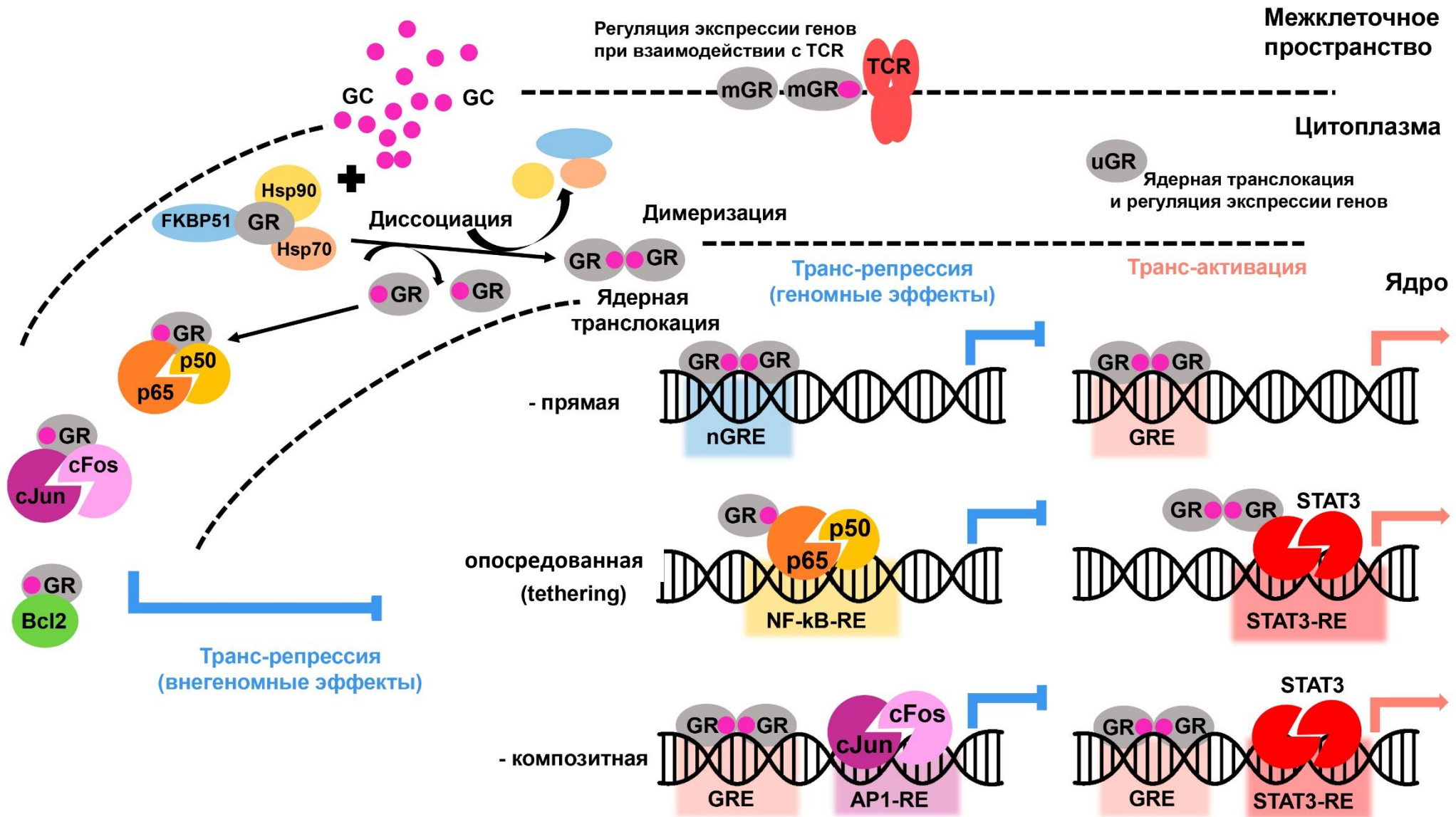


Рисунок 3 - Механизмы действия глюкокортикоидов (адаптировано из [10, 12–22])

Несмотря на то, что GRE и nGRE широко распространены в геноме, в экспериментах по оценке общего рекрутинга GR было продемонстрировано, что GR взаимодействует только с небольшой частью GRE [23]. Более того, доля GR, связанного с GRE, различна в тканях разного генеза, что указывает на то, что большое влияние на уровень связывания GR с GRE оказывает структура хроматина, внося свой вклад в гетерогенность клеточного ответа на действие GC.

В настоящее время очевидно, что GRE (как и респонсивные элементы других транскрипционных факторов) являются центрами динамической сборки и разборки многофакторных регуляторных комплексов, включающих в себя специфические комбинации более чем 100 различных регуляторных и ко-регуляторных белков, образующих данные комплексы за счет белок-белковых и ДНК-белковых взаимодействий [24]. Функционирование данных комплексов отличается точностью воздействия и пластичностью реакции в зависимости от контекста, что позволяет GR регулировать большие кластеры генов, отвечающих за самые разноплановые биологические процессы.

Внегеномные эффекты GR не требуют синтеза белка и развиваются за более короткие промежутки времени, от секунд до минут после активации рецептора [25, 26]. Внегеномные эффекты глюкокортикоидов реализуются посредством нескольких альтернативных механизмов:

1) передача сигнала посредством мембранного GR (mGR), для которого, в частности, было показано участие в регуляции экспрессии генов посредством взаимодействия с T-клеточным рецептором [20]

2) взаимодействие GR с различными компонентами сигнальных путей в цитоплазме [21] (Рисунок 3).

Более того, позже было показано, что GR также может транслоцироваться в митохондрии в зависимости от типа клеток [27]. Так, активированный рецептор в тимоцитах может транслоцироваться в митохондрии и регулировать апоптоз за счет взаимодействия с антиапоптотическим белками семейства Bcl-2 [28].

Связывание глюкокортикоидов с GR не только активирует рецептор, но также способствует высвобождению вспомогательных белков, принимающих участие в активации афферентных сигнальных путей. К примеру, проонкогенная серин-треониновая киназа c-Src, входящая в состав цитоплазматического комплекса GR, после диссоциации комплекса активирует сигнальные пути, регулирующие метаболизм жирных кислот [29].

Отдельно следует отметить, что GR способен также регулировать экспрессию генов даже при отсутствии связывания лиганда с рецептором. Так, было показано, что не связанный с лигандом GR (unliganded GR, uGR) также способен находиться в ядре клетки (Рисунок 3) [22].

Более того, в дальнейших исследованиях было продемонстрировано, что uGR способен перемещаться в ядро, связываться с промотором гена фермента репарации BRCA1 и запускать его экспрессию. При добавлении глюкокортикоида гидрокортизона экспрессия BRCA1 снижалась [30]. При анализе экспрессии генов с помощью микрочипов было выявлено, что uGR оказывает эффект на экспрессию порядка 2600 генов, причем экспрессия была существенно повышена у 260 генов, а значительное уменьшение экспрессии наблюдали для 343 генов [30].

Наиболее распространенной точкой зрения на молекулярные механизмы действия глюкокортикоидов является то, что важным компонентом иммуносупрессивного эффекта GC является подавление экспрессии противовоспалительных генов, в то время как побочные эффекты обусловлены активацией экспрессии генов, которые приводят к развитию патологических состояний. В многом это действительно так, и GR взаимодействует с большим количеством провоспалительных транскрипционных факторов, таких как NF- κ B, AP-1, CREB, GATA-1, GATA-3, t-Bet, и Oct-1, что, свою очередь, приводит к регуляции иммунного ответа [16, 31]. Гены, индукцию которых вызывают глюкокортикоиды, регулируют глюконеогенез, метаболизм жирных кислот, расщепление белков, что вносит свой вклад в развитие побочных эффектов – диабета, нарушений водно-соевого обмена, атрофических явлений и ряду других. Однако данная схема является несколько упрощенной, и для каждого конкретного исследования необходимо в первую очередь оценить вклад каждого из механизмов действия GR на регуляцию экспрессии генов, и затем фокусироваться на тех из них, которые являются максимально задействованными.

1.1.2. Современное использование глюкокортикоидов в химиотерапии онкологических заболеваний

1.1.2.1. Использование глюкокортикоидов в качестве цитостатического препарата при лечении опухолей кроветворной системы

Большое количество информации о глюкокортикоидах как о химиопрепаратах было получено в ходе разработки и оптимизации протоколов лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей и лиц юношеского возраста. Так, в середине XX века было показано, что АСТН уменьшает размер большинства тканей лимфоидной природы за исключением селезенки [32]. В это же время были проведены первые опыты по перевивке опухолевых клеток неизвестного генеза, впоследствии описанные как клетки лимфосаркомы. Данные клетки образовывали опухоли у мышей после перевивки; они не характеризовались спонтанной регрессией, но при экспозиции кортизону значительно уменьшались в размерах. Схожий эффект наблюдали у крыс [32]. После этого кортизон и АСТН стали активно включать в

различные клинические исследования, в ходе которых продемонстрировали, что оба препарата значительно снижают размер опухолей лимфоидной ткани и снижают число трансформированных лимфобластов при лейкозе. Панель злокачественных новообразований кроветворной системы для клинических исследований GC для их терапии была расширена до хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), лимфомы Ходжкина, неходжкинских лимфом, острых миелобластных лейкозов, множественной миеломы, а также злокачественных новообразований миелоидного происхождения, включая острый и хронический миелолейкоз. Терапевтическое действие кортизона и АСТН наблюдали у пациентов с опухолями лимфоидного, но не миелоидного происхождения, причем эффекты были различны: от облегчения симптомов при множественной миеломе до полной, но временной ремиссии при остром лимфобластном лейкозе у детей. Эффекта данных глюкокортикоидов на опухоли другой природы отмечено не было [32]. Таким образом, была доказана эффективность глюкокортикоидов при лечении онкологических заболеваний лимфоидного генеза, а также стал очевидным тот факт, что достижение полной ремиссии невозможно при проведении монотерапии глюкокортикоидами [33].

Параллельно было описано еще несколько соединений с противоопухолевыми свойствами. В частности, ингибиторы сигнальных путей фолиевой кислоты (аметоптерин, метотрексат), которая способна стимулировать прогрессирование лимфом и лейкозов, вызывали значительное, но временное снижение числа бластных клеток в крови. Также, применительно к лечению лейкозов и лимфом, были изучены свойства ипритов, которые применялись в ходе Второй мировой войны и вызывали истощение костного мозга и уменьшение лимфатических узлов. Алкилирующие свойства этих газов были затем взяты за основу дизайна молекул современных противоопухолевых алкилирующих препаратов, таких как циклофосфамид. Эффективными при терапии лейкозов и лимфом оказались также ингибиторы нуклеотидного синтеза, такие как 6-меркаптопурин [33]. Немного позже, в 60х гг прошлого века были сделаны три открытия, заложившие основу для разработки протоколов химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы:

- из растительных экстрактов были выделены винкаалкалоиды (в дальнейшем винкристин, винбластин и пр.), обладающие способностью разрушать микротрубочки и таким образом, обладающие потенциальными противоопухолевыми свойствами;

- было продемонстрировано, что трансформированные лимфоидные клетки не способны к биосинтезу аспарагина, и для успешного роста лимфобластам необходимо усваивать аспарагин из внешней среды. Применение L-аспарагиназы, фермента, преобразующего

аспарагин в аспарагиновую кислоту, лишало клетки необходимого компонента для поддержания жизнедеятельности и в дальнейшем вело к их гибели;

- и, наконец, впервые было показано, что комбинация препаратов гораздо эффективней нежели их индивидуальное применение.

На основании этих данных был разработан и опробован первый успешный протокол комбинированной химиотерапии гемобластозов, включающий в себя винкристин, аметоптерин, 6-меркаптопурин и глюкокортикоид преднизолон. Значение пятилетней выживаемости пациентов детского и юношеского возраста увеличилось с 25% до 60% [33].

В дальнейшем протоколы оптимизировали в зависимости от этиологии и патогенеза заболевания, степени его тяжести, стадии лечения, однако глюкокортикоиды всегда были составной частью лечения на всех его фазах: индукции ремиссии, консолидации ремиссии и поддерживающей терапии. Также разработанные стратегии лечения были адаптированы для использования в терапии взрослых пациентов. Однако здесь необходимо отметить, что выживаемость была значительно ниже: на 1% летальных исходов у детей приходилось 10% смертей у взрослых [32]. В настоящее время ситуация частично улучшилась с введением в клиническую практику ряда таргетных препаратов, однако наиболее предпочтительной стратегией лечения в настоящее время остается трансплантация костного мозга.

ХЛЛ отличается от ОЛЛ тем, что представляет собой избыточную пролиферацию более зрелых клеток лимфоидной системы. Клетки ХЛЛ нечувствительны к факторам индукции апоптоза и накапливаются в кровеносном русле, лимфатических узлах и костном мозге. Болезнь переходит в патологическое состояние, когда количество трансформированных лимфоцитов начинает превышать количество всех остальных клеток кроветворной и лимфатической систем. Глюкокортикоиды вначале использовали для лечения ХЛЛ в качестве монотерапии, но такая схема лечения была успешна только для 11% пациентов. В дальнейшем для терапии ХЛЛ применяли протокол СНОР (циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизолон), но в ряде исследований было показано, что глюкокортикоиды не оказывают существенного влияния на исход лечения, а только ухудшают процесс за счет развития побочных эффектов. Вследствие этого GC были исключены из схемы лечения. В настоящее время терапия ХЛЛ в многом основана на использовании моноклональных антител к специфическим антигенам В-клеток CD20 (ритуксимаб и офатузумаб) и CD52 (алемтузумаб). Применение GC в химиотерапии ХЛЛ все еще является спорным вопросом. При лечении пациентов с ХЛЛ АСТН или НСС наблюдалось уменьшение размеров опухолей в лимфатических узлах и в селезенке, но это также сопровождалось высоким лейкоцитозом. Было высказано предположение, что в дополнение к довольно незначительной индукции клеточной гибели GC также вызывают

обратимое перераспределение лейкоцитов в кровеносной системе. При отсутствии патологий подобные явления наблюдаются при суточных колебаниях GC в крови: при низком уровне GC количество циркулирующих в крови В- и Т-клеток высоко, а при максимальном количестве HCS в крови в утренние часы лимфоциты возвращаются в периферические лимфоидные органы. По некоторым предположениям, это связано с тем, что GC увеличивают экспрессию рецептора хемокинов 4 типа, который в свою очередь повышает хемотаксис лимфоцитов, стимулирует их выход в кровеносное русло и дальнейшую миграцию по организму [34, 35]. Множественная миелома (ММ) представляет собой клональную экспансию плазмочитов, зрелых В-лимфоцитов. Избыточная пролиферация плазмочитов приводит к гиперсекреции иммуноглобулинов, что в свою очередь является причиной снижения иммунного ответа, почечной недостаточности и повреждениям костной ткани. Химиотерапия множественной миеломы значительно эволюционировала с середины прошлого века: безрецидивная выживаемость увеличилась с нескольких месяцев в 1950 г до 7-8 лет в настоящее время [36]. Химиотерапия ММ до недавнего времени включала в себя только алкилирующие агенты в комбинации с глюкокортикоидами, что индуцировало ремиссию, но только у трети пациентов, и часто заканчивалось рецидивом заболевания. Около 30 лет назад для использования в протоколах химиотерапии ММ был предложен препарат талидомид, обладающий антиангиогенными и тератогенными свойствами [37]. В последующие годы была продемонстрирована эффективность комбинированной химиотерапии, включающей в себя талидомид, циклофосфамид и GC [36]. Другим классом соединений, проявившим эффективность при терапии ММ, были ингибиторы протеасом – бортезомиб, карфилзомиб и пр. Более того, при сочетании с глюкокортикоидами был показан синергизм их противоопухолевого действия [38]. Применение полихимиотерапии с участием ингибиторов протеасом и GC было начато в 2003 г. в Европе и США, а в 2006 г. – в России [38]. Механизм противоопухолевого действия глюкокортикоидов при терапии ММ складывается из многих процессов, в частности, GR-зависимого запуска апоптоза, подавление пролиферации за счет ингибирования экспрессии значимых генов, таких как c-Myc и NF-κB [39, 40].

Болезнь Ходжкина была впервые описана в 1832 г. и представляет собой клональную экспансию зрелых В-клеток внутри лимфатических узлов. Первоначально при лечении болезни Ходжкина использовали радиотерапию, однако выживаемость была крайне низкой и к 1920 г. от радиотерапии полностью перешли к химиотерапии. Большинство схем химиотерапии болезни Ходжкина включают в себя те же препараты, которые используются при лечении острого ОЛЛ: хлорамбуцил, циклофосфамид, винкристин и глюкокортикоиды. В последние годы наиболее часто используемыми протоколами являются протоколы ABVD (адриамицин,

блеомицин, винбластин и дакарбазин) и BEACOPP (блеомицин, этопозид, адриаамицин, циклофосфамид, винкристин, прокарбазин и преднизолон). Однако данные схемы лечения также обладают рядом существенных недостатков, в частности, высокой частотой развития вторичных опухолей и высоким риском развития бесплодия [32].

К неходжкинским лимфомам относятся более 30 подтипов злокачественных новообразований лимфоидного происхождения, отличающихся направлением и стадией дифференцировки. Однако, несмотря на гетерогенность этой группы заболеваний, лечение большинства неходжкинских лимфом подразумевает протоколы, включающие в себя глюкокортикоиды. Основной схемой химиотерапии фолликулярных, мантийноклеточных, диффузных крупноклеточных лимфом из В-клеток является схема CHOP; в ряде случаев применяют модифицированную схему R-CHOP, также содержащую ритуксимаб, моноклональное антитело к специфическому для В-клеток антигену. Терапию агрессивных неходжкинских лимфом проводят с использованием протокола hyperCVAD, который представляет собой ту же комбинацию препаратов, что и схема CHOP, но с более активным глюкокортикоидом дексаметазоном [32].

1.1.2.2. Использование глюкокортикоидов в качестве противовоспалительных препаратов при терапии солидных опухолей

Часто GC применяют не как химиотерапевтические препараты, а в качестве сопроводительной терапии, облегчающей проведение основного лечения. В некоторых протоколах, в частности, включающих в себя цисплатин, GC часто используют как противорвотное средство. Также находят свое применение и противовоспалительные свойства GC при разрастании опухолей, метастазировании. В частности, GC применяют для снятия болевого синдрома, зуда и гиперчувствительности при метастатическом раке почки, легких, саркоме Капоши [32, 41]. Более того, для саркомы Капоши было показано в ходе ретроспективных исследований, что лечение распространенного заболевания или его рецидива с использованием протокола EVAD (этопозид, винкристин, доксорубицин и дексаметазон) было эффективным, хотя механизм гибели опухолевых клеток в данном случае не изучен [42]. GC также используют для стимуляции аппетита у пациентов с кахексией [32]. Однако необходимо учитывать, что в ряде случаев существует риск активации с помощью GC защитных механизмов в опухолевых клетках от действия цитостатических препаратов. Также описаны случаи увеличения пролиферативной активности клеток опухоли при применении GC [43–45].

Рак предстательной железы

Рак предстательной железы – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований в мире. Пролиферативная активность клеток рака предстательной железы находится под контролем андрогенов, действующим посредством активации андрогенового рецептора. Соответственно, основным принципом терапии рака предстательной железы является подавление выработки андрогенов, чаще всего при помощи кастрации. Однако высокая вероятность рецидивов через 2-3 года после проведения лечения [46]. Вторичные опухоли способны к росту в отсутствие тестостерона и получили название гормон-резистентных. Глюкокортикоиды применяются в терапии гормон-резистентного рака предстательной железы, в тех случаях, когда после успешной первичной терапии наблюдается увеличение уровня простатического специфического антигена (PSA) при высоком уровне активности AR и при низком уровне циркулирующего тестостерона. У таких пациентов активность AR связывают с андроген-независимой активностью AR, гиперчувствительностью к AR или к низким уровням тестостерона. Основной терапией в таких случаях является применение GC как в монотерапии, так и в комбинации с другими химиопрепаратами, такими как паклитаксел или митоксантрон. Эффективность такой терапии довольно сильно колеблется: подавление уровня PSA наблюдают в 20-79% случаев [46]. Механизм действия GC в данном случае также до конца не ясен. В ряде исследований было показано, что GR играет роль опухолевого супрессора в клетках рака предстательной железы. Активация сигнального пути GR приводит к условной «нормализации» профиля экспрессии генов в клетках РПЖ, в частности, к снижению экспрессии хепсина, альфа-металацилКоА-рацемазы (*alpha-methylacylCoA-racemase*, AMACR), необходимых для поддержания пролиферативной активности клеток РПЖ, увеличению экспрессии регулятора дифференцировки маспина, подавлению активации онкогенных сигнальных путей IL-6, NFκB, MAP и ERK киназ, аресту клеточного цикла за счет увеличения продукции TGFβ, p21 и p27 [47–49]. Также GC подавляют ангиогенез и лимфогенез в перевиваемых опухолях предстательной железы [50, 51]. Однако существует также большое количество данных о противоположных эффектах, вызываемых активацией GR, которые также необходимо учитывать. Так, описано снижение активности опухолевого супрессора p53 и повышение экспрессии антиапоптотического гена/белка S100P, увеличение инвазивного и метастатического потенциала клеток РПЖ. Более того, развитие устойчивости к антагонистам AR второго поколения, таких как букалутамид и флутамид, часто связано с высоким уровнем экспрессии GR [43, 52]. Это, в свою очередь, связано с тем, что около 80% генов, регулируемых AR, регулируются также и GR. В связи с этим, возникает новая концепция терапии РПЖ, в основе которой лежит комбинация антагонистов GR и AR или же использование препаратов «двойного действия», способных одновременно модулировать спектр активности обоих рецепторов. В

частности, в литературе было описано исследование противоопухолевой активности *in vitro* селективного агониста глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), соединения растительного происхождения SpdA, которое также является антагонистом AR. Данное соединение, свойства которого исследовали также и в настоящей работе, в отношении РПЖ представляет собой перспективный прототип мультитаргетного модулятора активности рецепторов стероидных гормонов [48].

Рак молочной железы

РМЖ является одной из наиболее часто встречающихся нозологических форм рака, как в Российской Федерации, так и во всем мире, составляя около 22,9% от всех регистрируемых злокачественных опухолей у женщин [53]. Химиотерапия РМЖ претерпела существенные изменения за последние десятилетия, однако GC по-прежнему остаются одним из наиболее важных компонентов их комбинированного лечения. GC усиливают цитотоксическое действие основного химиопрепарата на злокачественные клетки, снижают тошноту, головокружение и другие побочные эффекты терапии, а также применяются как поддерживающая терапия, защищая здоровые ткани организма от токсических эффектов [43, 45, 54, 55]. Однако ряд исследователей указывают, что GC также вызывают развитие резистентности во многих типах злокачественных новообразований и способствуют развитию серьезных метаболических осложнений. За счет способности снижать клеточную адгезию, GC увеличивают риск метастазирования [44]. Более того, GR в ряде опухолей молочной железы приводила к усилению пролиферации, уходу клеток от апоптоза и более агрессивному течению заболевания [44, 45].

Успех терапии РМЖ глюкокортикоидами во многом зависит от статуса эстрогенового рецептора (ER) и его взаимодействия с GR и компонентами его сигнального пути. Так, ER-негативные опухоли являются более агрессивными и плохо поддающимися лечению, применение GC в данном случае вызывает увеличение экспрессии GC-зависимых антиапоптотических генов. В случае эстроген-позитивных опухолей терапия GC и высокий уровень экспрессии GR коррелирует с хорошим ответом пациентов на лечение. Также в зависимости от статуса ER в опухоли наблюдается дифференциальная активация сигнальных путей эпителиально-мезенхимального перехода, клеточной адгезии и воспаления, различен уровень запуска транс-репрессии и транс-активации [44, 45, 60]. Однако детально механизм действия GC на клетки РМЖ не изучен, и исследование молекулярных механизмов, ответственных за индивидуальный ответ пациента с РМЖ на действие глюкокортикоидов, является актуальной задачей как для клинической практики, так и для фундаментальных исследований.

Таким образом, GC в настоящее время остаются одним из ключевых препаратов химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы, которые включают в себя лейкозы, лимфомы, множественную миелому. Однако применение GC в клинической практике сильно ограничено их побочными эффектами. Разработка и исследование противоопухолевой активности селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) является одним из перспективных подходов к решению проблемы снижения побочных эффектов GC [32]. Но также следует учитывать, что действие SEGRA основано на том, что соединения данного класса вызывают только подавление GR-зависимых генов, но не их активацию. В ряде случаев данная модель активации сигнального пути GR не вполне адекватна, и применение подобного рода препаратов может привести к ухудшению состояния пациента. Так, например, антиапоптотический ген *BCL2* и проапоптотический ген *Bim* принадлежат к числу GR-регулируемых генов. В клетках лейкозов и лимфом GC активируют *Bim* и ингибируют *BCL2*, что вызывает индукцию апоптоза и благоприятствует лечению. В костной ткани оба гена регулируются схожим образом, что вызывает развитие асептического остеонекроза, одного из наиболее тяжелых побочных эффектов GC. SEGRA в данном случае будут менее эффективны за счет отсутствия активации *Bim*, вызывая в то же время остеонекроз схожей степени тяжести [61, 62]. В связи с этим, вторым перспективным подходом к подавлению побочных эффектов GC является, в первую очередь, поиск генов, которые вызывают клеточную гибель в лимфообластах, но не в костной ткани, и дальнейшая разработка направленных регуляторов экспрессии данных генов. В таком случае модулирование функции GR будет тканеспецифично и будет затрагивать только трансформированные клетки. Поиск ключевых генов, ассоциированных с побочными эффектами GC, представляет собой еще один подход к увеличению эффективности и безопасности GC-терапии. Все три направления интенсивно развиваются, в том числе ряд перспективных данных представлен в экспериментальной части настоящей работы.

1.2. Роль глюкокортикоидного рецептора в регуляции сигнальных путей, определяющих злокачественную трансформацию клетки

1.2.1. Влияние глюкокортикоидов на пролиферативный потенциал клеток опухолей (клеточный цикл, рост-ингибирующие факторы, иммортализация)

Одним из основных механизмов, определяющим пролиферативный потенциал опухолевых клеток, является бесконтрольная прогрессия клеточного цикла. Глюкокортикоиды способны вызывать клеточную гибель по крайней мере по двум отдельным механизмам. В пролиферирующих клетках GC индуцируют апоптоз за счет изменений в экспрессии и активности компонентов клеточного цикла. Также они могут вызывать апоптоз по механизмам, независимым от регуляции клеточного цикла. Данные механизмы будут детально рассмотрены в п. 2.2. Однако сигнальные пути, регулируемые GC в обоих случаях, могут пересекаться. Так, некоторые апоптотические стимулы вызывают арест клеточного цикла до перехода клетки в состояние гибели, воздействуя тем самым и на регуляцию клеточного цикла, и на регуляцию апоптоза. При изучении рост-ингибирующего эффекта GC было показано, что данные гормоны вызывают арест фазы G1 в тимоцитах и трансформированных лимфоидных клетках, за которым в большинстве случаев следует клеточная гибель [63–65].

Регуляция перехода клеточного цикла из фазы G1 в фазу S рассматривают как баланс между уровнем экспрессии рост-стимулирующих и рост-ингибирующих факторов. К митогенным белкам относятся циклины и циклин-зависимые киназы (cyclin-dependent kinases, Cdk), регуляторные киназы и фосфатазы циклин-зависимых киназ (CAK и CDC25), а также факторы транскрипции E2F и c-Myc. Антимитогенные факторы включают в себя опухолевый супрессор pRb и белки-ингибиторы циклин-зависимых киназ, которые делят на 2 отдельных семейства на основании структурной и функциональной гомологии: подсемейство INK (p15, p16, p18, и p19) и подсемейство Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, и p57^{Kip2}) [66].

Наиболее распространенным эффектом GC на клеточный цикл является арест клеточного цикла в фазе G1/G0 посредством активации генов, кодирующих ингибиторы циклин-зависимых киназ Cdkn1a (p21^{Cip1}) и Cdkn1b (p27^{Kip1}). Необходимо отметить, что Cdkn1a (p21^{Cip1}) является GC-зависимым геном с классическими позитивными GRE в промоторной области [47, 66, 67]. GRE в промоторе p21 расположен в сайте связывания ССАТ/энхансер-связывающего белка α (ССАТ/enhancer-binding protein α , С/ЕВР α), который также позитивно регулируется GC и вызывает таким образом дополнительную стимуляцию экспрессии p21 [66].

Альтернативным механизмом регуляции клеточного цикла GC является ингибирование экспрессии и активности c-myc. Хотя аномальное увеличение экспрессии c-myc обычно

приводит к гибели клетки, подавление экспрессии данного гена при обработке клеток глюкокортикоидами, как было показано в ряде исследований, также приводит к развитию апоптоза в клетках лейкозов и лимфом. Так, было показано, что стабильная экспрессия с-мус вызывает подавление GC-индуцированной гибели клеток острого лимфобластного лейкоза СЕМ, а при использовании ингибиторов с-мус апоптоз развивается в полной мере. Также было продемонстрировано, что антагонист GR, RU486, подавляет гибель клеток, вызванную стероидами, и степень супрессии коррелирует с увеличением экспрессии с-мус. Таким образом, было показано, что регулятор клеточного цикла с-мус играет важную роль в GC-индуцированном апоптозе [63, 68, 70].

Другими регуляторами клеточного цикла, чувствительными к действию GC являются циклин D3, первичная изоформа циклина D, и его каталитическая субъединица, Cdk4. Cdk4 вовлечена в прохождение клеточного через фазу G1. В клетках лимфомы мышей линии P1798 GC, как было показано, ингибируют транскрипцию Cdk4. Более того, количество мРНК циклина D3 было также снижен в данных клетках после обработки их дексаметазоном. Дестабилизация мРНК этого гена является основным механизмом, по котором GC снижают экспрессию и активность циклина D3. В отсутствие стероидов период полураспада белка циклина D3 составляет 8 ч., в то время как в присутствии GC он снижается до 1 ч. Как было показано, данный эффект не зависит от прогрессии клеточного цикла, но зависит от скорости синтеза белка. Таким образом, GC увеличивают содержание в клетках белков, ответственных за деградацию мРНК циклина D3. Также GC существенно снижают экспрессию других циклинов группы D (D1, D2) [47, 66, 67].

GC влияют на экспрессию и активность регуляторов фазы G1, опухолевого супрессора pRb и фактор транскрипции E2F. При обработке GC клеток P1798 наблюдали снижение фосфорилирования pRb на 75-90% при участии киназы, ассоциированной с циклином D3. Гипофосфорилирование pRb, арест G1-фазы клеточного цикла и последующий за этими событиями апоптоз наблюдали и в других типах клеток – клетки лимфомы Беркитта, и клетки миелолейкоза линий HL60 и U937.

Другим ключевым механизмом, за счет которого опухолевая клетка приобретает неограниченный пролиферативный потенциал, является ее иммортализация. Бессмертный фенотип опухолевая клетка способна приобретать при сохранении активности теломеразы, фермента, отвечающего за достраивание укорачивающихся в процессе репликации концевых участков ДНК. Ключевая каталитическая субъединица теломеразы кодируется геном TERT. В недавних исследованиях было показано, что GC-регулируемый белок, сывороточная глюкокортикоид-индуцируемая киназа 1 (serum glucocorticoid-induced kinase 1, SGK1) способна

увеличивать активность теломеразы как за счет индукции образования активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS), так и путем непосредственного взаимодействия с TERT. Данные эксперименты были проведены только на модели свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*, однако они позволяют предположить, что GC потенциально способны стимулировать приобретение опухолевой клеткой бессмертного фенотипа [69]. Другим фактором, определяющим отсутствие репликативного старения у опухолевой клетки, является сохранение экспрессии гена *Bmi1*, что определяет потерю экспрессии гена ингибитора клеточного цикла INK4a, сохранение активности циклин-зависимых киназ и неограниченное прохождение клетки по клеточному циклу [71]. Следует отметить, что в мировой литературе нет данных о влиянии GC на экспрессию *Bmi1*.

Таким образом, преимущественно GC вызывают остановку клеточного цикла, что в дальнейшем способствует уходу опухолевой клетки в апоптоз. Однако GC-зависимая регуляция отдельных генов может, напротив, способствовать приобретению клеткой более злокачественного фенотипа.

1.2.2. Роль глюкокортикоидов в индукции апоптоза

Эффект GC на степень развития апоптоза зависит от типа клеток, от альтернативных сайтов инициации действия GC и от эффектов корегуляторов, взаимодействующих с GR. В целом, GC являются индукторами апоптоза, что, совместно с их противовоспалительными и иммуносупрессивными свойствами, делает GC одними из наиболее широко используемых препаратов в мире. GC подавляют или запускают экспрессию генов посредством запуска транс-репрессии или транс-активации. Было показано, что GR-опосредованная экспрессия генов вызывает апоптоз в клетках миеломы, остеобластах, лимфоидных клетках и нейронных клетках. Это, в свою очередь приводит как положительным (химиотерапия злокачественных новообразований кроветворной системы), так и к отрицательным эффектам (остеопороз и остеонекроз, вклад в развитие болезней Паркинсона и Альцгеймера) [59, 72, 73].

Процесс запуска GC-зависимого апоптоза условно разделяют на три стадии: (1) стадия инициации, которая подразумевает активацию транскрипции GR-регулируемых проапоптотических и антиапоптотических генов; (2) стадия «принятия решения», во время которой формируется определенное соотношение между уровнем экспрессии про- и антиапоптотических генов; (3) стадия реализации, на которой происходит активация каспаз и эндонуклеаз [74]. Инициация программируемой клеточной гибели на уровне транскрипции и вовлечение в терминальную стадию апоптоза протеасом являются отличительными чертами GC-индуцированного апоптоза. Как было показано, оба механизма действия GR, транс-

репрессия и транс-активация, необходимы для индукции и реализации апоптоза, вызванного GC. Так, было показано, что белок-белковое взаимодействие GR с AP-1 и соответствующее снижение активности этого фактора транскрипции приводит к развитию апоптоза [75]. В то же время, было отмечено, что в лимфоцитах и тимоцитах с мутантным GR, не способным димеризоваться и тем самым индуцировать транс-активацию, апоптотическая гибель клеток после обработки GC была значительно ослаблена [76, 77].

При исследовании механизма GR-опосредованного апоптоза было показано, что преимущественно GC запускают процесс митохондриального апоптоза. Его регуляция GC осуществляется путем изменения экспрессии про- и антиапоптотических генов семейства *Bcl2*, а также опухолевого супрессора *p53* [78]. В нервных клетках GR-опосредованный апоптоз сопровождается увеличенным уровнем экспрессии *p53* и проапоптотического гена *Bax*. В экспериментах на крысах было продемонстрировано, что в ткани гиппокампа *Bax* является ключевой молекулой в развитии сигнальных каскадов, ведущих к GC-зависимой клеточной гибели. Также GR повышает уровень экспрессии других проапоптотических генов семейства *Bcl2*, *Bim* и *Bad*, что приводит к транслокации *Bax* в митохондрии, высвобождению цитохрома C и развитию митохондриального апоптоза. В клетках, секретирующих инсулин, GC-зависимый апоптоз сопровождается снижением экспрессии антиапоптотического гена *Bcl2* и дефосфорилированием *Bad*, что способствует его внедрению в мембрану митохондрий, ее деполяризации, разрушению и высвобождению цитохрома C [73]. Для некоторых типов клеток было показано митохондриальной локализации GR, и именно это является ключевым звеном в GR-опосредованной апоптотической гибели клетки. Так, апоптоз в тимоцитах зависит от перемещения GR в митохондрии, в то время как ядерная транслокация GR не оказывает влияния на степень развития клеточной гибели [27]. Во многих случаях GC способны вызывать апоптоз опосредовано, за счет ингибирования пропролиферативных и антиапоптоических сигнальных путей. В частности, было показано, что активация MAP-киназы *p38* стимулирует апоптоз в клетках ОЛЛ [79–81].

В то же время GC также способны ослаблять индукцию апоптоза и обеспечивать выживание клеток. В частности, было отмечено, что активация GR подавляет апоптоз в нейтрофилах, фибробластах, пигментных эпителиоцитах сетчатки, Т-лимфоцитах, в клетках фибросаркомы и глиомы C6 GR активирует транскрипцию антиапоптотического гена *Bcl-XL*. Описан протективный, антиапоптотический эффект GC на клетки печени, опосредованный активацией *Bcl-XL* [73, 82, 83].

При РМЖ GR-опосредованное увеличение жизнеспособности связано с увеличением экспрессии *SGK-1*, белковый продукт которого защищает клетки от апоптоза посредством активации про-пролиферативного сигнального каскада PI3K/Akt/mTOR [84–86].

Непосредственное взаимодействие GR с опухолевым супрессором p53 может приводить либо к кооперативному действию данных белков, либо к антагонистическому, в зависимости от физиологических условий. Так, p53 и GR могут взаимно подавлять активность друг друга либо за счет физического взаимодействия белков GR и p53 в цитоплазме и дальнейшей GR-опосредованной протеосомальной деградации комплекса, либо за счет регуляции на уровне транскрипции посредством взаимного ингибирования взаимодействия с сайтами связывания p53- и GR-регулируемых генов [73, 83]. В то же время было описано синергическое проапоптотическое действие обоих факторов транскрипции в нейрональных клетках и клетках гепатомы крыс. Было показано, что активация сигнального пути GR приводит к транслокации p53 в ядро и повышению уровня экспрессии p53-регулируемых генов *p21* и *GADD45*, что в свою очередь приводит к аресту клеточного цикла [87].

GC также могут влиять на запуск инструктивного апоптоза. В частности, было показано, что GC могут предотвращать повышение экспрессии FasL, подавляя тем самым индукцию программируемой гибели клетки [88, 89]. На модели лимфомы у мышей WEN17.2 было продемонстрировано, что сигнальные пути апоптоза, опосредованного GC и опосредованного CD95/Fas/APO-1, во многом пересекаются, однако GC в данном случае также снижают протеолитическую активность прокаспазы 8. Однако уровень активации апоптоза в данном случае был значительным, и, поскольку активация прокаспазы 8 связана с инструктивным путем развития апоптоза, был сделан вывод о том, что данный путь не является основным при GC-индуцированной гибели клетки. Более того, в литературе описано, что GC способны препятствовать передаче сигнала при инструктивном апоптозе путем ингибирования экспрессии *CD95-L* в Т-лимфоцитах [90]. Однако в этой области исследований к настоящему времени недостаточно литературных данных о влиянии GC на запуск инструктивного апоптоза.

Также спорна роль каспаз в GC-опосредованном апоптозе. Так, при обработке тимоцитов ингибитором каспаз z-VAD-fmk данные клетки становятся нечувствительны к апоптозу, однако в зрелых Т-лимфоцитах z-VAD-fmk не способен ослаблять развитие Dex-индуцированного апоптоза [91, 92]. Более того, до настоящего времени не удалось определить, какая из каспаз играет ключевую роль в реализации апоптоза, вызванного глюкокортикоидами – данный процесс в значительной степени тканеспецифичен. В частности, несмотря на то, что существенное увеличение активности каспаз 3, 6/9 и 8 наблюдали после обработки клеток лейкоза глюкокортикоидами, нокаут генов каспаз 3 и 8 *in vitro* и *in vivo* не вызвал изменения в

степени развития апоптоза. Также было показано снижение апоптоза в тимоцитах мышей, получавших GC и нокаутных по гену каспазы 9, но дальнейшие эксперименты в данном направлении не подтвердили этот эффект. Не было продемонстрировано изменения в уровне активации апоптотических сигнальных путей у мышей, получавших GC и нокаутных по генам каспазы 1, 2, 3 и 8 [92]. Роль каспаз в запуске GC-индуцированного апоптоза остается под вопросом и требует дополнительных исследований.

Помимо ключевых звеньев апоптотических сигнальных каскадов, которые описаны выше и регулируются GC, также важную роль в GC-индуцированном апоптозе могут играть протеасомы, лизосомы, гранзим А и другие факторы. В таблице 1 перечислены основные механизмы запуска апоптоза при воздействии GC на клетки.

Большинство данных по GC-опосредованному апоптозу получено на моделях острого лимфобластного лейкоза, остеосаркомы и мелкоклеточного рака легких. Для всех этих моделей описаны случаи развития резистентности к действию GC. В большинстве линий клеток, полученных из солидных опухолей, при обработке их GC запускаются механизмы резистентности к апоптозу [93]. Возможные механизмы развития резистентности довольно многочисленны. Причинами снижения чувствительности являются низкий уровень экспрессии гена GR и мутации в нем, экспрессия альтернативных пост-транскрипционных и пост-трансляционных изоформ рецептора, а также различные профили фосфорилирования GR. На уровне вовлечения других сигнальных путей выделяют активацию сигнальных каскадов множественной лекарственной устойчивости (multidrug resistance, MDR), связанную с гиперэкспрессией Р-гликопротеина; увеличение экспрессии глутатиона и глутатион-S-трансферазы; увеличение экспрессии белков-шаперонов, образующих комплекс с GR в цитоплазме (hsp70, hsp90, FKBP51, FKBP52, BAG-1); нарушения в регуляции транскрипционных факторов NF- κ B, AP-1 и др.; нарушения в регуляции GR-регулируемых генов и непосредственно самого GR; нарушения в апоптотических сигнальных путях (увеличение экспрессии анти-апоптотических генов семейства Bcl2). Более того, подавление GC-индуцированного апоптоза может происходить за счет активации антагонистических сигнальных путей. В частности, к таким сигнальным каскадам относятся пути MEK и ERK, Ras/Raf/MEK, NF- κ B, PI3-K/AKT и WNT/ β -катенин [92–94].

Таблица 1 - Ключевые молекулярные механизмы, вовлеченные в развитие GC-индуцированного апоптоза [92, 95–97]

Ключевое звено/механизм	Эффект, опосредованный GC
Митохондрии	Потеря потенциала мембраны митохондрий, увеличение активности каспазы 9, митохондриальная транслокация GR
Сигнальный путь «рецепторов смерти»	Активация эфферентных звеньев сигнального пути митохондриального апоптоза
Гены семейства Bcl-2	Увеличение экспрессии <i>Bim, Puma, Bad, Bax</i>
Каспазы	Активация каспаз 3, 8 и 9
c-мус	Подавление экспрессии гена
IkB	Индукция экспрессии гена, подавление активности про-пролиферативного фактора NF-kB
Гранзим А	Активация апоптоза за счет индукции активности каспазы 3
Ген, связанный с гибелью Т-клеток, 8 (T-cell death-associated gene 8, TDAG8)	Активация проапоптотического рецептора, связанного с G-белком
Лизосомы	Высвобождение катепсина В вызывает активацию каспаз
Протеосомная деградация	Деградация подвергаются анти-апоптотические белки cIAP1 и XIAP
Стресс-опосредованные сигнальные пути	Подавление экспрессии антиапоптотического гена <i>MKP-1</i> ведет к увеличению активности JNK, вовлеченного в проапоптотические сигнальные каскады
Другие модуляторы	Определенную роль в развитии GC-индуцированного апоптоза играет также пероксид водорода (H ₂ O ₂), активация протеинкиназы С (PKC), интерлейкина 6 (IL-6), Т-клеточного рецептора, нейротрофина-1, изменение содержания ионов кальция и калия, внутриклеточного pH, гидролиз сфингомиелинов и ряд других факторов

Для солидных опухолей GC часто вызывают обратный процесс – запуск антиапоптотических сигнальных путей. В исследованиях, проведенных на клетках рака легких, рака шейки матки и гепатомы, было продемонстрировано подавление активности ключевых элементов сигнального пути индуктивного апоптоза (CD95-L, TRAIL, FADD, каспаза 8), а также предотвращения развития митохондриального апоптоза за счет ингибирования деполяризации митохондриальной мембраны и снижения активности каспазы 9 [92, 93, 98]. В этих и ряде других исследований было показано, что основным звеном анти-апоптотического эффекта GC в клетках солидных опухолей является подавление экспрессии и активности каспаз

[92, 93, 98–100]. В таблице 2 перечислены основные молекулы/сигнальные пути, за счет которых в клетках карцином развивается резистентность к GC-индуцированному апоптозу.

Таблица 2 - Ключевые молекулярные механизмы, вовлеченные в развитие резистентности к GC-индуцированному апоптозу [92, 93, 98]

Ключевое звено/механизм	Эффект, опосредованный GC
Подавление экспрессии проапоптотических молекул	Лиганды «рецепторов смерти» CD95-L, TRAIL, адаптерные молекулы FADD, Bid, каспазы 8, 3, 9 Аномальное фосфорилирование
Увеличение экспрессии анти-апоптотических молекул	Гены/белки семейств cFLIP, Bcl-2 и IAP
Потенциал митохондриальной мембраны	Блокировка деполяризации
GR	Регуляция GR по принципу отрицательной обратной связи
Межклеточные контакты	GC-индуцированное увеличение экспрессии E-кадгерина приводит к увеличению киназной активности компонентов сигнального пути PI3-K/Akt и Akt-опосредованное подавление сигнального пути GSK3
PI3-K/Akt	Инактивация проапоптотических молекул (преимущественно каспаз), подавление GSK3 и факторов транскрипции сигнального пути FOXO, запускающего проапоптотические каскады посредством активации внеклеточных лигандов CD95-L, TRAIL и др.
SGK-1	SGK-1 представляет собой эфферентную GC-регулируемую киназу сигнального пути PI3-K/Akt, вовлеченную в процессы пролиферации клеток
МКР-1	МКР-1 представляет собой GC-регулируемую фосфатазу, вовлеченную в процесс пролиферации клеток за счет ингибирования активности JNK
JNK	Стресс-опосредованный сигнальный путь, чья проапоптотическая активность ингибируется при индукции МКР-1 и Akt
Wnt/GSK3	GC индуцирует запуск сигнального пути Wnt за счет подавления GSK3
Факторы транскрипции	Активация NF-kB влечет за собой повышение транскрипции антиапоптотических генов Bcl-XL, ингибиторов каспаз и c-Myc Ингибирование активности FOXO3a при воздействии SGK-1 и Akt приводит к подавлению проапоптотических молекул Активность AP4 возрастает при обработке клеток GC и приводит к ингибированию каспазы 9

Баланс между проапоптотическим действием GC и GC-индуцированной резистентностью к апоптозу в значительной степени зависит от типа клеток. Клетки гемопоэтического происхождения – моноциты, макрофаги, лимфоциты и лимфобласты, крайне чувствительны к GC-опосредованному апоптозу. В клетках эпителиального происхождения – клетках молочной железы, фолликулярных клетках яичников, гепатоцитах, так же, как и в большинстве трансформированных эпителиальных клеток, чаще наблюдается протективное действие GC от развития апоптоза. В настоящее время описано большое количество механизмов GC-индуцированного апоптоза в гемопоэтических клетках, а также механизмы развития резистентности к GC. Анти-апоптотическое действие GC в клетках эпителиального происхождения изучено в меньшей степени, и получение новых данных о механизмах анти-апоптотических эффектах GC будет способствовать более эффективному и безопасному использованию GC при лечении различных видов злокачественных новообразований.

1.2.3. Влияние глюкокортикоидов на неоангиогенез

К важнейшим свойствам неопластических клеток принадлежит также их способность стимулировать образование новых кровеносных сосудов. Стимуляция ангиогенеза вызывается увеличением содержания в окружении опухолевой ткани специфических ангиогенных цитокинов, стимулирующих размножение и миграцию (построение трубчатых структур) эндотелиальных клеток, в частности, фактора роста сосудов (vascular-endothelial growth factor, VEGF), а также митогенов/мотогенов bFGF, PLGF, TGF- β , PD-EGF. Росту новых сосудов способствует также уменьшение содержания в микроокружении белков-ингибиторов ангиогенеза, таких как тромбоспондин-1 (Tsp-1), ангиостатин и эндостатин, а также секреция опухолевыми клетками протеиназ, разрушающих внеклеточный матрикс, что необходимо для прорастания новых сосудов [71]. Открытие у опухолевых клеток способности стимулировать неоангиогенез послужило толчком к дизайну, синтезу и апробации большого количества противоопухолевых препаратов – ингибиторов ангиогенеза. Также были пересмотрены свойства ряда других лекарственных средств, в частности, глюкокортикоидов, по способности подавлять рост сосудов опухоли. Антиангиогенная активность GC, реализация которой происходила независимо от их активности как гормональных препаратов, была показана еще более 30 лет назад [101].

GC действуют на большое количество ангиогенных сигнальных путей за счет регулирования экспрессии и активности факторов роста и протеаз, а также изменений в «поведении» клеток кроветворной и лимфатической систем. Для стероидов с ангиостатическими свойствами было показано ингибирование миграции эндотелиальных клеток, регулирование количества про-воспалительных клеток, участвующих в процессе

ангиогенеза, и изменения состава базальной мембраны, препятствующие ее распаду и прорастанию сосуда [102–104]. Одним из молекулярных механизмов подавления роста сосудов опухоли у GC является ингибирование экспрессии *VEGF* и *IL-8* [50, 105]. Данный эффект наблюдали в различных моделях опухолевых заболеваний *in vitro* и *in vivo*, к примеру, рака предстательной железы, опухолей ЦНС, рака почки и др. [51], а также на моделях заболеваний неопухолевого генеза – остеопороза, астмы, диабета и связанных с ним отеков [108, 109]. Данный процесс осуществляется посредством снижения активности транскрипционных факторов NF- κ B и AP-1 после связывания с GR [46, 110].

Выработка коллагена также важна при формировании сосудов, в особенности, мелких капилляров. Было показано, что GC ингибируют рост или вызывают регрессию уже существующих капилляров путем подавления синтеза коллагена в миофибробластах микроокружения [111], а также за счет снижения выработки активаторов плазминогена, сериновых протеаз, стимулирующих превращение плазминогена в плазмин. Данные протеазы способны расщеплять матриксные белки, как напрямую, так и опосредованно, за счет продукции плазмينا, который также принадлежит к семейству сериновых протеаз. Изменения во взаимодействии клеток с матриксом приводят к высвобождению митогенных и ангиогенных факторов, что стимулирует пролиферацию и миграцию клеток, а также рост сосудов. Применение GC подавляет этот процесс [112].

GC также уменьшают экспрессию провоспалительных и пропролиферативных генов *iNOS* и *COX-2*, для которых была продемонстрирована корреляция между уровнем их синтеза и образованием микрососудов в опухоли [114, 115]. Функциональная активность белкового продукта гена *COX-2* напрямую связана с воспалением. Этот ген экспрессируется макрофагами, синовиоцитами, фибробластами, гладкой сосудистой мускулатурой, хондроцитами и эндотелиальными клетками после их обработки цитокинами или факторами роста. Простагландины, образующиеся под действием *COX-2*, напрямую или опосредованно усиливают продукцию самого фермента по механизму положительной обратной связи [116]. Ингибирование *COX-2* рассматривается как один из основных механизмов активности противовоспалительных средств.

iNOS регулируется на уровне экспрессии провоспалительными цитокинами (фактор роста опухоли α (TNF- α), интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерферон- γ (IFN- γ), гипоксией, окислительным стрессом и, как было недавно показано, белком теплового шока Hsp70. *iNOS* стимулирует выработку оксида азота, который является основным медиатором при активации пролиферативных и ангиогенных сигнальных путей. Ингибирование *iNOS* является

результатом подавления активности провоспалительных и про-пролиферативных сигнальных путей NF- κ B и JAK-STAT, которое во многом опосредуют GC [114, 117].

Большую роль в стимуляции неоангиогенеза играет GC-опосредованная активация макрофагов не по классическому, а по альтернативному пути. Альтернативный пути активации макрофагов не предполагает выработки ангиогенных цитокинов, в частности, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , о которые было упомянуто выше, а также тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor, PDGF) и MAP-киназ [118, 119].

Ангиогенез является сложным процессом, индуцируемым большим количеством стимулов и включающим в себя изменения во множестве сигнальных путей и молекул. Ангиостатический эффект GC реализуется через многогранные изменения микрососудистой эндотелиальной клеточной пролиферации, миграции и протеолиза, что делает их перспективными кандидатами на проведение дальнейших исследований для их использования в терапии солидных опухолей не только в качестве поддерживающих агентов, но и в качестве самостоятельных анти-ангиогенных препаратов

1.2.4. Влияние глюкокортикоидов на эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию и метастазирование

Метастазирование представляет собой процесс образования вторичных очагов опухолевого роста. Формирование метастаза обусловлено приобретением опухолевыми клетками целого ряда свойств: локомоторный фенотип, способность стимулировать неоангиогенез, способность к ослаблению апоптоза и т.д. [71]. Влияние глюкокортикоидов на стимуляцию неоангиогенеза опухолевыми клетками, а также на процесс их апоптотической гибели было рассмотрено в предыдущих разделах. В данном разделе будут проанализированы эффекты GC на способность клетки приобретать локомоторный фенотип, которая складывается из прохождения клетки через эпителиально-мезенхимальный переход, из потери целостности межклеточных контактов, а также из снижения взаимодействия с внеклеточным матриксом и изменения адгезионных свойств клетки.

Известно, что GC используются широко и с большой эффективностью при терапии гемобластозов уже около 70 лет. Применение GC при лечении опухолей негематологического происхождения до сих пор остается спорным вопросом. В ряде исследований было показано, что стероиды способны подавлять опухолевую прогрессию и метастазирование [120], однако другими научными коллективами было продемонстрировано, что GC снижают уровень апоптоза в опухолевых клетках и уменьшают эффективность основной химиотерапии. Более того, при системном применении GC их влияние на нормальные ткани может способствовать

модификации микроокружения и формированию метастатических ниш [85]. Такие противоречивые результаты могут быть связаны с различиями в типах и подтипах опухолей, различном уровне экспрессии GR, а также различий в дозировке препарата. В отношении эффектов GC на стимуляцию метастазирования, на ряде моделей *in vitro* было показано, что стероиды способны подавлять миграцию и инвазию клеток посредством подавления экспрессии RhoA [131], или за счет индукции транскрипции E-кадгерина [130].

Нарушения целостности межклеточных контактов – одно из основных событий, в итоге приводящих к инвазии и метастазированию. Выделяют три основных типа межклеточных контактов: плотные контакты, щелевые контакты и адгезионные контакты.

Направление изменений экспрессии и активности белков плотных контактов в опухолевых клетках во многом зависит от типа клеток и от изоформ белка. В частности, в случае клаудинов, в опухолевых клетках одного типа экспрессия одной и той же изоформы клаудина может как повышаться, так и снижаться, в зависимости от условий среды. Так, было показано, что в 3D-культуре клеток рака молочной железы возобновление экспрессии клаудина-1 вызывает апоптоз, в то время как в стандартном 2D-монослое клеток РМЖ подобного эффекта не наблюдали [132]. При исследованиях роли окклюдина в процессах жизнедеятельности опухолевой клетки, а также в процессе канцерогенеза, было показано, что снижение его экспрессии приводит к развитию в клетках эпителия воспаления и увеличению их пролиферативной активности [133]. В опухолевых клетках была показана корреляция между снижением экспрессии окклюдина и опухолевой прогрессией. Более того, введение экзогенного окклюдина в клетки рака шейки матки, меланомы, РМЖ, глиомы увеличивало чувствительность данных клеток к терапии, снижало их инвазивные свойства и метастатический потенциал, что в целом дает возможность рассматривать окклюдин как потенциальный опухолевый супрессор [134]. Роль белков семейства JAM в канцерогенезе и опухолевой трансформации до конца не изучена. Было установлено, что белок данного семейства JAM-C, опосредующий контакты между эндотелиальными и опухолевыми клетки, играет важную роль в формировании новых кровеносных сосудов. Далее было показано, что ингибирование JAM-C приводит к подавлению роста ксенографтов рака легкого *in vivo*. Таким образом, JAM-C представляет собой потенциальную мишень для противоопухолевой терапии.

Влияние глюкокортикоидов на плотные контакты описано преимущественно для опухолей ЦНС и для РМЖ. В основном GC вызывают повышение экспрессии основных генов плотных контактов – клаудинов, окклюдина, ZO-1, как в опухолевой ткани, так и ткани микроокружения, эндотелии кровеносных сосудов. Так, например, при перитуморальном отеке головного мозга при опухолях ЦНС GC способствуют восстановлению функциональной

активности белков межклеточных контактов посредством процессов дефосфорилирования окклюдина и внутриклеточного перераспределения ZO-1 [106], вызывают увеличение синтеза белков межклеточных контактов (окклюдина, клаудина-5) [106, 135] и последующее за ним подавление экспрессии генов межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1) и снижение уровня матриксных металлопротеиназ, а также индукции синтеза их тканевых ингибиторов, что препятствует деградации межклеточных контактов [106]. В клетках РМЖ крысы линии Con8 GC стимулируют образование плотных и адгезионных контактов за счет подавления экспрессии малой ГТФазы RhoA. RhoA является ключевым фактором перестройки апикальных контактов, снижающим экспрессию белка плотных контактов ZO-1 и белка адгезионных контактов β -катенина [131]. Также есть данные, полученные на нетрансформированных клетках эпителия молочной железы, что под воздействием GC снижался уровень экспрессии клаудина-3 и -4 [136].

Адгезионным контактам принадлежит основная роль в восприятии внеклеточных стимулов, регуляции клеточных слоев и организации ткани. [137]. В эпителиальных опухолях, карциномах, наблюдают нарушения нормальной архитектуры клеток и тканей, что связано с ослаблением межклеточной адгезии и было отмечено исследователями еще в 1944 г [138]. Основные нарушения в адгезии опухолевых клеток связаны с изменениями в экспрессии и активности классических кадгеринов, роль неклассических белков данного семейства в злокачественной трансформации клетки практически не изучена.

Экспрессия E-кадгерина в эпителиальных опухолях преимущественно падает [139]. Данный эффект может быть связан с инактивирующими мутациями в гене CDH1, активацией транскрипционных супрессоров в промоторной области E-кадгерина с последующим привлечением в эту область метилаз и гиперметилированием его промотора, действием микроРНК miR-9, miR-92a, miR-495 miR-141, miR-200 и miR-205, а также избыточным фосфорилированием E-кадгерина, что стимулирует его протеасомную деградацию [139].

В дополнение к E-кадгерину, в определенных тканях эпителиального происхождения также может экспрессироваться P-кадгерин. В частности, для кератиноцитов характерна экспрессия обоих кадгеринов, и падение экспрессии обоих белков ассоциировано с нарушениями в адгезионных контактах [140]. Однако уровень содержания P-кадгерина более заметно различается от ткани к ткани: при РМЖ P-кадгерин часто гиперэкспрессирован и его экспрессия коррелирует с неблагоприятным прогнозом, индукцию его синтеза также наблюдали при раке толстого кишечника [138].

Уровень экспрессии N-кадгерина, который присутствует в нормальных тканях только в мезенхиме и в нейронах, в опухолевых клетках обычно повышен. Данный эффект является

одной из отличительных черт эпителиально-мезенхимального перехода [141], однако детально роль увеличения экспрессии N-кадгерина в опухолевых клетках не изучена. В ряде экспериментов было показано, что N-кадгерин стимулирует миграцию клеток в ткани за счет взаимодействия с рецептором фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor receptor (FGFR)), запуска сигнального пути FGF и активации малых ГТФаз Rac1 и Cdc42, регулирующих целостность актинового цитоскелета [142]. В экспериментах *in vivo* было показано, что гиперэкспрессия N-кадгерина в HER-2-положительных опухолях молочной железы показана не была, однако в опухолях, индуцированных введением в клетки экзогенных средним Т-антигеном полиомавируса, увеличенная продукция N-кадгерина привела к усилению метастазирования [143, 144].

Роль катенинов, также необходимых для построения адгезионных контактов, была проанализирована с использованием моделей онкологических заболеваний различного генеза. При изучении α -катенина было показано, что изменение его экспрессии в опухолях сходно с изменением уровня синтеза E-кадгерина: в опухолевых клетках наблюдали либо снижение экспрессии данного белка, либо полную ее потерю. Более того, снижение экспрессии α -катенина коррелировало с увеличением инвазивности опухоли, метастазами в лимфатические узлы, рецидивом заболевания и неблагоприятным прогнозом [202]. Для β -катенина также применимо все вышеописанное, однако β -катенин, помимо регулятора адгезионных контактов, является фактором транскрипции, индуцирующим формирование опухоли при своем высвобождении, стабилизации, перемещении в ядро, связыванию с факторами транскрипции семейства TCF и индукции транскрипции генов пролиферации, морфогенеза, дифференцировки и др. [151, 152]. β -катенин обладает высоким онкогенным потенциалом, поскольку он играет основную роль в реализации сигнального пути Wnt, конститутивная активация которого приводит к злокачественной трансформации клеток различного происхождения. Количество β -катенина снижается при воздействии на него белкового комплекса, содержащего APC, Axin, GSK3 β и казеиновую киназу I (CKI). GSK3 β и CKI фосфорилируют β -катенин, что в дальнейшем приводит к его узнаванию протеосомами и деградации. Делеция или мутация в сайтах фосфорилирования приводит к стабилизации β -катенина и увеличению его транскрипционной активности. Инактивация комплекса деградации за счет, к примеру, мутации в гене APC также приводит к увеличению активности β -катенина и стимулируют злокачественную трансформацию клеток эпителия ЖКТ [151].

Сведения о влиянии глюкокортикоидов на целостность плотных контактов довольно противоречивы. Так, в ряде случаев показано, что в высокозлокачественных опухолях молочной железы или фибросаркомах GC способны снижать их инвазивный потенциал за счет

стимуляции перехода E- или N-кадгерина из цитоплазматической в трансмембранную форму и повышения экспрессии этих генов [130]. По данным других исследователей Dex снижает экспрессию E-кадгерина в клетках протокового рака поджелудочной железы *in vitro* и *in vivo*, и приводит к увеличению инвазивных свойств клеток [153]. Более того, снижение синтеза E-кадгерина, деградацию адгезионных контактов и одновременное ослабление индукции апоптоза наблюдали в клетках яичника [154]. В кератиноцитах была показана ко-локализация GR с α -катенином [155], в связи с чем в настоящее время актуален вопрос – 1) каковы последствия такого взаимодействия, и 2) меняется ли функциональная активность мембраносвязанного GR?

GC также могут усиливать взаимодействия комплекса E-кадгерина и β -катенина путем снижения активности фасцина, актин-связывающего белка, негативного регулятора адгезионных контактов в опухолевой ткани. Однако в то же время было показано, что активированный GR способен модулировать активность сигнального пути Wnt путем увеличения экспрессии GC-зависимого гена SGK1, который снижает активность GSK3 путем ее фосфорилирования, последующей инактивации комплекса деградации β -катенина, высвобождению β -катенина, его перемещению в ядро и запуска транскрипции [156, 157]. Это способствует увеличению инвазивного и метастатического потенциала опухолевых клеток, а также в ряде случаев является причиной остеопороза, индуцированного GC [156]. В других источниках представлены данные, наоборот, свидетельствующие о том, что GC ингибируют фосфорилированный Akt, активируют GSK3, что стимулирует дифференцировку остеобластов и рост костной ткани [157].

Описаны в мировой литературе эффекты глюкокортикоидов на экспрессию и функционирование белков щелевых контактов. Большая часть исследований посвящена изучению влияния GC на моделях неопухолевой природы: эмбриональных клетках головного мозга грызунов [158], остеобластах [159]. При обработке клеток головного мозга дексаметазоном было продемонстрировано изменение только в экспрессии Cx30 в сторону уменьшения, в остеобластах наблюдали снижение скорости течения жидкости в Ca^{2+} -каналах, что является следствием подавления экспрессии или некорректного функционирования коннексинов. При исследовании влияния GC на щелевые контакты на моделях злокачественных новообразований было показано, что в клетках глиомы *in vitro* функционирование межклеточных контактов данного типа существенно снижалось после обработки клеток Dex [160, 161]. На клетках линии аденокарциномы поджелудочной железы человека, а также гепатомы крыс GC, напротив, вызывали повышение прочности щелевых контактов за счет увеличения синтеза Cx26 и Cx32 [162, 163]. Более того, в исследовании по сравнению эффектов

GS в различных клеточных линиях и на различные коннексины было продемонстрировано, что GS способны повышать экспрессию коннексинов 26 и 32 в первичных гепатоцитах крыс, но не в культуре клеток гепатомы крыс MH1C1. В то же время эффекта GS на коннексин Cx43 отмечено не было [164].

Нарушения в системе межклеточных контактов совместно с реорганизацией актинового цитоскелета приводят к увеличению активности псевдоподий клетки, в результате чего повышается двигательная способность клеток. Параллельно с данными процессами в трансформированной клетке происходит повышение синтеза протеиназ семейств активаторов плазминогена, матриксных металлопротеиназ и цистеинпротеиназ, основная функция которых заключается в разрушении внеклеточного матрикса, а также в расщеплении неактивных форм цитокинов (мембрано-связанных и адсорбированных на внеклеточном матриксе) и формировании новых внешних митогенных/мотогенных сигналов. Так происходит реализация программы эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), в результате которого эпителиальная клетка приобретает «локомоторный фенотип», характеризующийся повышенной миграционной способностью. Компоненты многих пролиферативных сигнальных путей являются также регуляторами движения клеток (в частности, EGF, HGF/SF, PDGF, VEGF). Активация белков семейства Ras и PI3K, находящихся на пересечении сигнальных путей от многих рецепторов, ведет к повышению активности MAP-киназ, циклинзависимых киназ и малых ГТФаз семейства Rho (Rho, Rac, Cdc42), играющих центральную роль в контроле полимеризации актина, реорганизации цитоскелета и регуляции движения клеток [71].

При рассмотрении ЭМП более детально, необходимо отметить, что в первую очередь в клетках снижается экспрессия эпителиальных генов и увеличивается продукция специфических мезенхимальных маркеров. Мезенхимальные маркеры трансформированной клетки включают в себя фибробласто-специфический белок 1 (Fibroblast-Specific Protein 1, FSP1 или S100A4), виментин, коллаген I типа и его рецепторную киназу DDR2, N-кадгерин, факторы транскрипции Snail1 и 2, ZEB1 и 2, Twist. Также к мезенхимальным маркерам относится преобладание в клетке β -катенина ядерной локализации. К эпителиальным маркерам, чья экспрессия снижается во время ЭМП, относятся уже описанные ранее E-кадгерин, ZO-1, цитокератины, клаудины, окклюдин и компоненты базальной мембраны коллаген IV типа и ламинин 1 [166].

К ЭМП могут приводить нарушения в сигнальном пути Wnt- β -катенин. Нарушения в работе комплекса деградации, состоящего из протеинкиназы GSK3 β и казеинкиназы CK1 совместно с белками аксином, APC и убиквитинлигазой β -TrCP, в частности, мутации в гене APC, приводят к снижению уровня фосфорилирования β -катенина, высвобождению его из

комплекса с E-кадгерином, транслокации в ядро и запуску транскрипции генов, вовлеченных в ЭМП (c-Myc, Snail1, Snail2) [165, 166].

Еще одним хорошо изученным сигнальным путем, вовлеченным в развитие ЭМП, является каскад, запускаемый трансформирующим фактором роста β (Transforming Growth Factor β , TGF β). Его вклад в процесс канцерогенеза может быть двояким: TGF β может выполнять роль опухолевого супрессора на стадии инициации злокачественной трансформации клетки, и в то же время оказывать промотирующий эффект на стадии прогрессирующего канцерогенеза. TGF β в активном состоянии связывает рецепторы серин/треониновых кинах T β RI и T β RII, которые затем фосфорилируют и активируют факторы транскрипции Smad2 и 3, которые в свою очередь приводят к индукции активности Snail1, Snail2 (Slug), ZEB1 и 2, а также белков FOXC2 и FOXQ1, подавляющих экспрессию E-кадгерина [166]. Также T β RI способен активировать сигнальный путь Ras [167], что совместно с инактивацией p53 за счет Mdm2 приводит к деградации RhoA, деполимеризации актина и разрушению плотных контактов [168].

Сигнальный путь поверхностного рецептора Notch индуцируется при связывании данного рецептора со своими лигандами Jagged-1 и 2. После связывания с лигандом внеклеточная часть рецептора подвергается расщеплению протеазами и эндоцитозу. В то же время внутриклеточная часть рецептора (Notch Intracellular Domain, NICD) высвобождается и транслоцируется в ядро, где образует комплекс с транскрипционным фактором RBPJк (Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region) для инициации транскрипции. Выживание трансформированных клеток в условиях гипоксии и процесс ЭМП регулируется активацией Notch лигандом Jagged-2, приводящей к, в свою очередь, к активации киназы Akt, увеличению синтеза Snail-2 и подавлению экспрессии E-кадгерина [166].

При активации сигнального пути Hedgehog (HH) снижается уровень фосфорилирования транскрипционного фактора Gli, который в нефосфорилированной форме способен перемещаться в ядро и запускать процесс транскрипции. Индукция ЭМП в данном случае происходит за счет увеличения синтеза ZEB2 и некоторых мезенхимальных маркеров, таких как N-кадгерин [166].

Сигнальные пути рецепторных тирозинкиназ семейств EGFR, PDGFR, c-met (рецептор фактора роста гепатоцитов), фактора роста нервов (Nerve Growth Factor Receptor, NGFR) и FGFR вовлечены в большое количество процессов, ведущих к злокачественной трансформации клетки: неконтролируемой пролиферации, ослаблению индукции апоптоза, стимуляции неоангиогенеза и ЭМП [169]. Основные афферентные сигнальные пути, активируемые рецепторными тирозинкиназами - Ras/ Raf/ MEK/ ERK и PI3K/ Akt, которые заканчиваются активацией факторов транскрипции семейства AP-1, индукцией экспрессии

антиапоптотических белков семейства Bcl-2, активацией пролиферативного каскада mTOR. Каждый из указанных сигнальных путей приводит к стимуляции ЭМП за счет усиления транскрипции мотогенных молекул и взаимодействия с пролиферативными каскадами Wnt/ β -catenin, TGF β , NF- κ B.

Эффекты GC на развитие ЭМП неоднозначны. С одной стороны, было продемонстрировано, что GC способны подавлять ЭМП, индуцированный TGF β , за счет снижения уровня ROS, также индуцированных TGF β . Более того, было показано, что глюкокортикоид Dex способен индуцировать обратный мезенхимально-эпителиальный переход. После обработки клеток рака легкого Dex наблюдали нарушение связывания Snail1 с промотором E-кадгерина и, соответственно, нормализацию уровня данного белка адгезионных контактов [170]. В клетках ER-положительного РМЖ было показано, что GR связывается с респонсивными элементами эстрогенов, но функционирует как репрессор транскрипции, подавляя, помимо прочего, развитие ЭМП [171]. Постепенное снижение уровня функционально активного GR наблюдали при прогрессирующей трансформации нормальной ткани молочной железы в карциному *in situ* и затем в инвазивную карциному, что также свидетельствует о роли GR в поддержании нормального фенотипа клетки [55]. ЭМП ER-негативного РМЖ считают GR-независимым. На моделях рака почки было показано, что GC регулируют прогрессию опухолевых клеток за счет повышения синтеза NaK- β ₁, АТФазы и молекулы межклеточной адгезии, потеря экспрессии которой была продемонстрирована для опухолей нескольких нозологических форм, а также за счет снижения экспрессии мезенхимального маркера N-кадгерина [173–175]. При обработке клеток рака почки глюкокортикоидами Dex, триамцинолона ацетонидом и флуоцинолона ацетонидом наблюдали снижение подвижности клеток, подавление инвазивной способности, а также мезенхимально-эпителиальный переход [176].

С другой стороны, GC индуцируют транскрипцию *SGK1*. Было показано, что нокаут *SGK1* значительно снижает развитие ЭМП, увеличивает активность GSK3 β и подавляет накопление в клетке фактора транскрипции Snail. Активированная киназа *SGK1* стимулирует накопление Snail1 в клетке и снижение экспрессии E-кадгерина [244]. Однако также существуют данные о том, что *SGK1* опосредует подавление активности сигнального пути Notch, восстановлению чувствительности к GC и более благоприятному прогнозу при лейкозах [182].

Многие детали механизма эффекта глюкокортикоидов на ЭМП, инвазию и метастазирование должны быть еще изучены. Общее направление влияния GC на данные процессы зависит от типа клеток и микроокружения, а также от степени реализации

транскрипционной активности GR. Применение селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора, возможно, позволит избежать активации транскрипции генов, стимулирующих ЭМП, и сдвинуть процессы жизнедеятельности клетки в сторону от озлокачествления, прогрессии и приобретения инвазивного потенциала.

1.2.5. Влияние глюкокортикоидов на клеточную дифференцировку

В основном злокачественной трансформации подвергаются низкокодифференцированные клетки, прошедшие только несколько раундов деления. В дальнейшем дифференцировка блокируется, а изменения в клеточном фенотипе соответствуют процессу дальнейшей опухолевой прогрессии. Существует ряд исключений, при которых трансформация происходит в высококодифференцированных клетках (хронический миелоидный лейкоз, плоскоклеточный ороговевающий рак кожи и высококодифференцированные аденокарциномы толстой кишки), однако в дальнейшем там могут возникать генетические нарушения, приводящие к потере способности клеток дифференцироваться. В частности, при прогрессии гормонально-зависимых опухолей (РМЖ, рак предстательной железы) потеря экспрессии рецепторов стероидных гормонов является одним из основных изменений, приводящих к дедифференцировке клеток [71].

В программу дифференцировки клеток вовлечено большое количество сигнальных путей, регулирующих образование межклеточных контактов, миграционную и пролиферативную активность клеток (Wnt/ β -катенин, Hedgehog/Gli, Jagged/ Notch, JAK/STAT, NF κ B), а также специфических сигнальных путей, отвечающих непосредственно за клеточную дифференцировку (морфогенетического белка кости (bone morphogenetic protein, BMP) и ретиноевой кислоты (retinoic acid, RA)) [181].

Наиболее частыми нарушениями в сигнальном пути Wnt, препятствующими дальнейшей дифференцировке клеток, являются описанные в разделе 2.4. мутации в гене APC, ведущие к распаду комплекса деградации Axin-GSK3-APC и активации транскрипционной активности β -катенина [183, 184], мутации непосредственно в гене β -катенина, конститутивно активирующие сигнальный путь Wnt при опухолях ЖКТ, драйверные мутации в генах R-спондина и RNF43 [185–187], соматические мутации в генах *FZD5* и *BCL9* и транскрипционный сайленсинг ингибитора Wnt, DKK1/2, при лейкозах [188, 189].

Сигнальный путь Hedgehog/Gli активируется при ядерной транслокации Gli2, фактора, активирующего транскрипцию. Высвобождение же Gli2 происходит при связывании лиганда Hedgehog со своим трансмембранным рецептором Patched (PTCH), который, в свою очередь, перестает ингибировать другой трансмембранный рецептор Smoothed (SMO), что приводит к

высвобождению Gli2 [191]. Существуют три механизма нарушений сигнального пути Hedgehog, которые были описаны в различных типах опухолей и вносят свой вклад в подавление дифференцировки клеток и их злокачественной трансформации: - лиганд-независимая активация сигнального пути за счет мутаций в генах *PTCH* или *SMO* [190, 192–194]; - лиганд-зависимая активация сигнального пути, сопровождающаяся гиперэкспрессией внутриклеточных компонентов *SUFU*, *Gli1*, и *Gli3* [195–197]; - лиганд-зависимая активация сигнального пути за счет избыточной экспрессии лиганда Hedgehog и его взаимодействие с рецепторами на поверхности не только опухолевых клеток, но и клеток стромы, что, в свою очередь, приводит к повышению экспрессии VEGF и инсулин-подобного фактора роста (insulin-like growth factor, IGF) и привлечению этих факторов к опухолевой клетке [198, 199].

В сигнальном пути Notch рецептор Notch взаимодействует с лигандом Jagged. После этого взаимодействия происходят две протеолитические реакции, что приводит к расщеплению Notch, транслокации его внутриклеточного домена в ядро и активации транскрипции генов, ответственных за поддержание дедифференцированного состояния клетки [201]. В глиобластомах активация сигнального пути Notch осуществляется через тромбоцитарный фактор роста PDGF и приводит к постоянному самообновлению стволовых клеток опухоли и ее васкуляризации [200]. Мутации в гене *Notch* могут приводить к конститутивной лиганд-независимой активации его сигнального пути. В частности, активирующие мутации Notch описаны при РМЖ и Т-клеточном лимфобластном лейкозе [201, 202, 204]. Помимо этого, мутации типа «потери функции» (loss-of-function) в гене *FBXW7*, который снижает степень ядерной транслокации Notch, или мутации типа «приобретения функции» (gain-of-function) в гене *Notch2* наблюдали в диффузных крупноклеточных В-лимфомах, а потерю активности регулятора сигнального пути Notch, белка Numb, описывали для стволовых клеток РМЖ [203, 205, 206, 208].

Сигнальный путь JAK/STAT также играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза и прогрессии опухоли. JAK, активируемый цитокинами или факторами роста, фосфорилирует STAT, который транслоцируется в ядро и запускает транскрипцию генов. У пациентов с гепатоцеллюлярными карциномами были описаны мутации в гене *JAK1*, приводящие к активации сигнального пути JAK/STAT по цитокин- и рецептор-независимому механизму [207]. Также, как было продемонстрировано, мутации *JAK2-V617F* ведут к цитокин-независимой гиперактивации сигнального пути JAK/STAT и отвечают за патогенез злокачественных новообразований кроветворной системы [286]. Были также описаны такие мутации *JAK2* как K539L,75,76 T875N,77, а также делеция IREED; для *JAK3* были идентифицированы мутации A572V, V722I, и P132T [213, 214].

Семейство NF-κB состоит из 5 белков: p65 (RelA), NF-κB1 (p105/p50), NF-κB2 (p100/p52), RelB, и c-Rel. Предшественники p105 и p100 расщепляют активные субъединицы p50 и p52. Канонический путь NF-κB активируется различными стимулами, включая липополисахарид (LPS), TNF-α и IL-1. В отсутствие внешних стимулов димер p65-p50 связан с ингибитором белков семейства κB, IκB, в цитоплазме. После активации рецепторов цитокинов происходит фосфорилирование IκBα и его дальнейшая протеосомная деградация. NF-κB транслоцируется в ядро, где происходит активация транскрипции генов, вовлеченных в развитие воспаления, стимуляцию пролиферации. Более того, данный сигнальный путь регулирует также прогрессию опухоли, метастазирование и ангиогенез [315]. Активирующие мутации и амплификации ряда ключевых генов сигнального пути NF-κB, в каскадах Cgma1, Bcl10, и Malt1 были описаны для РМЖ и ряда гемобластозов. Гиперэкспрессия c-Rel, IκBβ, NEMO, а также мутации в афферентных регуляторах данного сигнального пути - рецепторах факторов роста (EGFR, HER2) - также приводит к конститутивной активности NF-κB [224, 225].

ГС во многих случаях способны индуцировать дифференцировку опухолевых клеток. Так, было описано для клеточных линий меланомы, рака яичников, рака легких и рака предстательной железы, что ГС нормализуют экспрессию опухолевых маркеров [48, 226–228]. Было показано, что активация сигнального пути GR приводит к снижению экспрессии маркеров рака предстательной железы ферментов хепсина, AMACR, и повышению экспрессии негативного маркера рака предстательной железы маспина [48]. В отношении сигнального пути Notch, было продемонстрировано, что активация ГС-зависимой киназы SGK1 и дальнейшее фосфорилирование белка FBXW7 при терапии ГС Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов способствует подавлению активности сигнального пути Notch [182, 229], а подавление Notch с помощью ингибиторов γ-секретаз, в свою очередь, восстанавливает чувствительность ГС-резистентных клеток к глюкокортикоидам за счет восстановления положительной обратной связи при транскрипционной авторегуляции GR посредством фактора транскрипции HES1 [230]. Гиперактивация Notch в тимоцитах препятствует развитию в них ГС-индуцированного апоптоза [231]. Ингибирующий эффект ГС на сигнальный путь NF-κB хорошо известен. Белок-белковое взаимодействие NF-κB и GR позволяет подавлять с помощью ГС экспрессию провоспалительных цитокинов и факторов пролиферации [31]. Однако также описан антиапоптотический NF-κB-зависимый эффект ГС в клетках РМЖ MCF-7, обработанных TNFα [232]. Весьма интересно влияние ГС на компоненты сигнального пути Hedgehog: независимо от взаимодействия с GR, многие ГС, в особенности фторсодержащие, а также ряд других стероид-подобных соединений, являются агонистами рецептора SMO, что приводит к избыточной активации данного сигнального каскада и может нарушать дифференцировку

клеток и способствовать процессу их злокачественной трансформации [233]. Однако было также описано влияние GC на сигнальный путь Hedgehog в пролиферации и дифференцировке нейрональных клеток, где было показано, что высокие дозы HCS способны подавлять активность данного сигнального пути в нейрональных клетках-предшественниках [234]. Схожий эффект описывали для нейрональных клеток взрослых крыс, которых подвергали пренатальному стрессу. Более того, нарушения дифференцировки нейрональных клеток, вызываемые HCS, возможно предотвратить с помощью активации сигнального пути Hedgehog [234]. Уже многократно упоминавшаяся в тексте GC-зависимая киназа SGK1 способна также подавлять активность данного сигнального каскада, что было подтверждено при обработке нейрональных клеток гиппокампа ингибитором SGK1, и дальнейшей отмене ингибирующего эффекта HCS на активность Hedgehog.

В литературе описано подавление пролиферации и дифференцировки клеток при обработке их GC, реализующееся за счет увеличения экспрессии GC-зависимого гена Dickkopf1 (DKK1, эндогенного антигониста сигнального пути Wnt). DKK1, в свою очередь, оказывает негативное воздействие на компоненты канонического сигнального каскада Wnt. Данный эффект наблюдали при изучении дифференцировки нейрональных клеток, а также в остеобластах в контексте развития остеопороза [235, 236].

Существует довольно небольшое количество данных по влиянию GC на сигнальный путь JAK/STAT. Как было описано в литературе, его активация в опухолевых клетках может быть подавлена глюкокортикоидами за счет подавления экспрессии провоспалительного цитокина IL-6 [237, 238]. Более того, снижение активности сигнального пути JAK/STAT также ассоциирована с индукцией апоптоза в опухолевых клетках [237].

Таким образом, преимущественно влияние GC на дифференцировку клеток можно описать как благоприятное для ее реализации. Однако в каждом индивидуальном случае необходим подбор условий и контроль активности всех описанных выше сигнальных каскадов, поскольку эффект GC часто тканеспецифичен, а также зависит от степени трансформации клеток.

1.2.6. Глюкокортикоиды и генетическая нестабильность

В основе генетической нестабильности опухолевых клеток лежат следующие события и процессы:

- уменьшение точности воспроизведения генетического аппарата
- нарушения механизмов репарации ДНК
- изменения регуляции клеточного цикла в поврежденных клетках

1) Уменьшение точности воспроизведения генетического аппарата связано с некорректной работой полимераз и ферментов, обеспечивающих их функционирование: хеликаз, топоизомераз, лигаз и др.

После транслокации в ядро гормон-рецепторные комплексы остаются в контакте с GRE в течение длительного времени, изменяя структуру хроматина на более открытую, доступную для факторов транскрипции, необходимых для ее активации [239, 240]. В частности, была изучена динамика взаимодействия GR с GRE в составе изолированных фрагментов ДНК и было продемонстрировано, что время полужизни комплекса GR с синтетическим глюкокортикоидом триамценолоном с фрагментом ДНК LTR MMTV, содержащим несколько GRE, составляет 108 мин [241]. Однако позже были получены противоречивые данные о значительно более коротком времени взаимодействия GR с респонсивными элементами – 5-10 с. Динамика связывания комплекса GR с дексаметазоном (Dex) была изучена с использованием флуоресцентно меченого GR и регистрации потери флуоресценции в результате лазерного отбеливания (fluorescence loss in photobleaching, FLIP) и восстановления флуоресценции после фотоотбеливания (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) [240, 242]. Полученные противоречия были объяснены в последующих экспериментах, где было продемонстрировано, что основную роль в длительности взаимодействия GR с GRE играют различные ко-факторы [243]. Однако, вне зависимости от времени взаимодействия, во всех случаях наблюдали изменения в структуре хроматина, способствующие усилению транскрипции, в частности, метилирование лизина в положении 4 в гистоне H3, ацетилирование лизина в положении 27 в гистоне, а также обогащение области связывания GR гистонами H2A.Z [244, 245]. Само по себе изменение топологии ДНК не является основой генетической нестабильности, но в клетках, уже подвергшихся злокачественной трансформации, может способствовать опухолевой прогрессии.

Также GC влияют на уровень экспрессии отдельных ферментов метаболизма ДНК: топоизомераз и полимераз. Активность полимераз увеличивается после образования транскрипционного комплекса с участками связывания GR, уровень экспрессии полимераз и лигаз также повышается [246, 247]. Здесь необходимо отметить, что GR способен запускать экспрессию полимераз даже в не связанном с лигандом состоянии [248].

Литературных данных о влиянии GC на экспрессию и активность топоизомераз довольно ограниченное количество. Так, в отношении топоизомераз 1 и 2 было показано, что при связывании GR с промоторными областями ДНК и сборке транскрипционного комплекса происходит активация данных ферментов [249–252]. Для топоизомеразы 1 было также показано повышение уровня экспрессии соответствующего ферменту гена, причем это было показано *in vivo* как для экзогенных GC, так и для эндогенных. В частности, при максимальном суточном уровне HCS у мышей с аллогraftами саркомы 180, карциномы легких Льюиса и меланомы B16 наблюдали увеличение экспрессии и активности топоизомеразы 1 как в опухолевой ткани, так и в нормальных тканях организма. При сравнении протоколов терапии животных с использованием ингибитора топоизомеразы 1 камптотецина наибольшая эффективность лечения была достигнута при введении камптотецина в период максимальной концентрации эндогенного HCS у животных и, соответственно, максимальной активности топоизомеразы 1 [250, 251].

2) Нарушения систем репарации ДНК включают в себя дефекты генов эксцизионной репарации ДНК, распознающих сшивки оснований (*XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPD*, *XPF*, *XPB*), дефекты репарации ошибок спаривания (mismatch repair, гены *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* и др.), а также нарушения в системе репарации двунитевых разрывов при мутациях в генах *BRCA1* и *BRCA2* [71]. GC не являются генотоксичными соединениями, соответственно, не могут являться начальным звеном дефектов той или иной ветви в системе репарации. Также в настоящее время практически нет литературных данных об интегральном влиянии глюкокортикоидов на механизмы действия репарационных сигнальных путей как в нормальной, так в трансформированной клетке. С помощью поисковой системы NURSA [253] были проанализированы данные литературы по результатам анализа изменения профилей экспрессии генов с целью поиска конкретных генов репарационных путей. По результатам поиска удалось найти лишь одиночные, часто противоречивые данные об изменении экспрессии генов *XPF* (повышение экспрессии в ~2 раза в макрофагах мышей, получавших дексаметазон) [253], *XPA* (снижение экспрессии в гепатоцитах мыши [253]). По генам *XPB*, *XPC*, *XPD* и другим генам системы эксцизионной репарации и влиянию на их активность или экспрессию GC данных обнаружено не было. Аналогичную ситуацию наблюдали при поиске данных литературы по анализу влияния GC на экспрессию генов, отвечающих за репарацию ошибок спаривания. Уровень экспрессии генов, кодирующих белки комплекса *MSH2/MSH6*, повышался в immortalized клетках эпителия хрусталика, но уменьшался в 4-5 раз в почечной ткани крыс, получавших метилпреднизолон, и в гепатоцитах мыши, совместно с *MLH3* и *PMS1* [253]. В клетках аденокарциномы легких A549 наблюдали увеличение

экспрессии гена *MSH3*, однако при исследовании транскриптома печени крыс, получавших дексаметазон, было продемонстрировано снижение уровня экспрессии данного гена [253]. По влиянию глюкокортикоидов на уровень транскрипции прочих генов системы репарации ошибок спаривания, *MLH1*, *PMS2* и др, литературных данных найдено не было.

В мировой литературе описано несколько исследований по влиянию GC и GR на ферменты репарации двуниевых разрывов генов *BRCA1* и *BRCA2*. Так было продемонстрировано, что GR, в не связанном с лигандом состоянии, способен повышать экспрессию гена *BRCA1* посредством связывания с компонентом транскрипционного комплекса ETS, белком, связывающим GA-участки (GA-binding protein, GABP) [30]. В свою очередь, в ряде исследований на моделях РМЖ и РЯ был продемонстрирован эффект *BRCA1* на фосфорилирование GR по остатку серина в положении 211: гиперэкспрессия *BRCA1* приводила к повышению уровня фосфорилированной формы рецептора p-GR-Ser211 посредством активации MAP-киназного каскада и стимуляции фосфорилирования p38. Для мутированного *BRCA1*, а также *BRCA2*, несущего и не несущего в себе мутаций, подобных эффектов описано не было [254, 255]. Таким образом, мутации в гене *BRCA1* можно рассматривать и как прогностический признак по отношению к глюкокортикоидной терапии.

3) Система чекпойнтов или сверочных точек осуществляет остановку клеточного цикла при возникновении различных внутриклеточных нарушений, чтобы предотвратить развитие или распространение мутированных или поврежденных клеток. Различные чекпойнты контролируют репликацию ДНК, повреждения ДНК, сегрегацию хромосом, пролиферативные сигналы, а также внутриклеточные концентрации активных форм кислорода. Выделяют несколько сверочных точек: сверочная точка в G1 периоде, сверочная точка в S-фазе, сверочная точка в G2 периоде, сверочная точка сборки веретена деления. Ключевую роль в интеграции сигналов от поврежденной ДНК и их дальнейшей передаче к разнообразным эффекторам играют специфические протеинкиназы ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated), ATR (ATM Related), NBS1, CHK1 и CHK2 (чекпойнт-киназы 1, 2). Изменения компонентов сверочных точек клеточного цикла, являющихся либо сенсорами изменений, либо эффекторами, приводит к формированию опухолей [71]. Как и в предыдущих двух случаях, влияние GC на экспрессию и/или активность данных генов/белков исследовали в довольно ограниченном числе экспериментальных работ. Так, по данным поисковой системы NURSA было показано, что экспрессия генов *ATM* и *ATR* повышается после обработки клеток эпителия хрусталика и клеток аденокарциномы легких A549 [253]. Более того, было показано, что в лимфобластах, полученных от пациентов с синдромом Луи-Бара (атаксия телеангиэктазия) с мутациями в гене *ATM*, Dex индуцировал синтез укороченного варианта данного гена, не затрагивая область с

мутацией, за счет активации альтернативного сплайсинга, что восстанавливает активность белка и улучшает прогноз течения заболевания [256, 257]. Экспрессия генов *CHK1* и *CHK2* после воздействия глюкокортикоидов повышалась или понижалась в зависимости от типа клеток. Так, в первичной культуре эпителия хрусталика наблюдали увеличение транскрипции обоих генов, в то время как в ткани печени крыс, получавших дексаметазон, отмечено снижение их экспрессии [253].

Таким образом, данные о роли GR в повышении генетической нестабильности в трансформированной клетке на данный момент фрагментарны и противоречивы. Существуют разрозненные данные, на основании которых можно высказать предположение о том, что GC и GR способны в той или иной мере влиять на экспрессию генов различных систем репарации и сверхочных точек, причем это действие может быть положительным для организма и лежать в основе новых подходов к оптимизации химиотерапевтических протоколов. Однако интегральный эффект GC на описанные выше системы поддержания стабильности генома представляет существенно слабее общего проапоптотического и противовоспалительного эффектов GC. Необходимо большее количество исследований в данной области для того, чтобы иметь возможность направленно модулировать механизмы поддержания целостности генома при использовании глюкокортикоидов.

1.2.7. Влияние глюкокортикоидов на сигнальные пути, связанные с развитием множественной лекарственной устойчивости

Несмотря на значительное повышение эффективности лечения онкологических заболеваний в настоящее время, развитие множественной лекарственной устойчивости (MDR) остается одной из основных проблем химиотерапии. MDR определяют как устойчивость опухолевой клетки к широкому спектру противоопухолевых препаратов с различными механизмами действия [258]. Такая устойчивость может быть врожденной или приобретенной в ходе химиотерапии, а также возможно ее развитие при рецидиве [259, 260]. Развитие MDR представляет собой сложный многофакторный процесс, задействующий различные механизмы как для врожденной, так и для приобретенной устойчивости. К основным механизмам развития MDR относятся: 1) гиперэкспрессия специфических белков-транспортёров MDR; 2) нарушения в проапоптотических сигнальных каскадах; 3) индукция аутофагии 4) изменения метаболизма препарата; 5) изменения в гене/белке-мишени и в системе репарации ДНК; 6) нарушения в окислительно-восстановительном балансе клетки. Однако детальные молекулярные механизмы развития MDR у каждого конкретного пациента подразумевают понимание взаимодействий между конкретными биомаркерами, которые в настоящее время изучены не в полном объеме.

Так, было показано, что большая роль в развитии MDR принадлежит микроРНК, которые влияют на большинство процессов, указанных выше.

Гиперэкспрессия специфических белков-транспортеров

Гиперэкспрессия специфических белков-транспортеров MDR является одной из основных причин развития резистентности [261, 262]. Наиболее изученными белками-транспортерами являются ABC-транспортеры, имеющие в своем составе трансмембранный домен, посредством которого происходит выведение химиопрепаратов из клетки. Данный процесс осуществляется за счет энергии АТФ против градиента концентрации и приводит к снижению токсического действия препарата на опухолевую клетку [263, 264]. В настоящее время описано 48 ABC-транспортеров в организме человека, общим признаком которых является наличие одного или нескольких АТФ-связывающих доменов, выполняющих функцию связывания и гидролиза АТФ, и нескольких трансмембранных доменов, которые взаимодействуют с молекулой препарата и за счет энергии гидролиза АТФ выводят ее во внеклеточное пространство [265]. Наиболее полно охарактеризованными из них являются Р-гликопротеин (P-gp/ABCB1), белок 1, связанный с множественной устойчивостью (multidrug resistance associated protein-1, MRP1/ABCC1), и белки резистентности, характерные для РМЖ (breast cancer resistant proteins, BCRP/ABCG2) [266–269]. Было показано, что гиперэкспрессия ABCB1 ассоциирована с резистентностью к большому числу препаратов: антрациклиновым антибиотикам, винкаалкалоидам, эпиподофилотоксинам и таксанам [270]. Также большим спектром препаратов-мишеней обладает белок ABCC1: для него показана связь с устойчивостью к антрациклинам, винкаалкалоидам, эпиподофилотоксинам, камптотецину, метотрексату и митоксантрону [271]. Субстратом для белка ABCG2 являются ингибиторы тирозинкиназ, антрациклины, производные камптотецина, метотрексат и флавопиридол [272, 273].

Нарушения в проапоптотических сигнальных каскадах в опухолевых клетках

Большую роль в развитии MDR играют нарушения в функционировании опухолевого супрессора p53. Мутации в гене p53, ведущие к потере функциональной активности белка, и последующее развитие MDR было описано для ОЛЛ, ОМЛ, остеосаркомы, РМЖ, рака яичников, рака яичек и остеосаркомы [274–277]. Также ослабление индукции апоптоза может осуществляться за счет того, что противоопухолевые препараты могут вызывать гиперэкспрессию антиапоптотических генов и подавлять экспрессию проапоптотических. Так, Bcl-2 вовлечен в формирование резистентности к доксорубину, цисплатину, паклитакселу, этопозиду и митоксантрону [278, 279]. Чрезмерная активация протеинкиназы B и NF-κB могут

также вносить свой вклад в развитие MDR путем взаимодействия с компонентами апоптотических сигнальных каскадов [280].

Индукция аутофагии

Аутофагия представляет собой консервативный катаболический процесс, характеризующийся аутодеградацией содержимого клетки и элиминацией избыточных или нефункциональных органелл и белков посредством образования аутофагосомы из эндосом и лизосом [281]. Различают макроаутофагию, микроаутофагию и шапероновую аутофагию. Макроаутофагия, наиболее изученный тип аутофагии, неизбирательна: в аутофагосому заключается случайный участок цитоплазмы. При микроаутофагии аутофагосомой захватываются отдельные органеллы, макромолекулы и обломки клеточных мембран, однако в целом процесс также не характеризуется высокой специфичностью. При шапероновой аутофагии происходит направленный транспорт деградирующих белков при участии белков-шаперонов HSP70 и HSP90 и мембранного рецептора LAMP-2 в аутофагосому [282]. В нормальных клетках аутофагия является физиологическим процессом, необходимым для элиминации поврежденных органелл и рециклизации макромолекул, таким образом поддерживая клеточный гомеостаз и защищая клетки от злокачественной трансформации. В опухолевых клетках аутофагия способствует сохранению жизнеспособности клетки в условиях метаболического стресса, такого, как воздействие противоопухолевого препарата, тем самым подразумевая резистентность клетки к его действию. Однако в условиях постоянного стресса аутофагия может приводить к клеточной гибели. В настоящее время многие данные свидетельствуют о том, что аутофагия, обеспечивающая сохранение жизнеспособности опухолевой клетки, играет большую роль в развитии MDR. Химиопрепараты могут вызывать как активацию апоптоза, так и запуск аутофагии, но индукция аутофагии способствует инактивации апоптоза [283–288]. MDR, опосредованная аутофагией, может развиваться по механизмам, затрагивающим сигнальные пути EGFR, PI3K/mTOR, VEGF, MAPK14/p38a и p53 [289–293].

Изменение метаболизма ксенобиотиков

Критическую роль в данном процессе играют белки суперсемейства цитохрома P450 (CYP), экспрессирующиеся в печени, почках и кишечнике. Данные ферменты регулируют метаболизм большого числа противоопухолевых препаратов: таксанов, винбластина, винкристина, доксорубина, этопозида, иринотекана, циклофосамида и ифосамида [270]. На активность ферментов CYP влияют как генетические изменения, в частности, полиморфизмы, так и изменения в физиологическом состоянии организма, такие как стадия болезни, определенные продукты питания и пищевые добавки, а также курение. Все указанные

выше факторы способны изменять фармакокинетический профиль и, соответственно, токсичность химиопрепаратов. Полиморфизмы в генах CYP могут приводить к уменьшению активности ферментов и последующему снижению выведения продуктов распада препаратов или к уменьшению образования активных метаболитов [294]. Хорошо известным примером является влияние полиморфизма в гене CYP2D6 на эффективность тамоксифена за счет снижения образования активного метаболита, эндоксифена [295].

Изменения в гене/белке-мишени химиотерапии и в системе репарации ДНК

Изменения в экспрессии и/или функциональной активности гена/белка, на который направлено действие цитотоксического препарата, также может являться причиной развития резистентности. В частности, уровень чувствительности клеток опухоли к 5-фторурацилу определяется уровнем экспрессии тимидилатсинтазы, мишени действия данного препарата, и дигидропиримидиндегидрогеназы, фермента, определяющего скорость метаболизма 5-фторурацила. Аналогично уровень экспрессии субъединицы 2 рибонуклеотидредуктазы определяет степень эффективности гемцитабина [296, 297]. Мишенью действия доксорубина, этопозида, идарубина и митоксантрона является фермент топоизомераза II в момент образования комплекса с ДНК, что приводит к образованию разрывов в ДНК и индукции клеточной гибели. Уменьшение содержания топоизомеразы в опухолевой клетке ведет к резистентности к ее ингибиторам [398]. Повреждения любой из систем репарации ДНК (эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER) и репарация мисмэтчей (mismatch repair, MMR) также могут быть вовлечены развитие MDR. Так, специфическая мутация в компонентах сигнального пути MMR приводит к развитию наследственного неполипозного рака толстой кишки, который характеризуется сниженной эффективностью химиотерапии, включающей в себя 5-фторурацил [301]. В то же время мутации в генах BRCA1/2 при РМЖ и раке яичника оказывают противоположное действие: было описано повышение чувствительности к химиотерапии производными платины и другими ДНК-повреждающими агентами при наличии данных мутаций в опухолевых клетках пациента [270].

Нарушения в окислительно-восстановительном гомеостазе клетки

Нормальные клетки способны поддерживать определенный баланс между содержанием окислителей и антиоксидантов – так называемый окислительно-восстановительный гомеостаз клетки. В трансформированных клетках обычно повышена продукция ROS, которые являются промоторами опухолевого роста. В то же время, чрезвычайно повышенный уровень содержания ROS способен приводит к гибели опухолевых клеток. Механизм действия ряда противоопухолевых препаратов – цисплатина, паклитаксела и алкилирующих агентов

адриамицина и темозоломида, заключается в повышении продукции ROS [270]. В данном случае некоторые опухолевые клетки способны развивать резистентность к действию указанных выше препаратов за счет увеличения активности системы антиоксидантов: повышение экспрессии генов оксигеназы гема 1 (heme oxygenase 1, HMOX1), супероксиддисмутазы 1 (superoxide dismutase 1, SOD1) и глутатиона (glutathione, GSH) [302]. Данный механизм получил название «окислительно-восстановительной перезагрузки» (Redox Resetting) и может быть вовлечен в развитие лекарственной устойчивости наряду с другими процессами, описанными выше [303]. Наиболее вовлеченным в развитие MDR является антиоксидант глутатион: как было показано, повышение его экспрессии ассоциировано с резистентностью во многих онкологических заболеваниях [304]. С развитием MDR связаны также ферменты метаболизма GSH, в частности, γ -глутамилтрансфераза (γ -glutamyltransferase, GGT), основное действие которой заключается в метаболизме внеклеточного GSH и обеспечении продукции цистеина для ресинтеза внутриклеточного GSH, что способствует поддержанию высокого уровня внутриклеточного глутатиона. Глутатион-S-трансфераза (glutathione S-transferase, GST), фермент, катализирующий процесс образования конъюгата глутатиона с токсинами, тем самым проявляя функцию детоксикации. Тем не менее, было показано, что во многих типах злокачественных новообразований развитие устойчивости связано с высоким уровнем экспрессии GST. В настоящее время синтезирован и протестирован ряд препаратов – ингибиторов GST, часть из них проходит доклинические или клинические исследования [270, 304, 305].

Глюкокортикоиды оказывают влияние на большую часть описанных процессов. Поскольку влияние GC на сигнальные пути апоптоза и аутофагии, а также на метаболизм клетки и на системы репарации ДНК описаны в разделах 2.2, 2.6 и 2.8, в данном разделе будет рассмотрен эффект стероидов непосредственно на функционирование системы MDR, а также на окислительно-восстановительный потенциал клетки.

На клеточном уровне активность глюкокортикоидов регулируется доступностью рецептора для гормона. Белками, препятствующими связыванию GC с рецептором, являются глобулин, связывающий кортикостерон (CBG), 11- β -гидроксистероиддегидрогеназа (11 β -HSD) и P-gp/ABCB1. GC только в свободном состоянии способны диффундировать через цитоплазматическую мембрану и образовывать комплекс с GR. Около 90% GC связаны с CBG, что препятствует их проникновению в клетку. Изоформа II 11 β -HSD способна осуществлять конверсию гормонов в их неактивную форму (например, HCS превращать в кортизон), также препятствуя их связыванию с GR. P-гликопротеин выполняет функцию активного выведения GC из клетки, тем самым также способствуя развитию резистентности [306, 307]. С другой

стороны, в работе по исследованию экспрессии P-gp у 112 пациентов детского и юношеского возраста не было выявлено корреляции между резистентностью к GC и уровнем экспрессии/активности P-gp. Было проведено одно исследование по исследованию влияния GC на экспрессию и активность P-gp в клетках эндотелия сосудов головного мозга крыс, где было показано, что экспрессия P-gp не изменялась, но снижалось количество выведенного из клеток винкристина, что свидетельствует о том, что в данном случае GC снижают активность P-gp [308]. Ассоциации устойчивости GC с уровнем экспрессии других генов MDR также показано не было [309]. Однако о влиянии GC и GR на экспрессию генов MDR известно мало. Так, при анализе транскриптома клеток аденокарциномы легких A549 после обработки GC было показано увеличение экспрессии P-гликопротеина [253]. Что касается генов *MRP1/ABCC1* и *BCRP/ABCG2*, данных по влиянию GC на экспрессию/активность данных генов/белков в мировой литературе описано не было. Таким образом, хотя в литературе высказывали гипотезу о стимуляции развития MDR при действии GC, данные по этому вопросу разрозненны и противоречивы.

Опубликованные результаты исследований, посвященных изучению влияния GR на функционирование генов, отвечающих за поддержание окислительно-восстановительного баланса клетки, также противоречивы и фрагментарны. При анализе транскриптома клеток аденокарциномы легких A549 после обработки их дексаметазоном было показано снижение экспрессии гена *HMOX1* [253]. В других исследованиях, также включающих в себя транскриптомный анализ, было продемонстрировано противоположное влияние GC на экспрессию данного гена: при внутривенном введении метилпреднизолона крысам линии Wistar было отмечено увеличение экспрессии *HMOX1* в 2-3 раза в мышечной ткани и более чем в 20 раз – в ткани почечной капсулы [253]. В отношении остальных генов, описанных выше, *SOD1*, *GSH*, *GGT*, *GST*, данных литературы по влиянию GC на их экспрессию и/или активность, на настоящий момент нет. Существует ряд исследований, посвященных влиянию данных генов/белков на развитие резистентности к GC. Они также противоречивы и не дают точного ответа, являются ли белки, регулирующие MDR посредством влияния на окислительно-восстановительный баланс опухолевой клетки, регуляторами непосредственно чувствительности клеток к GC [310–313].

1.2.8. Влияние глюкокортикоидов на метаболизм опухолевой клетки

Известно, что метаболизм опухолевых клеток существенно отличается от метаболизма в клетках нормальных тканей [314]. Сигнальные пути, отвечающие за метаболизм в опухолевых клетках, претерпевают изменения таким образом, чтобы обеспечивать протекание энергозатратных процессов избыточной пролиферации и клеточного роста [314, 315] (Рисунок 4). Первым из открытых метаболических изменений в трансформированных клетках являлся эффект Варбурга, процесс аэробного гликолиза, открытый О. Варбургом в 1926 г [316]. Как было показано, в опухолевых клетках более активно идет процесс гликолиза, что приводит к повышению образования молочной кислоты и снижению активности цикла трикарбоновых кислот (tricarboxylic acid, TCA) [317]. Поскольку цикл TCA и дальнейшее окислительное фосфорилирование являются более эффективными процессами в отношении генерирования энергии в клетке, было высказано предположение, что описанные выше изменения в метаболических процессах опухолевой клетки необходимы для компенсации нарушений в функционировании митохондрий [315, 316]. В дальнейшем это предположение было подтверждено: в опухолевых клетках различного генеза, включая параганглиому, рак почки, острый миелолейкоз, глиобластому, лейомиоматоз и феохромоцитому, были обнаружены мутации в ферментах, ассоциированных с циклом TCA - сукцинатдегидрогеназа (succinate dehydrogenase, SDH), фумараза или фумаратгидратаза (fumarate hydratase, FH) и изоцитратдегидрогеназа (isocitrate dehydrogenase, IDH). Изменения в активности данных ферментов вносят свой вклад в нарушения функционирования митохондрий. Однако в других исследованиях было показано, что в трансформированных клетках присутствуют функционально активные митохондрии [318–320]. В опухолевых клетках отмечали также увеличение степени окислительного фосфорилирования [320], а уменьшение количества митохондриальной ДНК в клетке было ассоциировано со снижением степени злокачественности [318]. Таким образом, подобное смещение клеточного метаболизма в сторону аэробного гликолиза необходимо не только для синтеза АТФ, но и для обеспечения опухолевых клеток аминокислотами, жирами и нуклеиновыми кислотами для поддержания избыточной пролиферации [319].

В недавних исследованиях было продемонстрировано, что изменение метаболизма в клетках опухоли включает в себя, помимо изменений в метаболизме глюкозы, изменения в метаболизме жиров и аминокислот, в микроокружении опухоли и в окислительно-восстановительном потенциале клетки, ведущие к увеличению продукции ROS и повышению уровня вызываемого ими повреждения клеточных компартментов, а также ремоделирование внеклеточного матрикса. В частности, для клеток лейкозов и лимфом было показано, что

основным энергоемким процессом для них является митохондриальное окисление аминокислот, повышение степени которого и способствует в основном их росту и пролиферации [321]. Также опухолевых клеток было показано увеличение экспрессии альтернативной пост-транскрипционной изоформы пируваткиназы M2 (pyruvate kinase M2, PKM2) [322, 323]. PK опосредует превращение фосфоенолпирувата в пируват, что является основной лимитирующей стадией гликолиза [322]. PKM2 обладает сниженной энзиматической активностью, что способствует накоплению фосфорилированных метаболитов пирувата, и их перераспределению в сторону анаболических сигнальных путей, необходимых для синтеза гликогена, триглицеридов, фосфолипидов, нуклеотидов и аминокислот [322–324]. Более того, в трансформированных клетках ацетил-КоА вовлечен в усеченный цикл ТСА, что приводит к перемещению ацетил-КоА в цитоплазму, где данный фермент служит предшественником синтеза жирных кислот, холестерина и изопреноидов, в дальнейшем задействованных в процессах пролиферации и роста клеток [323].



Рисунок 4 - Изменения в метаболизме опухолевой клетки и генетические нарушения, способствующие их развитию (адаптировано из [314–323])

Также известно, что экспрессия и активность синтаз жирных кислот и холинсинтаз, регулирующих биосинтез длинноцепочечных жирных кислот и фосфатидилхолинов, повышена во многих типах опухолевых клеток [395]. В отношении регуляции метаболизма аминокислот было показано, что трансформированные клетки экспрессируют сенсоры дефицита аминокислот, в частности белки GATOR1, фолликулин и Ras-подобный белковый комплекс Rag, обладающий активностью малой ГТФазы. Данные белки контролируют поддержание уровня аминокислот, необходимого для активации пролиферативного белкового комплекса mTORC1 [327, 328]. Увеличенное потребление глутамина, заменимой аминокислоты, регулируемое за счет повышения экспрессии генов, кодирующих белки-транспортировщики SLC1A5 и SLC38A2, является ключевым процессом в повышении содержания азота в опухолевых клетках, увеличенном потреблении незаменимых аминокислот и поддержании комплекса mTORC1 в состоянии избыточной активации [330]. В подтверждении данной гипотезы у пациентов с РМЖ и раком легких неблагоприятный прогноз коррелировал с увеличением экспрессии SLC1A5 и SLC38A2 [329, 332]. Для опухолевых клеток также характерно повышение степени конверсии глутамина в глутамат, и увеличение синтеза ряда метаболических ферментов, отвечающих за биосинтез аминокислот – глутаминазы (glutaminase, GLS), фосфоглицератдегидрогеназы (phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH), и аспарагинсинтетазы (asparagine synthetase, ASNS) [384]. Более того, продукция никотинамидадениндинуклеотидфосфата-Н (NADPH) при метаболизме глюкозы через пентозо-фосфатный путь (pentose phosphate pathway, PPP) способствует защите опухолевых клеток от оксидативного или клеточного стресса, а также стимуляции синтеза жирных кислот [317, 323, 324]. В дальнейшем кислотная среда микроокружения опухоли образуется за счет гиперпродукции лактата в процессе аэробного гликолиза, что способствует инвазии опухолевых клеток и кровеносных сосудов за счет ремоделирования внеклеточного матрикса и подавления противоопухолевого иммунитета [417, 426]. Описанный выше комплекс процессов обеспечивает пролиферацию опухолевых клеток, однако многие детали в нем зависят от степени экспрессии онкогенов и генов опухолевых супрессоров, микроокружения и происхождения [415, 417]. В частности, изменения в ряде онкогенов, таких как *MYC*, *RAS*, и *BRAF*, играют существенную роль в перераспределении метаболических сигнальных путей в опухолевой клетке [415]. *MYC* регулирует на транскрипционном уровне экспрессию некоторых метаболических ферментов, вовлеченных в синтез ДНК и гликолиз – тимидилаткиназы и лактатдегидрогеназы А [345, 346]. Также *MYC* способствует изменению метаболизма жирных кислот, глутамина, пролина и нуклеиновых кислот посредством прямой или непрямой регуляции с использованием микроРНК [439]. В клетках, в которых основным патогенетическим звеном злокачественной трансформации являются нарушения экспрессии или мутации в гене *Ras*, наблюдали увеличение потребления

спермина, метаболизма фосфолипидов и аэробного гликолиза [350, 351]. Более того, с мутациями в гене *Ras* ассоциировано увеличение потребления глюкозы при раке поджелудочной железы [406]. PI3K, BRAF, и KRAS активируют сигнальный путь АКТ, что создает благоприятные условия для усиления метаболизма глюкозы, ее транспорта и гликолиза. В частности, BRAF регулирует метаболизм глюкозы и глутамина в клетках меланомы [416]. Метаболические изменения в клетке при раке легких, в частности, при немелкоклеточном раке легких, как было показано, могут быть ассоциированы с рядом генетических нарушений – мутациями в генах *KRAS*, *EGFR*, *ALK*, и *STK11* [357, 358] (Рисунок 4).

Опухолевый супрессор p53 (TP53) также вовлечен в регулирование метаболических сигнальных путей в клетке. Уровень его экспрессии повышается при повреждении ДНК или при других типах клеточного стресса, далее p53 подвергается фосфорилированию, переходит в активное состояние – подавляет экспрессию циклина В и CDC25B, запускает реализацию апоптотических программ. Однако, помимо этого, p53 также регулирует процесс гликолиза за счет активации белка - TP53-индуцируемого регулятора гликолиза и апоптоза (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*, TIGAR) [359]. TIGAR ингибирует гликолиз за счет дефосфорилирования фруктозо-2,6-бифосфата, его дальнейшей деградации и ингибирования фосфофруктокиназы 1, ключевого гликолитического фермента. Также отмечали p53-зависимое ингибирование активности других ферментов гликолиза и непосредственно подавление экспрессии белков – транспортеров глюкозы GLUT1 и GLUT4 [360, 361]. Более того, было показано, что p53 регулирует экспрессию белков, вовлеченных в поддержание стабильности митохондрий и цепи переноса электронов, тем самым влияя на процесс окислительного фосфорилирования [360, 362]. Таким образом, нарушения в p53 в опухолевых клетках не только стимулируют избыточную пролиферацию, способствуют накоплению генетических нарушений и ослабляют индукцию апоптоза, но и вызывают усиление гликолиза, обеспечивающего более благоприятные условия для дальнейшей злокачественной трансформации клетки.

Транскрипционные факторы из надсемейства ядерных рецепторов также являются регуляторами метаболических сигнальных путей в клетке. Так, рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами γ (peroxisome-proliferator-activated receptor γ , PPAR γ), со своим ко-регулятором, ко-активатором $\alpha 1$ PPAR γ (PPAR gamma co-activator 1 α , PGC1 α), контролируют функциональную активность митохондрий и процесс окисления жирных кислот. Нарушения в генах, соответствующих данным белкам, способствуют опухолевой прогрессии [364].

Лигандами классических ядерных рецепторов (ER, GR, AR, PR) являются стероиды, представляющие собой производные холестерина. Однако также стероидные гормоны могут связываться с белками, связывающимися со стерол-регуляторными элементами (sterol regulatory

element binding proteins, SREBP). Белки семейства SREBP являются факторами транскрипции, высокочувствительными к внутриклеточному уровню холестерина. Высокий внутриклеточный уровень холестерина является характерным признаком опухолевых клеток и поддерживается за счет активации SREBP-зависимых программ липогенеза [363, 365, 366, 368]. Помимо SREBP, холестерин контролирует также активацию метаболических сигнальных путей посредством образования комплекса с эстроген-зависимым рецептором α (estrogen-related receptor α , ERR α), активации данного белка и активации транскрипции генов, ассоциированных с остеогенезом, миогенезом, активацией макрофагов, а также ключевых метаболических генов [367]. Повышенный уровень экспрессии ERR α наблюдали при меланоме, РМЖ, раке яичников, остеосаркомах и аденокарциномах толстой кишки [369–372].

Глюкокортикоиды, несмотря на сходное химическое строение, преимущественно оказывают противоположный холестерину эффект на метаболические процессы в опухолевых клетках. Так, было продемонстрировано, что в клетках острого лимфобластного лейкоза GC ингибируют гликолиз посредством уменьшения потребления глюкозы [373] и подавления экспрессии пируваткиназы, ключевого фермента гликолиза [374]. Поскольку все опухолевых клетки характеризуются повышенным уровнем гликолиза и потребления глюкозы, метаболические и энергетические сигнальные пути трансформированных клеток могут быть мишенью химиотерапии с использованием GC [375]. Более того, данный эффект GC еще с одной стороны может объяснить синергизм или аддитивность совместного действия стероидов и цитотоксических противопухолевых препаратов не только при лечении злокачественных новообразований кроветворной системы, но и при остеосаркомах и раке легких [376].

Если рассматривать механизм действия GC на метаболические сигнальные пути в опухолевой клетке, то можно отметить, что данные гормоны оказывают влияние практически на каждый сигнальный путь, задействованный в регуляции метаболизма. Большую роль GC играют в регуляции метаболизма посредством увеличения экспрессии и активности основных ферментов глюконеогенеза. Стероиды также регулируют функционирование митохондрий в клетках гепатомы крыс и человека. В частности, было показано, что ключевым регулятором слияния митохондрий, процесса, усиливающего метаболическую функцию, является GC-регулируемый белок Drp1 [377]. Однако суммарный эффект GC довольно противоречив. Так, было показано, что активность сигнального пути Ras, который, помимо прочего, способен стимулировать запуск аутофагии, отрицательно регулируется GC-зависимым геном *GILZ*, что подтверждает свойства глюкокортикоидов снижать метаболическую активность в клетке [378]. В то же время было продемонстрировано, что Ras способен взаимодействовать с другим GC-регулируемым геном *SGK-1*, что приводит к активации сигнального пути Ras. Более того, Ras способен независимо от GR повышать экспрессию *SGK-1* [379]. Помимо этого, GC регулируют запуск аутофагии по Ras-

независимому пути. Было показано, что в клетках острого лимфобластного лейкоза GC вызывают смещение активности метаболических сигнальных каскадов в сторону уменьшения гликолиза и увеличения уровня аутофагии и окислительного фосфорилирования, происходящего в митохондриях, что способствует увеличению чувствительности опухолевых клеток к цитостатическим препаратам [381]. Ранее было продемонстрировано, что GC способны повышать экспрессию гена *REDD1*, ингибитора mTOR, и была выявлена корреляция между увеличением уровня *REDD1*, снижением активности mTOR и запуском аутофагии, ведущей к увеличению жизнеспособности опухолевых клеток. Это было подтверждено путем оценки эффектов GC на трансформированные лимфоциты, а также тимоциты мыши, в которых был проведен нокдаун *REDD1* методом РНК-интерференции. В полученных клеточных линиях отмечали повышение уровня GC-зависимого апоптоза, снижение ингибирования mTOR и подавление активации аутофагии [380].

В литературе описаны другие эффекты GC на метаболические сигнальные пути. В частности, было показано на клетках РМЖ, что GC стимулируют продукцию ROS по механизму, ключевым звеном которого является белок-белковое взаимодействие GR с индуцибельной синтазой оксида азота (inducible nitric oxide synthase, iNOS). Последующая активация iNOS приводит к повышению степени повреждения ДНК и, соответственно, увеличению продукции ROS [382]. На клетках лейкозов и лимфом была описана зависимость продукции ROS от экспрессии GC-регулируемого гена *GILZ*. Было показано, что *GILZ* является одним из ключевых регуляторов сигнальных путей метаболизма опухолевых клеток, локализованных в митохондриях, а его гиперэкспрессия может служить подходом к повышению ROS-зависимой цитотоксичности и увеличению эффективности химиотерапии.

Как уже было упомянуто ранее, взаимодействие GR с опухолевым супрессором p53, который также способен подавлять гликолиз за счет активации белка TIGAR или подавления экспрессии переносчиков глюкозы GLUT1 и GLUT2, может приводить либо к кооперативному действию данных белков, либо к антагонистическому [83, 87]. Соответственно, p53-опосредованный эффект GC на указанные метаболические гены также зависит от физиологических условий и микроокружения опухоли, и может как способствовать их выживанию, так и стимулировать подавление гликолиза, снижение энергетических запасов клетки и ее гибели. Здесь необходимо отметить, что схожий вывод можно сделать в отношении любого сигнального пути, регулируемого GC, с одной стороны, и отвечающим за метаболизм в опухолевой клетке, с другой стороны. Ряд метаболических эффектов, ведущих к повышению жизнеспособности опухолевой клетки, связан с GC-индуцированными генами *REDD1*, *SGK1* и др., в связи с чем представляется перспективным использование селективных ингибиторов данных генов или же общее снижение геномных эффектов GR с помощью SEGRA.

1.2.9. Подавление противоопухолевого иммунитета и эффекты глюкокортикоидов на этот процесс

Опухолевые клетки в ходе злокачественной трансформации приобретают ряд специфических антигенов, которые вызывают иммунный ответ, что приводит к подавлению опухолевого роста [383]. Основную роль в гибели опухолевых клеток, опосредованной активацией иммунной системы, играют CD8-позитивные Т-лимфоциты, которые распознают специфические опухолевые антигены [384, 385]. Процесс начинается с гибели единичной опухолевой клетки при действии клеток-натуральных киллеров (NK-клеток), выброса клеточного дебриса, содержащего опухолевые антигены в пространство, формирующее микроокружение опухоли, и его фагоцитоза дендритными клетками. После миграции дендритных клеток в лимфатические узлы происходит представление антигена CD8+ Т-лимфоцитам и их инициация – сенсibilизация к опухоль-специфическим антигенам. Сенсibilизированные CD8+ Т-лимфоциты способны узнавать антигены опухолевых клеток и экспрессировать ряд цитокинов (перфорин, TNF- β , IFN- γ) и проапоптотических белков. В зависимости от их соотношения происходит либо некроз, либо апоптоз опухолевых клеток. NK-клетки также способны выделять TNF- β и IFN- γ , свой вклад вносят и макрофаги, в которых повышается экспрессия TNF- α и IFN- α [386, 387].

Однако известно, что иммунная система также способна стимулировать прогрессию опухоли [388]. В частности, было показано, что в результате прогрессии опухоли формируются новые клоны опухолевых клеток, не имеющие специфических опухолевых антигенов и не распознающиеся Т-лимфоцитами. Снижение экспрессии опухолевых антигенов на поверхности трансформированной клетки может быть результатом процесса селекции, в процессе не происходит образования комплекса антигенов опухоли с белками главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС). Также факторами, влияющими на снижение противоопухолевого иммунитета, могут быть уменьшение экспрессии МНС-I и нарушения непосредственно в белках-антигенах [389].

Другим ключевым звеном в снижении противоопухолевого иммунитета является хроническая стимуляция CD8+ Т-лимфоцитов. Она приводит к снижению их популяции и активности, а также повышению экспрессии рецепторов CTLA-4 и PD-1, которые ингибируют активность цитотоксических Т-лимфоцитов [390, 391]. Одновременно с данным процессом в опухолевых клетках увеличивается выработка цитотоксичных для Т-лимфоцитов цитокинов TGF- β и IL-10 [392, 393] и хемокинов, таких как CCLs, CXCLs и VEGF, за счет чего к очагу опухолевого роста привлекаются Т-супрессоры (Treg), супрессоры миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells, MDSC), макрофаги и нейтрофилы, ассоциированные с опухолью

(tumor-associated macrophages, TAM, tumor-associated neutrophils, TAN) [394–398]. MDSC характеризуются продукцией аргиназы (arginase, Arg), индуцибельной синтазы оксида азота (inducible nitric oxide synthase, iNOS) и идоламин-2,3-диоксигеназы (idoamine 2,3-dioxygenase, IDO1), которые приводят к деградации питательных веществ и аминокислот во внеклеточном пространстве, тем самым подавляя функциональную активность цитотоксических Т-лимфоцитов [399–401]. Макрофаги обладают свойством функциональной пластичности и могут быть активированы по противоопухолевому фенотипу M1 или по опухоль-ассоциированному фенотипу M2, в зависимости от профиля экспрессии цитокинов и присутствия других факторов в микроокружении опухоли [402]. Макрофаги M1 или классически активированные макрофаги, характеризуются экспрессией бактерицидных молекул и рецепторов [403]. Подобный фенотип макрофаги приобретают в ответ на эндогенные воспалительные стимулы, такие как Th1-ассоциированный цитокин, INF γ , или экзогенные воспалительные стимулы, например липополисахарид и другие бактериальные продукты. M1 стимулируют воспалительные реакции посредством секреции провоспалительных цитокинов. M2, или альтернативно активированные макрофаги, характеризуются экспрессией специфичных рецепторов, например макрофагального маннозного рецептора, CD163 и hMARCO, регулируются экспрессией Th2-ассоциированных цитокинов и хемокинов, например антагониста рецептора IL-1 (IL-1RA) или AMAC-1, и продукцией компонентов внеклеточного матрикса и ферментов для его перестройки (фибронектин, тенасцин С, MMP-12) [404]. TAM представляют собой популяцию макрофагов фенотипа M2 и экспрессируют IL-4 и IL-10, способствующих гибели цитотоксических Т-лимфоцитов [393, 405].

Помимо этого, неблагоприятными для противоопухолевого иммунного ответа являются изменения в микроокружении опухоли, включающие в себя гипоксию, локальное повышение кислотности и нарушения в метаболической системе клетки. В разделе 2.8 описаны основные метаболические изменения, включающие в себя усиление метаболизма жирных кислот, синтеза нуклеотидов, увеличение потребления глутамина, а также повышение степени гликолиза как в анаэробных, так и аэробных условиях, что приводит к стабилизации HIF-1 и его накоплению в опухолевых клетках [406, 407]. Совместно с рядом факторов транскрипции, онкогенов или опухолевых супрессоров HIF-1 индуцирует экспрессию гликолитических генов и генов супрессоров циклов Кребса и ТСА, таких как GLUT-1, гексокиназа 2 (hexokinase 2, HK2), 6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бифосфатаза 3 (6-phosphofruco-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3), и РКМ2 [408]. Это ведет к накоплению в клетке лактата и протонов, что вызывает снижение внутриклеточного и внеклеточного рН и, в дальнейшем, к снижению пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов и продукции ими противоопухолевых цитокинов [409].

Применение GC тесно связано с изменениями в иммунной системе. Практически все клетки иммунной системы чувствительны к иммуносупрессивному и противовоспалительному действию глюкокортикоидов. В таблице 3 представлены эффекты GC на основные клетки иммунной системы.

Таблица 3 - Эффекты GC на клетки иммунной системы

Клетки иммунной системы	Эффект GC	Литература
Нейтрофилы	Увеличение жизнеспособности клеток, и их аккумуляция в зонах воспаления	[410, 411, 413]
Базофилы	Индукция апоптоза, быстрое ингибирование активации клеток по механизму транс-репрессии	[412, 414]
Эозинофилы	Нет данных	
Дендритные клетки	Подавление дифференцировки клеток, снижение способности сенсibilизировать Т-лимфоциты, увеличение эндоцитоза, индукция апоптоза, подавление экспрессии провоспалительных цитокинов, ингибирование миграции клеток	[415, 416]
Макрофаги	Активация сигнальных путей JNK и p38-MAPK, снижение экспрессии провоспалительных цитокинов, подавление контактной чувствительности	[417]
Тучные клетки	Подавление активности сигнального пути FcεRI (рецептора к Fc домену иммуноглобулина E), снижение высвобождения гистамина и кальция, увеличение экспрессии фосфатаз (DUSP1)	[418]
Т-лимфоциты	Индукция апоптоза, подавление высвобождения провоспалительных цитокинов, ингибирование активности LCK и Fyn по механизму транс-репрессии, быстрое фосфорилирование ZAP70	[74, 89, 419, 420]
В-лимфоциты	Индукция апоптоза, повышение продукции иммуноглобулинов, подавление активации, пролиферации и дифференцировки клеток	[421–423]

В клетках злокачественных новообразований кроветворной системы индукция апоптоза в Т- и В-лимфоцитах является основой цитотоксического действия GC. Однако в клетках солидных опухолей эффекты GC не так линейны. В разделе 2.8 было рассмотрено влияние GC на метаболизм опухолевой клетки: в определенных условиях угнетение гликолиза и стимуляция глюконеогенеза приводят к нормализации метаболического профиля опухолевой клетки, снижению степени кислотности в зоне опухолевого роста и увеличению жизнеспособности Т-лимфоцитов. В отношении влияния GC на клетки иммунной системы следует отметить, что их эффект зависит от типа опухолевых клеток и степени их злокачественности, микроокружения опухоли, типа иммунных клеток и их дальнейшей функциональной активности. Так, активация макрофагов, как уже упоминали ранее, может проходить по двух механизмам: классическому механизму с образование активированных макрофагов M1 или по альтернативному механизму активации с формированием у макрофагов фенотипа M2. Было показано, что альтернативную активацию M2 запускают цитокины, продуцируемые Т-хелперами 2 типа - IL-4, IL-13 и IL-10, а также противовоспалительными медиаторами, такими как GC [424–426]. Макрофаги, активированные по пути M2, способны вносить свой вклад в прогрессию опухоли, в частности, стимулировать неоангиогенез за счет повышения экспрессии цитокинов и матриксных металлопротеиназ, а также ремоделировать микроокружение опухоли за счет активации системы плазминогена, что делает внеклеточный матрикс более рыхлым и позволяющим клеткам мигрировать [427, 428]. Именно макрофаги M2 относят к макрофагам, ассоциированным с опухолью. Они оказывают промотирующее действие на опухоль и применение глюкокортикоидов способствует этому. Однако более подробное исследование функциональной активности макрофагов M2 показало, что существуют значительные отличия между эффектами макрофагов M2, активированных GC и активированных IL-4. Было продемонстрировано, что макрофаги, активированные GC, обладают увеличенной способностью к фагоцитозу и эндоцитозу, а экспрессия MMP и ремоделирование внеклеточного матрикса снижается [426]. Описана активация сигнального пути трансформирующего ростового фактора β (transforming growth factor β , TGF β), экспрессия рецептора к которому, TGF- β RII, положительно регулируется глюкокортикоидами. Увеличение экспрессии TGF- β RII на поверхности макрофагов повышает проницаемость цитоплазматической мембраны и активирует TGF β . В свою очередь TGF β способен стимулировать прогрессию опухоли, так и выполнять функцию опухолевого супрессора. На ранних стадиях заболевания TGF β вызывает остановку клеточного цикла и индуцирует апоптоз [430]. В высокозлокачественных инвазивных опухолях TGF β , в том числе активированный GC, подавляет иммунный ответ организма и стимулирует ангиогенез, что стимулирует дальнейшую злокачественную трансформацию и инвазию [430].

В литературе описано влияние GC на MDSC, также являющихся эффекторными клетками противоопухолевого иммунитета наряду с TAM: было продемонстрировано, что нарушения активности GR в этих клетках приводят к более активному их функционированию и, соответственно, стимуляции опухолевой прогрессии. Далее было показано, что применение GC подавляет функциональную активность MDSC. Данный процесс реализуется посредством GR-опосредованного снижения экспрессии HIF-1 и соответствующего угнетения гликолиза, а также за счет подавления экспрессии гена вырабатываемой MDSC индуцибельной синтазы оксида азота iNOS, способствующую уменьшению жизнеспособности цитотоксических Т-лимфоцитов [429].

Регуляторные Т-клетки (Treg), способные ингибировать активацию цитотоксических Т-лимфоцитов дендритными клетками, характеризуются экспрессией GC-индуцируемого рецептора фактора некроза опухоли (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, GITR или TNFRSF18) [431]. GITR принадлежит к суперсемейству факторов некроза опухоли и впервые был идентифицирован как GR-регулируемый ген в клеточной линии мышинной гибридомы [432]. В ряде исследований было показано, что повышение активности GITR стимулирует активацию Treg [433–439]. В меньшей степени GITR экспрессируют макрофаги, В-лимфоциты и НК-клетки, а экспрессия GITR-специфичного лиганда (GITRL) представлена в дендритных клетках и В-лимфоцитах [431]. Активация GITR глюкокортикоидами, как было показано, запускает каскад реакций, включающих в себя увеличение транскрипционной активности NF- κ B и подавлению экспрессии Fas/FasL, и приводящих к ингибированию апоптоза в клетках Treg [440]. Таким образом, GC могут увеличивать жизнеспособность клеток Treg и снижать развитие противоопухолевого иммунного ответа.

Как видно из анализа литературных данных, приведенных выше, эффекты GC на противоопухолевый иммунный ответ могут способствовать как элиминации опухоли из организма, так и стимуляции опухолевой прогрессии. Возможны оба варианта развития событий, во многом эффекты GC зависят от микроокружения. Наиболее варибельным фактором является GC-зависимая индукция экспрессии генов, которая может приводить как к благоприятным, так и неблагоприятным последствиям. В связи с этим, подавление транс-активационной ветви механизма действия GC позволит сделать спектр действия данных препаратов более определенным и направленным в сторону повышения терапевтического действия.

1.3. Современные подходы к избирательной активации глюкокортикоидного рецептора в терапии злокачественных новообразований

Терапия ГС является эффективным лечением для множества патологических состояний: злокачественных новообразований, аутоиммунных заболеваний, аллергий, воспалительных процессов и др. Побочные эффекты ГС также хорошо известны и описаны во многих литературных источниках. Развитие осложнений после применения стероидов, с одной стороны, вызывает критическое отношение к такого рода терапии. Однако в клинической практике невозможно отказаться от терапии с использованием ГС только из-за риска развития побочных эффектов, поскольку многие острые проявления заболеваний купируются только немедленным введением стероидов. С другой стороны, некорректно использовать ГС для облегчения симптомов тогда, когда это не указано в протоколе терапии, или же использовать стероиды в более высоких дозах или в течение более длительного времени, чем того требует лечение. Соответственно, поиск способов повышения терапевтического индекса, соотношения между эффективностью и побочными эффектами, является актуальной задачей современной медицины. В настоящее время существует три подхода к повышению терапевтического индекса ГС:

1. Оптимизация существующих протоколов и рекомендаций по использованию препаратов стероидного ряда (исследование эффективности сниженных доз, изменение частоты введения)
2. Разработка новых лигандов ГС
3. Исследование действия ГС в комбинации с другими препаратами, снижающими побочные эффекты ГС или позволяющие снизить дозу стероидов без ущерба терапевтическому действию.

1.3.1. Лиганды глюкокортикоидного рецептора, используемые в терапии или изучаемые в качестве перспективных новых средств

1.3.1.1. Классические агонисты и антагонисты глюкокортикоидного рецептора

Синтетические ГС классифицируют по ряду признаков. Так, была проанализирована длительность действия данных гормонов, по способности разовой дозы конкретного лекарственного средства угнетать адренокортикотропный гормон, активизирующийся практически при всех патологических состояниях. По результатам данного анализа ГС были разделены на три типа:

- 1) короткодействующие — подавляют активность АСТН на срок чуть более суток (гидрокортизон, кортизон, преднизолон, метипред);
- 2) средней продолжительности — срок действия приблизительно 2 суток (триамцинолон, полькортолон);

3) препараты длительного действия — эффект сохраняется дольше 48 часов (бетаметазон, дексаметазон).

Эффективность GC коррелирует с их аффинностью к рецептору: дексаметазон>преднизолон>гидрокортизон [441]. Ранее был описан селективный лиганд GR, дефлазакорт, для которого наблюдалось изменение терапевтического индекса в сторону увеличения эффективности и уменьшения побочных эффектов *in vitro*. Однако клинические испытания показали его меньшую противовоспалительную эффективность по сравнению с дексаметазоном.

В отличие от агонистов, которые активируют GR, антагонисты ингибируют его активность. Они также влияют на структуру рецептора, стабилизируя его, и конкурируют с эндогенными стероидами за связывание с GR. Наибольшее распространение антагонисты GR получили в терапии заболеваний, при которых уровень эндогенного HCS ухудшает прогноз заболевания, в частности при синдроме Иценко-Кушинга. Следует отметить, что полная блокировка GR может привести к развитию болезни Аддисона, поэтому необходим тщательный подбор дозировки препарата. Известные лиганды GR, RU486 и ZK98299, являются его неселективными антагонистами, ингибирующими также прогестероновый рецептор. В частности, RU486, известный также как Мифепристон, используется для медикаментозных абортов. В литературе также описывается ряд селективных нестероидных антагонистов GR, которые препятствуют ядерной транслокации рецептора и его связыванию с ДНК в культивируемых клетках, а также ингибируют рецептор *in vivo* [441–443].

1.3.1.2. Модифицированные глюкокортикоиды

Существуют несколько видов модификации лекарственных средств, в том числе и стероидов. Они включают в себя как изменение химической структуры активного соединения, так и изменение лекарственной формы и типа доставки, а также комбинирования GC с другими препаратами. Ниже приведены несколько примеров модифицированных стероидов, получивших распространение в клинической практике.

Модифицированный преднизолон (преднизолон пролонгированного действия)

Модифицированный преднизолон представляет собой оптимизированную лекарственную таблетированную форму преднизолона, состоящую из активного центра, содержащего непосредственно гормон, и инертной оболочки [444, 445]. Инертная оболочка в течение приблизительно 4 ч абсорбирует жидкость, находящуюся в ЖКТ, и затем распадается с высвобождением преднизолона. Данная лекарственная форма позволяет запрограммировать высвобождение гормона в оптимальное время для эффекта на активность провоспалительных и пропролиферативных цитокинов [444, 445]. Исследование преднизолон пролонгированного

действия у 288 пациентов с ревматоидным артритом показало, что модифицированный преднизолон более клинически эффективен. У пациентов наблюдали снижение остроты симптомов заболевания, отмечали удобство контроля действия препарата в клинике, снижение утренней тугоподвижности суставов. В крови пациентов наблюдали снижение уровня провоспалительного цитокина IL-6. Однако риск развития побочных эффектов оставался неизменным по сравнению с преднизолоном немедленного действия [507].

«Мягкие» стероиды

Как альтернативный подход для достижения более избирательного действия GR рассматриваются методы селективного накопления препарата в пораженных органах и тканях. При этом подходе препарат концентрируется только в очаге заболевания при минимальном содержании в остальном организме. Примером такого соединения может служить пропионат флутиказона, обладающим сильным воздействием на легкие, и в то же время сниженным системным воздействием на организм. Применение этого препарата при лечении астмы позволило увеличить эффективность терапии и существенно уменьшить побочные эффекты [441]. Более того, был проведен синтез аналогов пропионата флутиказона, и одно из полученных соединений, GW870086, показало более высокую терапевтическую эффективность по сравнению с флутиказоном. Было продемонстрировано, что GW870086 подавляет синтез провоспалительных цитокинов в эпителии легких аналогично пропионату флутиказона, но также подавляет запуск механизма транс-активации, как было показано *in vitro* в люциферазном репортерном тесте. В отличие от флутиказона, GW870086 не нарушает целостности плотных контактов в эпителии легких. На моделях контактного дерматита и овальбумин-индуцированного аллергического воспаления наблюдали значительный противовоспалительный эффект данного соединения, сравнимый с эффектами пропионата флутиказона [449, 450]. В настоящее время препарата проходят клинические испытания в качестве противоастматического агента [451].

Липосомная форма GC

Липосомная форма доставки GC является довольно интересным подходом к повышению терапевтического индекса стероидов. Принцип действия такой лекарственной формы заключается в загрузке липосом глюкокортикоидами и обеспечения направленной доставки к органу-мишени. В частности, липосомы, загруженные дексаметазоном, были эффективны при испытаниях *in vivo* на модели коллаген-индуцированного артрита (collagen-induced arthritis, CIA) и антиген-индуцированного артрита (antigen-induced arthritis, AIA) у мышей, причем негативного влияния по сравнению с эффектами стандартной лекарственной формы дексаметазона на систему НРА отмечено не было [452, 453]. Другим примером может служить использование более стабильных при циркуляции в кровотоке липосом, покрытых полиэтиленгликолем (ПЭГ).

Применение таких липосом у пациентов с ревматоидным артритом приводило к более быстрому и яркому выраженному снижению остроты течения заболевания [454]. Отдельные группы исследователей показали, что стероиды, включенные в липосомы, способны более эффективно достигать очага воспаления, что позволяет снизить используемые дозы гормонов. Было продемонстрировано *in vivo* и *in vitro*, что при одинаковой эффективности липосомальных препаратов и стандартных оральных стероидов без оболочки у первых менее выражены побочные эффекты [441].

Комбинация преднизолона и дипиридамола

Дипиридамол является противотромбозным препаратом, способным также подавлять высвобождение провоспалительных цитокинов и демонстрирующим противовоспалительную активность на моделях острого и хронического воспаления. В комбинации с дипиридамолом использовали суб-терапевтическую дозу преднизолона для терапии 259 пациентов с ревматоидным артритом. Лекарственная форма, состоящая из преднизолона и дипиридамола, проявила более выраженное терапевтическое действие по сравнению с каждым из компонентов индивидуально [455].

Нитростероиды

Нитростероиды, конъюгированные с оксидом азота (II), *in vivo* быстро распадаются с высвобождением обоих активных компонентов. Оксид азота (II) проявляет противовоспалительные эффекты, включающих в себя уменьшение адгезии лейкоцитов, снижение продукции провоспалительных цитокинов [456]. Так, для одного соединения подобного рода, 21-NO-преднизолона, было показано повышение противовоспалительных свойств и снижение побочных эффектов по сравнению со стандартной лекарственной формой преднизолона. В частности, данный препарат проявил более выраженный эффект на модели CIA, однако не вызывал активации первичных остеокластов на модели костной резорбции *in vitro* [457]. Однако в дальнейшем эта работа не получила продолжения.

Использование мембрано-связанного GR в качестве мишени

Мембрано-связанный GR (mGR) находится в клетке в малых количествах и поддается идентификации только с помощью иммунофлуоресценции высокого разрешения. Повышение содержания mGR наблюдают в моноцитах после вакцинации, а также в моноцитах и В-лимфоцитах пациентов с болезнью Бехтерева. Снижение уровня mGR, в свою очередь, отмечалось у больных с системной красной волчанкой. Ген GR у человека кодирует как цитоплазматическую форму GR, так и mGR, и обе формы рецептора обладают одинаковой функциональной активностью. Таким образом, конструирование препарата, специфически взаимодействующего с mGR, может быть еще одной из альтернатив стандартным лекарственным формам стероидов [25].

1.3.1.3. Селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора

Гипотеза о том, что транс-активация опосредует большую часть побочных эффектов GC, в то время как транс-репрессия отвечает за реализацию терапевтического иммуномодулирующего, противовоспалительного и противоопухолевого действия, является во многом спорной, поскольку при транс-активации часто происходит индукция транскрипции генов, белковые продукты которых отвечают за противовоспалительное действие [18, 452, 462]. В то же время было показано *in vitro* и *in vivo*, что подавление степени димеризации GR приводит к снижению активации транскрипции, в то время как снижение активности факторов транскрипции AP-1 и NF- κ B сохранялось на прежнем уровне [78]. Более того, наблюдали ингибирование образования костной ткани [466]. Тем не менее, данная теория о разделении механизмов действия GR привела к разработке препаратов класса селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), способных запускать только механизм транс-репрессии [467]. Самые первые препараты данного класса избирательно запускали транс-реессию *in vitro*, однако не проявляли активности *in vivo*. В частности, было продемонстрировано, что три соединения стероидной структуры, RU24858, RU40066 и RU24782, способны связывать GR и запускать транс-реессию на уровне, сравнимом со стандартными GC [468].

Первыми функционально активными SEGRA являлись соединения ZK245186 и AL-438, свойства которых были проанализированы и в большом количестве тестов *in vitro*, и на моделях грызунов *in vivo*. Ряд исследований на клеточных культурах показал, что молекулы данных препаратов связываются с GR с аффинностью, близкой по значению к аффинности дексаметазона, и эффективно подавляют экспрессию генов медиаторов воспаления, таких как IL-1, IL-2, IL-8, простагландин-E2 и E-селектин [469]. *In vivo* было показано, что данные молекулы обладают противовоспалительными свойствами, сравнимыми со свойствами дексаметазона, при местном кожном применении, а также способны снижать секрецию провоспалительных цитокинов и подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов. На модели воспаления у крыс также было подтверждено снижение степени развития побочных эффектов [470]. В дальнейшем данную субстанцию исследовали под названием Мапракорат или BOL-303242-X [471–474]. В настоящее время завершается исследование мапракората в качестве противовоспалительных капель для глаз [475].

Другое соединение класса SEGRA, соединение PF-04171327 или фосдагрокорат, также в настоящее время находится в клинических исследованиях. По сравнению с преднизолоном, для него была продемонстрирована более высокая противовоспалительная активность и сниженные побочные эффекты (в том числе, отсутствие нарушений в метаболизме глюкозы и формировании костной ткани) в ряде тестов *in vitro* и *in vivo* [476]. Его эффективность и безопасность были

подтверждены в клинических исследованиях у пациентов с ревматоидным артритом [477]. Проводятся исследования производных PF-04171327, которые также демонстрируют эффекты SEGRA *in vitro* [478].

Клинические испытания в качестве средства для терапии хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) проходит также и высокоаффинный нестероидный модулятор GR, AZD5423. Данное соединение было получено в результате отбора активного сульфаниламидного предшественника из химической библиотеки фармацевтической компании AstraZeneca методом высокопроизводительного скрининга (HTS) и дальнейшей оптимизации структуры молекулы для повышения аффинности к GR [479]. В клинических испытаниях AZD5423 как препарата для терапии аллергической астмы средней степени тяжести была показана его эффективность, а также снижение индуцированных аллергенами побочных эффектов по сравнению с глюкокортикоидом будесонидом [481]. В настоящее время исследуют возможное применение данного препарата для лечения ХОБЛ [451].

Помимо поиска синтетических аналогов GC с «диссоциированными» свойствами были предприняты попытки по исследованию природных соединений с подобными свойствами. Так, в 2003 г было описано соединение 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид, или CpdA, более стабильный аналог предшественника азиридина, выделенный из африканского растения *Salsola tuberculatiformis* Botschantzev семейства Амарантовых [480]. Свойства CpdA за последние 15 лет изучали довольно широко, в том числе и в нашей лаборатории. История его открытия, основные противовоспалительные и противоопухолевые эффекты, а также их предполагаемые механизмы более подробно описаны в следующем разделе 3.1.2.

Еще одним потенциальным SEGRA является экстракт медицинского растения трехкрыльника Вильфорда *Tripterygium wilfordii* Hook F (*TwHF*) семейства Бересклетовых, который использовался в Китае в течение нескольких столетий как противовоспалительное средство. Основными активными компонентами экстракта данного растения являются дитерпены триптолид и трипдиолид, которые, как было высказано предположение, связываются с GR [482]. Как было показано, комплекс, образующийся при инкубации GR с экстрактом, в отличие от комплекса GR с дексаметазоном, не вызывал усиления транскрипции генов, содержащих глюкокортикоид-респонсивные элементы, однако был эффективен при ингибировании ядерных провоспалительных факторов, таких как NF-κB. Было проведено клиническое исследование свойств экстракта TwHF у 121 пациента с ревматоидным артритом в сравнении с противовоспалительным препаратом сульфазалазином. У пациентов, принимавших экстракт TwHF, наблюдали снижение остроты проявления заболевания [484]. В дальнейшем, для одного из дитерпенов, Кесальпинина M2 (C-M2), было продемонстрировано связывание с GR, а также избирательный запуск транс-репрессии на модели экспериментального колита [483]

Таким образом, стандартные GC по-прежнему остаются первой линии терапии воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Тем не менее, существует ряд альтернатив с уже клинически доказанными преимуществами перед стероидами: от новых лекарственных форм и комбинаций с другими препаратами к синтезу или выделению соединений нестероидной структуры с заданными свойствами. Успешная разработка таких препаратов зависит от знаний молекулярных механизмов действия GC на активацию определенных сигнальных каскадов в клетках патологического типа у пациентов и нормальных клетках, а также взаимодействия между компонентами данных сигнальных путей. Поскольку с каждым годом в мировом научном сообществе накапливается все большее количество данных о механизмах активации GR различными лигандами, текущие исследования имеют большой потенциал в плане получения клинически одобренного препарата – аналога GC со сниженными побочными эффектами.

1.3.1.4. Механизмы действия селективного агониста глюкокортикоидного рецептора, CpdA

История открытия

Compound A (CpdA) представляет собой SEGRA нестероидной структуры, являющийся стабильным синтетическим аналогом природного соединения, выделенного из африканского кустарника *Salsola tuberculatiformis* Botschantzev (Рисунок 5). В данном разделе будет рассмотрена нетривиальная история открытия CpdA и его биологические свойства по сравнению с другими GC.

Кустарники, относящиеся к роду *Salsola* (семейство Chenopodiaceae), были обнаружены в пустынных и полупустынных областях нашей планеты, причем более 60 различных видов *Salsola* были найдены в Намибии и Южно-Африканской Республике (ЮАР) [485]. Первое упоминание о данном растении появилось в фольклоре племени бушменов, которые использовали выделенные экстракты *Salsola* в медицинских целях, в частности, как женские оральные контрацептивы [466]. После ряда исследований кустарников рода *Salsola* было подтверждено, что по крайней мере один из видов данного кустарника содержит одно или несколько соединений, обладающих контрацептивными свойствами. Однако установить химическую природу этих соединений было затруднительно в течение многих лет.

В 1961 г. у каракульских овец в регионе Китмансхуп в Намибии был впервые описан редкий, спонтанной возникающий синдром прологированной беременности [486]. Впоследствии было показано, что с развитием данного синдрома связан выпас овец на пастбищах с преобладанием кустарника *Salsola tuberculata*, позже переименованного в *Salsola tuberculatiformis* Botschantzev [487, 488]. Далее, при попытке стабилизации лабильных соединений, содержащихся в экстракте, было показано, что обработка данного экстракта из

данного кустарника триметиламмонийхлоридом ацетилгидраза (Т-реагент Жирара), используемым для выделения альдегидов и кетонов, приводит к потере контрацептивных свойств [489, 491]. Образующиеся производные были выделены при помощи смеси растворителей и затем подвергнуты кислотному разложению, что привело к образованию соединений, представленных на рис. (Рисунок 5А–1С). Данные соединения были идентифицированы методом спектроскопии с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР): соединение, представленное на рисунке 5А, являлось 4-гидроксиацетофенон, соединение на рисунке 5В представляло собой 4-гидрокси-3-метоксиацетофенон, соединение на рис. Fig. 1С соответствовало 4-гидроксibenзальдегиду [491]. Несмотря на то, что синтетические аналоги обоих кетонов проявили определенную биологическую активность при применении у крыс, ни один из них, ни смесь обоих соединений не воспроизвели контрацептивную активность общего экстракта. Альдегид, представленный на рисунке 5С, был неактивен. В дальнейших экспериментах без участия дериватирующих реагентов было выделено чистое вещество другой природы, также присутствующее в активной фракции. Данное соединение было идентифицировано с помощью масс-спектрометрии, ЯМР- и УФ-спектроскопии как 1-(4-гидроксифенил)-2-метилэтилоэтанол или синефрин (Рисунок 5D). Структура выделенного соединения была также подтверждена путем спектроскопического сравнения с синтетическими соединениями, а также путем получения ацилированных производных как природного вещества, так и синтетических соединений. Однако синтезированный синефрин не проявил биологической активности, подобной эффектам растительного экстракта.

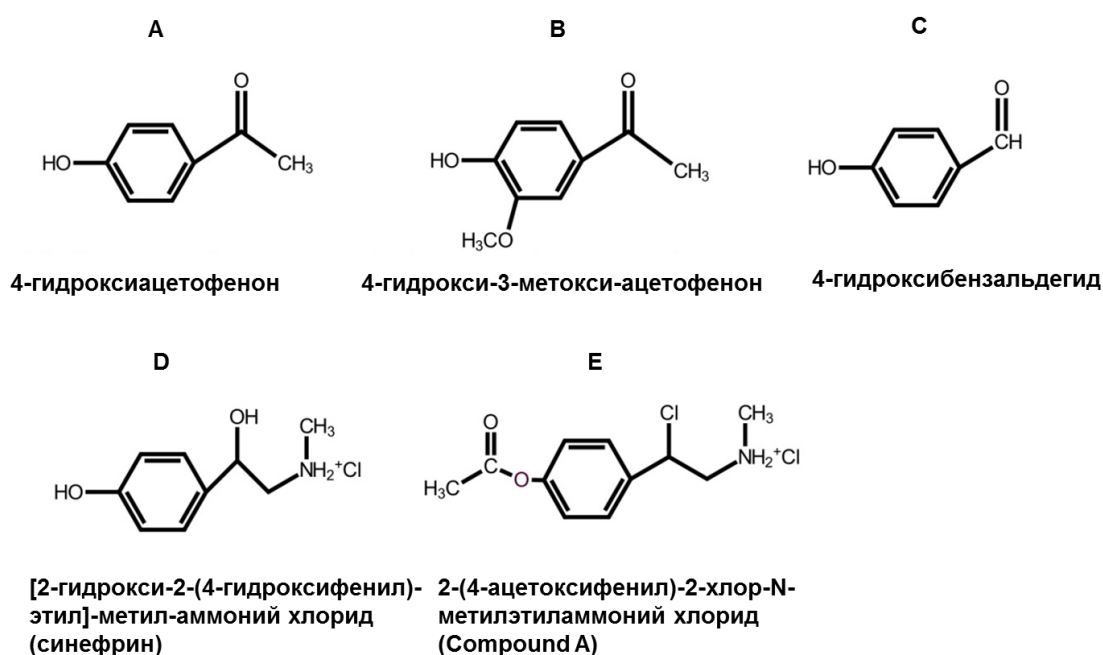


Рисунок 5 - Структура соединений, выделенных из *S. tuberculatiformis* (A-D), и их синтетический аналог Compound A (E)

Полученные данные свидетельствовали о том, что активные соединения-предшественники, содержащиеся в экстракте *Salsola*, представляют собой соединения фенольного ряда с лабильными функциональными группами. Было высказано предположение, что в ходе тестирования биологических свойств лабильная функциональная группа разлагается с образованием альдегидов, кетонов и спиртов, и необходим более быстрый и более чувствительный тест для оценки биологических свойств экстракта или его отдельных фракций. Была разработана тест-система, основанная на интерференции спектров тестируемого вещества со спектром цитохром Р450-зависимой 11 β -гидроксилазы (CYP11B1), стероида, вырабатываемого надпочечниками и катализирующего биосинтез HCS и кортикостерона из дезоксигидрокортизона и дезоксикортикостерона [490, 492–494]. При помощи данного метода было выделено одно соединение S2, анализ химической структуры методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии показал наличие нестабильного соединения азиридина, после чего был синтезирован более стабильный предшественник азиридина, Compound A (CpdA, Рисунок 5E) [493]. Было показано, что CpdA, подобно высушенному растительному экстракту, обладает контрацептивным действием у крыс [494] и взаимодействует с двумя GC-связывающими белками CYP11B1 и CBG в плазме, а также способен конкурировать с GC за связывание с CBG [495]. На основании этого была высказана гипотеза, что CpdA взаимодействует также и с GR, хорошо изученным фактором транскрипции [496–498].

Эта гипотеза была подтверждена в ряде исследований. В частности, методом конкурентного связывания было продемонстрировано, что в клетках грызунов и человека, экспрессирующих эндогенный GR, CpdA связывается с рецептором с высокой аффинностью, при лежащей в наномолярном диапазоне IC₅₀ [48, 499, 500]. Были изучены эффекты CpdA на основные стадии активации GR: фосфорилирование, димеризацию, ядерную транслокацию и связывание рецептора с ДНК. Было показано, что в фибробластах и эпителиальных клетках, экспрессирующих эндогенный или экзогенный GR, CpdA слабо индуцирует перемещение GR в ядро [48, 500]. С использованием различных методов и подходов, включая флуоресцентный индуктивно-резонансный перенос энергии (fluorescence resonance energy transfer, FRET), было продемонстрировано, что CpdA в отличие от GC не вызывает димеризацию рецептора [48, 499–501]. Более того, CpdA не индуцирует фосфорилирование GR по остатку серина Ser211, что является ключевой стадией для запуска механизма транс-активации [500]. Соответственно, CpdA не вызывает значительного влияния или даже ингибирует конститутивное и GC-опосредованное связывание рецептора с ДНК и запуск экспрессии эндогенных GR-зависимых генов [48, 499, 500]. В то же время CpdA и GC оказывают схожее действие на механизм GR-зависимой транс-репрессии, подавляя активность большого количества пропролиферативных и

антиапоптотических факторов транскрипции. Было продемонстрировано, что СpdA, в зависимости от типа клеток, снижает активность факторов транскрипции NF-κB, AP-1, Ets-1, Elk-1, SRF, NFATc [48, 500]. Реализация эффектов СpdA через сигнальный путь GR была подтверждена с использованием нокдауна GR в исследуемых клетках [48, 500]. Необходимо отметить, что по сравнению с GC, которые не препятствуют перемещению транскрипционных факторов в ядро, СpdA в значительной степени замедляет ядерную транслокацию [48, 502]

Сравнительный анализ интегральных эффектов СpdA и глюкокортикоидов был проведен с использованием ДНК-микрочипов в клетках аденокарциномы легких A549, экспрессирующих эндогенный GR, и клетках рака предстательной железы LNCaP-GR, стабильно экспрессирующих экзогенный GR. В обоих случаях наблюдали значительное различие между профилем экспрессии транс-активационных генов после обработки клеток дексаметазоном или СpdA. В частности, СpdA активировал только 7% генов, индуцируемых Dex. В то же время эффекты GC и СpdA на транс-репрессорный механизм были гораздо более схожи: СpdA подавлял экспрессию 66% генов, отрицательно регулируемых Dex в клетках рака предстательной железы LNCaP-GR, и 32% генов в клетках аденокарциномы легкого A549 [503]. В целом, был подтвержден тот факт, что интегрально СpdA обладает способностью селективно запускать механизм GR-зависимой транс-репрессии.

В дополнение к способности селективно модулировать функциональную активность GR, СpdA также способен действовать как антагонист андрогенового рецептора (AR). Несмотря на то, что СpdA обладает значительно более низкой аффинностью к AR, чем активные андрогены, СpdA вызывает перемещение AR в ядро в значительной степени [48, 504]. Было продемонстрировано, что СpdA подавляет критическое для функционирования рецептора взаимодействие между N- и C-концевыми доменами AR, и снижает как базальную активность AR, так и активность, индуцированную дигидротестостероном (DHT), что было показано в тесте на связывание рецептора с ДНК, а также в люциферазном репортерном тесте [48, 504]. Данные результаты свидетельствуют о том, что взаимодействие между СpdA и AR очень схоже с эффектами известных хорошо изученных анти-андрогенов, таких как Касодекс. В отношении других рецепторов стероидных гормонов было показано, что СpdA существенно не влияет на функциональную активность минералокортикоидного, прогестеронового и эстрогенового рецепторов [499, 500].

1.3.1.5. Перспективы использования СpdА в клинической практике

В литературе достаточно подробно описана роль транс-репрессии GR в противовоспалительном и противоопухолевом действии GC [48, 67, 505, 506]. В отличие от транс-репрессии, транс-активация GR опосредует развитие многочисленных метаболических осложнений, вызываемых хроническим применением GC [452, 470, 506–508]. Несмотря на то, что большое количество генов, индуцируемых GC (таких как *DUSP1/MKP1*, *GILZ*, *IκBα*), вовлечено в реализацию ответа на воспаление, а часть генов, чья экспрессия снижается под действием GC (*ACTH* или коллагены), вовлечена в развитие побочных эффектов, в настоящее время полагают, что лиганды GR, не вызывающие димеризации рецептора и преимущественно активирующие транс-реессию, обладают более высоким «терапевтическим индексом» - соотношением между терапевтическими и побочными эффектами [476, 499, 508, 509]. Такого рода лиганды GR, так называемые «диссоциированные» лиганды, сохраняют терапевтическую активность на уровне с GC, но обладают сниженными побочными эффектами на костную ткань, водно-солевой обмен, метаболизм глюкозы и жиров. В связи с этим было высказано предположение, что СpdА обладает выраженными противоопухолевыми и противовоспалительными свойствами, но вызывает меньшее количество осложнений при применении. Более того, также предполагали, что СpdА, в отличие от GC, не вызывает развития резистентности к своему применению [501].

Противовоспалительные свойства СpdА

Глюкокортикоиды являются «золотым стандартом» среди противовоспалительных лекарственных препаратов. Применение GC эффективно при широком спектре воспалительных и аутоиммунных заболеваний, характеризующихся различными типами CD4-положительных Т-хелперов (Th). Лимфоциты Th1, продуцирующие IFN-α, IL-2, фактор транскрипции T-bet, а также TNF-α, и лимфоциты Th17, продуцирующие IL-17, вовлечены в патогенез аутоиммунных заболеваний, включающих в себя рассеянный склероз, ревматоидный артрит, диабет I типа, воспалительное заболевание кишечника (болезнь Крона), а также острое отторжение органов после трансплантации [510–518]. Лимфоциты Th2, продуцирующие IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 и IL-13, в основном отвечают за развитие атопических заболеваний (атопический дерматит, ринит, астма) и аллергии [511–517]. Известно, что GC блокируют активность лимфоцитов как Th1/Th17, так и Th2 типа, а также снижают активность провоспалительных факторов транскрипции, таких как NF-κB, отвечающих за выработку цитокинов и хемокинов, вовлеченных в процесс активации и дифференцировки Т-хелперов.

Терапевтическая активность СpdА в сравнении с GC была проанализирована большим количеством исследователей на различных моделях воспаления *in vivo*, основанных как на лимфоцитах Th1/Th17, так и на Th2. Данные модельные системы включали в себя воспаление

лапы у крыс, индуцированное зимозаном, CIA, экспериментальный аутоиммунный неврит (experimental autoimmune neuritis, EAN) и энцефаломиелит (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE), диабет I типа и острый колит. CpдA подавлял развитие клинических симптомов и морфологическое проявление заболеваний, в частности, опухание подушечек лап, воспаление в суставах, кишечнике, поджелудочной железе, центральной и периферической нервной системе [500, 501, 519–523]. CpдA также снижал степень повреждения и демиелинизации нейронов, а также прогрессирование невропатической боли [521]. Более того, на модели астмы Th2 типа было показано, что CpдA подавляет воспаление и гиперчувствительность дыхательных путей [523]. Во всех вышеупомянутых моделях CpдA также уменьшает остроту проявления клинических симптомов заболевания. Однако во всех проведенных исследованиях дозы CpдA были в ~10 раз выше по сравнению с GC, что, вероятно, связано с более низкой аффинностью CpдA к GR и нестероидной природой данного соединения [16, 500, 524]. На модели мышечной дистрофии Дюшенна у мышей, заболеванием, в основе которого лежит аномальное развитие воспаления в мышцах и чрезмерная активация NF-κB, было продемонстрировано, что CpдA снижает степень выраженности мышечной патологии. В частности, было показано, что после 2 месяцев инъекций CpдA мышам с мутацией в гене *mdx*, у животных произошла нормализация мышечного тонуса в конечностях, а также снизилась активность маркера воспаления, фермента катепсина В [525].

На молекулярном уровне противовоспалительные эффекты CpдA в большинстве случаев реализуются посредством ингибирования активности провоспалительных факторов транскрипции, включающих в себя NF-κB, T-bet, STAT6, причем активация STAT6 является ключевым звеном патогенеза в модели астмы Th2 типа [518, 523, 526]. Подавление активности указанных факторов транскрипции приводит к значительному ингибированию экспрессии большого количества провоспалительных цитокинов и хемокинов, характерных для каждого конкретного заболевания. К примеру, при тестировании свойств CpдA на модели индуцированного зимозаном воспаления лапы у крыс было показано, что его противовоспалительный эффект ассоциирован с подавлением экспрессии TNF-α-индуцируемых и NF-κB-зависимых провоспалительных генов, таких как *IL-6*, *E-selectine*, *IL-8* [500]. На модели экспериментального колита, индуцированного тринитробензолсульфоновой кислотой наблюдали снижение выработки *TNF-α*, *IL-1*, и *COX-2* после применения CpдA [527].

На модели аутоиммунных заболеваний, таких как артрит, астма, EAE и EAN было показано, что CpдA ингибирует экспрессию цитокинов как Th1/Th17, так и Th2 типа [501, 519–523, 528–530]. У животных с EAE, к примеру, CpдA был способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и снижать остроту симптомов энцефаломиелита посредством ингибирования ядерной транслокации NF-κB и экспрессии NF-κB-регулируемых

провоспалительных цитокинов (*INF-γ*; *IL-1β*; *TNF-α*; *IL-23*; *IL-17* и др.) в центральной нервной системе [520]. В модели астмы Th2 типа эффекты CpдA были опосредованы ингибированием *TNF-α* и Th2-зависимых провоспалительных цитокинов (*IL-4*, *IL-5*, *IL-6*), а также подавлением активности NF-κB в легких [523]. При тестировании эффектов CpдA на модели мышечной дистрофии Дюшенна наблюдали снижение экспрессии цитокинов *IL-6*, *CCL2*, *IFNγ*, *TNF-α* и *IL-12p70* в мышечной ткани [525]. Следует отметить, что на модели диабета I типа и EAN, в дополнение к ингибированию экспрессии Th1/Th17-зависимых цитокинов, CpдA также проявлял способность изменять направление дифференцировки лимфоцитов Th1/Th17 в сторону противовоспалительных регуляторных T-клеток или T-супрессоров (Treg), что является важным механизмом снижения воспаления [521, 531].

Молекулярные механизмы эффектов CpдA на активацию сигнального пути NF-κB и на экспрессию провоспалительных цитокинов были в дальнейшем исследованы *in vitro*, на различных клеточных линиях и первичных культурах, включая клетки микроглии и астроциты мыши, синовиоциты от пациентов с ревматоидным артритом [520, 528]. В большинстве экспериментов воспаление и продукцию цитокинов индуцировали помощью *TNF-α* или липополисахаридов (ЛПС). Клетки рака печени линии HepG2 инфицировали вирусом Денге, что лежит в основе патогенеза развития лихорадки Денге геморрагического типа [532]. Во всех экспериментах, описанных выше, было продемонстрировано, что эффект подавления активности NF-κB и экспрессии провоспалительных цитокинов при обработке клеток CpдA является GR-зависимым, а также было подтверждено, что CpдA селективно запускает транс-репрессию, не активируя транскрипцию транс-активационных GR-зависимых генов *DUSP1/MKP1*, *GILZ*, *FKBP51* [501, 519, 521, 527, 528]. Более того, эксперименты *in vitro* подтвердили, что CpдA одновременно способен снижать продукцию провоспалительных цитокинов и индуцировать экспрессию противовоспалительных цитокинов, таких как *IL-10* [521].

Противоопухолевый эффект CpдA

Глюкокортикоиды стимулируют дифференцировку клеток и подавляют клеточную пролиферацию, что опосредует их доказанную противоопухолевую активность [47, 66, 67, 533]. Синтетические GC интенсивно используются при лечении лейкозов, лимфом, множественной миеломы. Часто стероиды применяют в комбинации с известными классическими цитостатическими препаратами циклофосфамидом, винкристином, доксорубицином, метотрексатом, а также с современными противоопухолевыми препаратами (таргетные низкомолекулярные препараты, ингибиторы протеасом) [534–537]. В комбинированную химиотерапию опухолей эпителиального происхождения GC преимущественно включают в качестве поддерживающего агента для снижения болевого синдрома, уменьшения тошноты и других побочных эффектов от основной химиотерапии [43]. Однако иногда допускают

использование GC в качестве противоопухолевых препаратов, даже в качестве монотерапии: в частности, у пожилых пациентов с раком предстательной железы [50].

В отличие от противовоспалительных свойств GC их противоопухолевые эффекты были открыты сравнительно недавно. Было показано, что CpdA подавляет рост и жизнеспособность клеток различных злокачественных новообразований человека, включая рак предстательной железы и множественную миелому. Противоопухолевый эффект CpdA был GR-зависимым: в клетках с нокдауном рецептора CpdA вызывал гибель клеток в значительно меньшей степени [48, 538]. В клетках рака предстательной железы цитотоксические концентрации CpdA лежали в диапазоне 1-10 мкМ, что было определено из стандартных тестов на пролиферацию, апоптоз, а также из теста на колониеобразование [48, 538]. Более того, при использовании клеток рака предстательной железы с различным статусом AR и GR было показано, что эффекты CpdA были как AR-, так и GR-зависимыми, что коррелирует с тем фактом, что CpdA является лигандом для обоих рецепторов [48]. В исследовании *in vivo* на ксенографтах клеток рака предстательной железы у бестимусных мышей было показано, что CpdA подавляет рост ксенографтов клеток линии PC3 на 40% в дозах ~ 8–10 мкг/животное, что значительно ниже доз, при которых реализуется противовоспалительное действие CpdA *in vivo* [500, 520].

Как было ранее упомянуто в тексте, GC в большинстве случаев используют в комбинированной противоопухолевой терапии, в частности, с ингибитором протеасом Бортезомибом, который в 2003 году был одобрен в США для терапии злокачественных новообразований кроветворной системы, а с 2009 г применяется и в России [539, 540]. Поскольку биологические эффекты GC зависят от уровня экспрессии рецептора в клетке, и известно, что ингибиторы протеасом стабилизируют GR, была высказана и подтверждена гипотеза о том, что Бортезомиб усиливает накопление GR в клетках рака предстательной железы, а также усиливает свойства CpdA селективно активировать только механизм транс-репрессии. Был продемонстрирован GR-зависимый кооперативный цитотоксический эффект CpdA и Бортезомиба. Сходные результаты были получены на клеточной линии множественной миеломы MM.1S [48, 538, 541, 542].

Существует большое количество данных литературы о том, что, наряду с подавлением жизнеспособности опухолевых клеток и индукцией в них апоптоза, GC также запускают антиапоптотические сигнальные пути, которые, при определенных условиях, могут препятствовать действию химиопрепаратов на опухоль [43, 45, 543–545]. Было показано, что GC способны активировать члены семейства ингибиторов апоптоза cIAP1 и cIAP2, фосфатазу MAP-киназ DUSP1/МКР1 (что приводит к активации AP-1), пропролиферативную сывороточную GC-индуцируемую киназу 1 SGK1, а также увеличивать экспрессию антиапоптотических генов семейства Bcl-2 (*Bcl-2* и *Bcl-xl*) [43, 45, 543–545]. Более того, было показано, что GC

предотвращает индуцируемый Бортезомибом стресс эндоплазматического ретикулума в клетках рака предстательной железы [538]. СрдА, напротив, не вызывает, в отличие от GC, запуска экспрессии антиапоптотических генов, а также усиливает стресс эндоплазматического ретикулума, что свидетельствует о перспективности использования SEGRA в комбинированной химиотерапии [538].

Различия в развитии резистентности при длительном действии GC и SEGRA

Хроническое применение GC часто приводит к развитию резистентности к стероидам [546], которая частично опосредована снижением уровня GR в клетке. Известно, что агонисты GR индуцируют подавление его транскрипции, а также способствуют дестабилизации на уровне белка и мРНК [547]. Подавление транскрипции GR под воздействием GC ассоциировано со связыванием активированного рецептора с негативными GRE в 6 экзоне гена GR, что сопровождается сборкой репрессорного комплекса GR-NCoR1-HDAC3 в сайте старта транскрипции. СрдА, в отличие от GC, не вызывает связывания GR с экзонем 6 [547].

В то время, как GC также индуцируют протеасомную деградацию GR [542], СрдА, напротив, не вызывает существенного распада рецептора в синовиоцитах [501, 528]. Механизм различных эффектов СрдА и GC на ключевые стадии протеасомной деградации GR, в частности, на фосфорилирование и убиквитинирование рецептора, необходимо исследовать более детально.

Другим механизмом потери чувствительности к GC является увеличение экспрессии белка-шаперона GR в цитоплазме, FKBP51, который удерживает GR в цитоплазме и препятствует его ядерной транслокации [548–550]. В этом отношении было показано, что, в отличие от GC, СрдА не вызывает увеличения экспрессии FKBP51 [538].

Побочные метаболические и атрофогенные эффекты

Побочные эффекты GC развиваются в различных органах и тканях при их длительном применении. К наиболее распространенным осложнениям от применения GC относят изменения в метаболизме жиров и глюкозы, синдром Иценко-кушинга, стероидный диабет, глаукому, остеопороз, кожная и мышечная атрофия, снижение скорости заживления ран, изменения в функционировании центральной нервной системы, замедление роста у детей и лиц юношеского возраста, а также бесплодие. Многие из указанных эффектов оказывают существенное влияние на качество жизни пациента и часто не являются обратимыми [468, 551, 552]. Значительное количество метаболических и атрофогенных эффектов GC связаны с их катаболической активностью в периферических органах и тканях, где деградация белка и липолиз стимулируют глюконеогенез в печени и способствуют поддержанию высокому уровню глюкозы в крови [466, 506]. Эти эффекты включают в себя активацию генов, кодирующих ферменты глюконеогенеза – глюкоз-6-фосфатазу (glucose-6-phosphatase, *G6P*), фосфоенолпируват карбоксикиназу (phosphoenolpyruvate carboxykinase, *PEPCK*), тирозиновую аминотрансферазу и синтазу жирных кислот [466, 506, 522], что связывает побочные эффекты GC с запуском транс-активации. Также было продемонстрировано, что индукция GR-зависимого гена *REDD1* (regulated in development and DNA damage response 1) является ключевым звеном атрофогенного действия GC в кожном покрове, подкожной жировой клетчатке и мышечной ткани [553, 554].

Хотя побочные эффекты CpdA при длительном применении *in vivo* остаются до конца не проанализированными, было показано, что CpdA вызывает осложнения в меньшей степени, чем GC. Это было продемонстрировано на моделях диабета, астмы, ревматоидного артрита, остеопороза и мышечной дистрофии Дюшенна [525, 531, 555, 556]. В частности, CpdA не увеличивает экспрессию генов основных глюконеогенных ферментов печени *G6P* и *PEPCK*, не влияет на формирование гликогена и в итоге не вызывает гипергликемии и гиперинсулинемии после длительного применения у животных [501, 522]. Важно отметить, что даже при сниженной выработке инсулина GC могут приводить к развитию диабета II типа [507], в то время как CpdA не нарушает метаболизм глюкозы. Более того, CpdA был эффективен в профилактике и лечении экспериментального диабета, что соответствует диабету I типа у пациентов [531].

Также, в отличие от стероидов, CpdA не вызывает истощения мышечной ткани у мышей [525], атрофии кожного покрова у крыс и мышей [557, 558], что коррелирует с отсутствием способности активировать экспрессию *REDD1* в коже, а также снижения уровня коллагенов I и III типа, ключевого изменения, ведущего к атрофии кожного покрова [557, 558].

Хроническое применение GC также приводит к дистрофии костной ткани и остеопорозу за счет индукции апоптоза в остеобластах и остеоцитах, подавления экспрессии коллагена I типа и *Runx2*, генов, непосредственно вовлеченных в формирование кости, а также активацию

остеокластов посредством индукции экспрессии генов *RANKL* и *osteopontin* [466, 525]. Отрицательный эффект CpдA на метаболизм костной ткани был выражен гораздо слабее как у новорожденных, так и у взрослых животных [525, 555, 556].

Экзогенные GC подавляют активность системы НРА, которая является основным компонентом нейроэндокринной системы, контролирующей адаптацию к стрессу, иммунный ответ, эмоциональное состояние, сохранение энергии, а также биосинтез кортикостероидов в надпочечниках [466]. АСТН является основным регуляторным гормоном оси НРА, и его экспрессия отрицательно регулируется GC [466]. Несмотря на эффективную индукцию транс-репрессии при воздействии на клетки CpдA, было также показано, что CpдA не влияет на функциональную активность оси НРА, о чем судили по отсутствию изменений уровня кортикостерона и АСТН в сыворотке крови [520, 522].

Однако необходимо также отметить, что CpдA имеет определенные ограничения в применении за счет его низкой химической стабильности. У него достаточно узкий диапазон терапевтических доз, и при использовании этого соединения в более высоких дозах (~15 mg/kg) в течение длительного времени можно наблюдать развитие GR-независимого апоптоза [522, 559].

Таким образом, перспективным является синтез более стабильных SEGRA с использованием CpдA в качестве прототипа. Также во всех исследованиях *in vitro* и *in vivo* была использована рацемическая смесь CpдA, в то время как известно, что различные энантиомеры одной и той же хиральной молекулы часто обладают разными биологическими свойствами [560, 561]. В связи с этим, альтернативным перспективным подходом к поиску новых более эффективных SEGRA может служить синтез чистых оптических изомеров CpдA.

1.3.2. Ингибирование «генов побочных эффектов» глюкокортикоидов

Альтернативным подходом к повышению терапевтического индекса глюкокортикоидов может служить комбинация GC с препаратами, которые способны воздействовать непосредственно на экспрессию генов, обуславливающих развитие побочных эффектов GC. GR изменяет транскрипцию большого числа генов, порядка нескольких тысяч. Для ряда GR-регулируемых генов была показана прямая связь с развитием побочных эффектов. Некоторые из наиболее охарактеризованных генов, ассоциированных с побочными эффектами GC, будут рассмотрены в данном разделе. Отдельную роль в реализации метаболических и атрофических нарушений, вызываемых GC, играет ген/белок REDD1.

1.3.2.1. Роль REDD1 в канцерогенезе и функционировании глюкокортикоидного рецептора

Функциональная активность REDD1

Ген/белок REDD1 (regulated in development and DNA damage response 1), известный также как DDIT4 или RTP801, изначально был идентифицирован как белок, индуцируемый в ответ на различные стрессовые факторы: гипоксию, дефицит железа, повреждения ДНК и др. [562–565]. REDD1 является гомологом генов *Scylla* и *Charybdis* у дрозофилы, которые отвечают за подавление активности комплекса mTOR. В последующих исследованиях было показано, что REDD1 является ингибитором mTORC1, пролиферативного белкового комплекса, включающего в себя серин/треониновые киназы mTOR и mLST8, а также белок Raptor. В дальнейшем данный белковый комплекс может быть ассоциирован с белками-супрессорами, белком, взаимодействующим с mTOR и содержащим домены DEP (DEP domain-containing mTOR-interacting protein, DEPTOR) и субстратом 40 киназы Akt, богатым пролином (proline-rich Akt substrate 40, PRAS40). Активация mTORC1 происходит при воздействии митогенов и питательных веществ, и служит для координации передачи сигнала регуляции различных клеточных процессов: синтез белка, индукция аутофагии, пролиферация (Рисунок 6 и [566]). Ингибирование mTORC1 посредством REDD1 реализуется за счет способности REDD1 активировать афферентный супрессор mTORC1, комплекс туберозного склероза 1 и 2 (tuberous sclerosis complex 1, TSC1, tuberous sclerosis complex 2, TSC2) [563]. Было продемонстрировано, что REDD1 также способен подавлять mTORC1 за счет дефосфорилирования протеинкиназы PKB/Akt, опосредованного белковой фосфатазой 2A (protein phosphatase 2A, PP2A), что приводит к ее инактивации и снижению степени ингибирования TSC2 (Рисунок 6 и [566]). В качестве альтернативной гипотезы было высказано предположение, что REDD1 секвестрирует белок 14-3-3, обычно находящимся в комплексе с TSC2, что позволяет TSC2 действовать как ингибитор функциональной активности mTORC1 (Рисунок 6 и [566]), хотя при анализе с помощью виртуального докинга *in silico* было продемонстрировано, что белки REDD1 и 14-3-3 не могут взаимодействовать на физическом уровне [567]. Другими исследователями было отмечено, что REDD1 модулирует активность киназы Akt, которая влияет на функционирование mTOR, регулируя тем самым пролиферацию и метаболизм клеток [566].

Процессы, регулируемые REDD1

Регуляция REDD1 комплекса mTOR приводит к изменению в процессах, отвечающих за клеточный гомеостаз. Так, показана взаимосвязь между подавлением экспрессии *REDD1* и чувствительностью к инсулину: у мышей, дефицитных по гену *REDD1*, была нарушена толерантность к глюкозе и инсулину, снижалась степень фосфорилирования PKB/Akt по остаткам серина и треонина Thr308/Ser473, индуцированного инсулином, а также подавлением

фосфорилирования тирозина в белке-субстрате рецептора инсулина 1 (insulin receptor substrate 1, IRS-1) в скелетной мускулатуре, что является маркером снижения чувствительности к инсулину [568]. В адипоцитах линии 3T3-L1, нокаутных по гену *REDD1*, наблюдали схожие эффекты, включая снижение степени фосфорилирования PKB/Akt и IRS-1 [569]. Более того, было показано, что рапамицин способен восстанавливать функционирование инсулин-зависимого сигнального пути, что свидетельствовало о зависимости эффектов инсулина от активности mTOR [570]. Метформин, восстанавливающий чувствительность к инсулину, также увеличивает экспрессию *REDD1* в клетках рака предстательной железы. Однако в настоящее время не установлено, являются ли эти два события взаимосвязанными [571]. *REDD1* также способен регулировать секрецию инсулина в поджелудочной железе: подавление экспрессии *REDD1* приводило к снижению секреции инсулина [572]. Была высказана гипотеза о том, что данный эффект происходит за счет гиперактивации mTORC1 и связанным с ним подавлением активности β -клеток [573]. Была также показана роль *REDD1* в регуляции метаболизма жиров. Подавление экспрессии *REDD1* с помощью коротких интерферирующих РНК в клеточной линии адипоцитов 3T3-L1 приводило к ослаблению инсулин-индуцированного липогенеза. В то же время наблюдали снижение активности инсулина [569]. *REDD1* вовлечен в регуляцию липогенных сигнальных путей за счет эффекта на сигнальный путь инсулина, в частности, за счет модулирования активности PKB/Akt [574, 575].

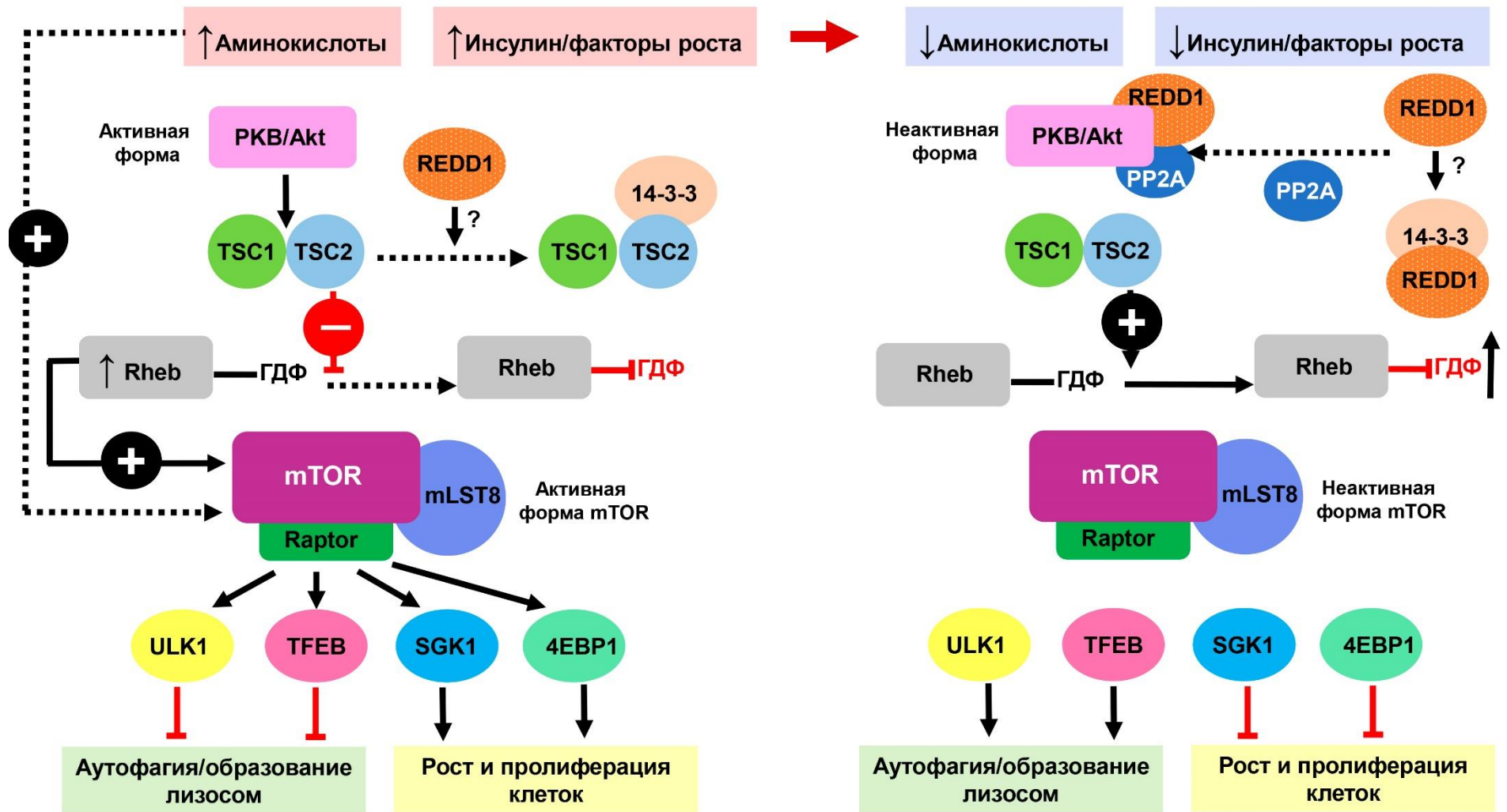


Рисунок 6 - Факторы, вовлеченные в регуляцию сигнального пути mTORC1 (адаптировано из [566])

Более того, было продемонстрировано, что направленная гиперэкспрессия *REDD1* в клеточной культуре адипоцитов C3H10T1/2 стимулирует липолиз, о чем судили по высвобождению жирных кислоты и повышению уровня глицерол-3-фосфата в крови. Следует отметить, что повышения экспрессии липолитических генов при этом не наблюдали [576]. В целом, молекулярный механизм действия *REDD1* на процессы липогенеза и липолиза требует дальнейшего исследования, в особенности *in vivo*.

Была показана также роль *REDD1* в регуляции целостности и функциональной активности митохондрий. Так, было продемонстрировано в эмбриональных фибробластах мыши, что значительная доля *REDD1* (более 10%) локализована в митохондриях. Более того, данный тип локализации *REDD1* являлся необходимым условием для подавления продукции митохондриальных ROS. В частности, у мыши, дефицитных по синтезу *REDD1*, наблюдали увеличение содержания супероксидов и пероксидов по сравнению с животными дикого типа. В дополнение к данному исследованию был проведен следующий ряд экспериментов на животных с мутантной формой *REDD1*, не способной к митохондриальной локализации, где также наблюдали повышенное содержание ROS [577]. Однако следует отметить, что *REDD1* также способен повышать внутриклеточную продукцию ROS, как было продемонстрировано в фибробластах с экзогенной экспрессией *REDD1* и у мышей, дефицитных по *REDD1* и со сниженным содержанием ROS [578, 579]. В тех же исследованиях было показано, что снижение уровня аутофагии у мышей, дефицитных по *REDD1*, было ассоциировано с накоплением дисфункциональных митохондрий и подавлением окислительного фосфорилирования [579]. Таким образом, накоплено большое количество данных по роли *REDD1* в функционировании митохондрий, окислительно-восстановительном гомеостазе клетки, способности клеток к аутофагии и др., в связи с чем дальнейшие исследования в данной области представляются перспективными. Изменение экспрессии *REDD1* может быть обусловлено различными факторами, таких как уровень GC или активность p53, при переходе из одного диетарного статуса организма в другой.

Роль *REDD1* в канцерогенезе и прогрессии опухолей

За последнее время было опубликовано большое количество данных по участию *REDD1* в регуляции сигнальных каскадов, модулирующих процессы злокачественной трансформации клеток, а также пролиферации и апоптоза уже трансформированных клеток. Повышение экспрессии *REDD1* в условиях гипоксии, энергетического или окислительного стресса, увеличения уровня глюкокортикоидов, вызывает снижение активности mTORC1 и подавляет пролиферацию клеток [578, 580]. Однако во многих случаях этот процесс также сопровождается повышением жизнеспособности клеток. Так, было показано, что в условиях гипоксии индукция *REDD1* повышается, и это является необходимым условием поддержания жизнеспособности

иммортизированных кератиноцитов линии HaCaT [562]. Более того, при определенных условиях REDD1 способен ингибировать апоптоз [562]. В частности, повышение REDD1 при обработке трансформированных лимфоцитов и тимоцитов мыши глюкокортикоидами приводило к подавлению mTOR и дальнейшему развитию аутофагии, обеспечивающей выживание клеток в неблагоприятных условиях. Наряду с этим снижалась степень развития апоптоза [380]. Эти данные согласовались с результатами, полученными другими исследовательскими группами, которыми было показано, что в клетках глиобластомы гипоксия вызывает аутофагию, опосредующую устойчивость опухоли к антиангиогенной терапии. Более того, было показано, что данный процесс реализуется за счет активации HIF-1 с последующим увеличением экспрессии *REDD1* [581, 582]. Аналогичные данные по индукции REDD1 в опухоли, сопутствующей ей аутофагии и увеличению жизнеспособности опухолевых клеток были получены на модели опухоли толстого кишечника *in vitro* [584]. Ингибирование *REDD1* с помощью малых интерферирующих РНК в клетках уротелиальной карциномы почки восстанавливало чувствительность данной линии опухолевых клеток к действию паклитаксела [583]. Однако в ряде работ было также показано, что в различных типах опухолей экспрессия *REDD1* была снижена и это коррелировало с агрессивностью заболевания [585]. Таким образом, данные по влиянию REDD1 на процессы канцерогенеза и опухолевой прогрессии довольно противоречивы и требуют дальнейших исследований.

1.3.2.2. Основные эффекторы реализации побочных эффектов глюкокортикоидов

Белок 51, связывающий FK506 (FK506 binding protein, FKBP51)

FKBP51 является одним из белков-шаперонов, входящим в состав цитоплазматического комплекса GR. Основная роль FKBP51 заключается в модулировании функциональной активности рецептора: в частности, высокий уровень FKBP51 коррелирует с низкой аффинностью GR к своим лигандам и, соответственно, пониженной чувствительности к глюкокортикоидам [586, 588]. Помимо этого, FKBP51 вовлечен в регуляцию большого числа других процессов, происходящих в клетке. Так, FKBP51 оказывает как прямое, так и не прямое воздействие на сигнальные пути, связанные с работой иммунной системы: физическое взаимодействие данного белка с ингибиторами киназ IKK α и киназ, активируемых TGF- β , повышает активность провоспалительного и пропролиферативного сигнального пути NF- κ B [587, 589]. Было показано, что подавление экспрессии *FKBP51* с помощью короткой шпилечной РНК в межпозвоночных ганглиях у крыс приводит к снижению активности NF- κ B [590]. Одним из предполагаемых механизмов данного явления может служить ингибирование активности кальцинейрина, который дефосфорилирует ингибитор NF- κ B, I κ B, и препятствует его протеасомной деградации [587, 591].

Описано влияние FKBP51 на сигнальный путь Akt/ПКВ: FKBP51 регулирует активность Akt посредством снижения уровня его фосфорилирования по двум основным сайтам Ser473 и Thr308 [592]. Также FKBP51 способен воздействовать на клеточный цитоскелет, в частности, стабилизировать микротрубочки за счет взаимодействия с Tau-белком (Microtubule-associated protein tau, MAPT) [593, 595]. В отношении сигнальных путей, регулирующих клеточную гибель, было продемонстрировано, что FKBP51 способен изменять реакцию клеток в ответ на облучение с развития апоптоза к аутофагии, которая часто способствует повышению жизнеспособности клеток [594, 596]. Фосфорилирование и активность ДНК-метилтрансферазы 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1), ключевого фермента, отвечающего за поддержание профиля метилирования ДНК, также находится под контролем системы GR-FKBP51 [598]. И, наконец, многие метаболические осложнения в организме – адипогенез и ожирение, диабет 2 типа, резистентность к инсулину – связывают с повышенной экспрессией *FKBP51* [597, 599, 600].

Белок 1, связывающий инсулиноподобный фактор роста (insulin-like growth factor binding protein 1, IGFBP1)

Белки семейства IGFBP являются внутриклеточными белками, способными как запускать сигнальный каскад инсулиноподобных факторов роста (insulin-like growth factor, IGF), так и взаимодействовать с другими лигандами. Их основной функцией является транспортировка IGF-1 и IGF-2 к рецептору инсулиноподобного фактора роста IGF1R, активация сигнального пути которого может стимулировать пролиферацию и злокачественную трансформацию клеток [601]. Более того, в некоторых исследованиях было показано, что IGFBP1 стимулирует миграционную способность клетки за счет связывания с интегрином $\alpha 5\beta 1$, что может способствовать процессу метастазирования [602]. Однако в других исследованиях данный феномен был опровергнут [603], а также было показано, что в определенных условиях IGFBP1 может выступать в качестве супрессора опухолевого роста метаболических осложнений, связанных с нарушениями в липидном обмене [604].

Тирозин-аминотрансфераза (tyrosine amino-transferase, ТАТ)

Тирозин-аминотрансфераза представляет собой фермент, катализирующий превращение тирозина в 4-гидроксифенилпироват. Сниженная экспрессия ТАТ приводит к развитию тирозинемии 2 типа – заболеванию, характеризующимся развитием патологии глаз, кожных нарушений и неврологических осложнений [605]. Однако увеличение экспрессии ТАТ также характеризуется развитием метаболических осложнений [509].

Фосфоенолпироват карбоксикиназа (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) совместно с глюкозо-6-фосфатазой (glucose-6-phosphatase, G6P) являются основными ферментами глюконеогенеза, стимулирующими необратимый процесс синтеза глюкозы. PEPCK катализирует превращение оксалоацетата в фосфоенолпироват, G6P отвечает за гидролиз

глюкозо-6-фосфата до свободной глюкозы, которая затем транслоцируется во внеклеточное пространство [606, 607]. Повышенный синтез данных ферментов ведет к гипергликемии, компенсаторному повышению секреции инсулина и другим осложнениями, в итоге приводящим к развитию стероидного диабета.

Белковая фосфатаза 1 двойной специфичности (dual specificity protein phosphatase 1, DUSP-1, MKP-1)

Ген *DUSP-1* (*MKP-1*) кодирует фосфатазу, которая специфически инактивирует MAP-киназы через одновременное дефосфорилирование остатков треонина и тирозина [609]. При онкологических заболеваниях экспрессия этого белка может изменяться различным образом в зависимости от заболевания и особенностей его протекания. В литературе описаны данные о резистентности пациентов с раком яичников, молочной железы и легкого к химиотерапии, у которых наблюдалась гиперэкспрессия *MKP-1* [608, 610, 611]. Также было показано, что применение ГС влечет за собой гиперэкспрессию данного гена, что связывают с уменьшением эффективности лечения [544].

Глюкокортикоид-индуцируемая «лейциновая молния» (glucocorticoid-induced leucine zipper, GILZ)

GILZ - первый ген, в котором были найдены респонсивные элементы глюкокортикоидов [88]. Среди всех генов, регулируемых GR, *GILZ* является одним из наиболее перспективных потенциальных медиаторов иммуносупрессивного и противовоспалительного действия глюкокортикоидов. Однако в литературе также описано антиапоптотическое действие гиперэкспрессированного *GILZ* в Т-клетках [612]. Более того, было показано, что увеличение количества *GILZ* в клетках кости при терапии глюкокортикоидами стимулирует активацию остеокластов, что в свою очередь ведет к подавлению пролиферации, дифференциации и функциональных возможностей остеобластов, усилению их апоптоза и, как следствие, развитию стероидного остеопороза [613].

Фенилэтанолламин-N-метилтрансфераза (phenylethanolamine N-methyltransferase, PNMT)

PNMT представляет собой растворимый фермент, катализирующий N-метилование норадреналина с образованием адреналина в адреналин-продуцирующих клетках мозгового слоя надпочечников, а также вовлеченный в синтез эpineфрина и катехоламинов. Повышение экспрессии *PNMT* при воздействии глюкокортикоидов может приводить к артериальной гипертензии [614].

Глюкокортикоид-регулируемая сывороточная протеинкиназа 1 (serum- and glucocorticoid induced protein kinase, SGK1)

Экспрессия *SGK1* регулируется не только GC, но и минералокортикоидами, а также различными другими медиаторами и стрессовыми факторами, такими как TGF β . Активация SGK1 происходит посредством киназ PI3K, PDK1, и пролиферативного комплекса mTOR. SGK1 увеличивает экспрессию большого количества генов, соответствующим белкам-транспортерам различных классов (NCC, NKCC, NHE1, NHE3, SGLT1, транспортеры аминокислот), компонентов ионных каналов (ENaC, SCN5A, TRPV4-6, Orai1/STIM1, ROMK, KCNE1/KCNQ1, GluR6, CFTR), ферментов (GSK3, убиквитин-лигаза Nedd4-2), и факторов транскрипции (FOXO3a, β -катенин, NF-kB). Повышенная экспрессия *SGK1* вносит свой вклад в развитие большого количества патологических состояний. Так, за счет стимулирования экспрессии ENaC, SGK1 повышает реабсорбцию соли в почках, а также провоцирует потребление соли, что в дальнейшем приводит к развитию артериальной гипертензии [615–618]. Повышая транспорт глюкозы посредством увеличения синтеза переносчика глюкозы SGLT1, SGK1 стимулирует ее абсорбцию, что является одной из причин ожирения и развития диабета 2 типа [619, 620]. SGK1-регулируемое повышение экспрессии IL-23 и IL-17 увеличивает долю Th17 лимфоцитов и играет ключевую роль в развитии аутоиммунных заболеваний [620]. Увеличение активности NF-kB также стимулирует развитие воспалительных процессов. Во многих типах опухолей повышенная экспрессия *SGK1* ассоциирована с более высокой жизнеспособностью опухолевых клеток. В частности, SGK1 способствует пролиферации клеток холангиокарциномы за счет повышения экспрессии IL-6, клеток рака почки за счет повышения экспрессии IL-2, и клеток рака предстательной железы за счет повышения экспрессии рецептора андрогенов. Более того, было показано, что SGK1 снижает чувствительность клеток РМЖ к химиопрепаратам, увеличивает миграционную и инвазивную способность опухолевых клеток [621].

Dickkopf-1 (Dkk-1)

Dickkopf-1 (Dkk-1) представляет собой растворимый ингибитор Wnt, нарушающий дифференцировку остеобластов и снижающий их активность, а также подавляющий экспрессию генов остеопротегрина и RANKL. У пациентов с множественной миеломой наблюдают повышенную экспрессию *Dkk-1*, что приводит к остеолизису. Здесь необходимо отметить, что ген *RANKL* также является GC-зависимым геном, и применение GC у онкологических и неонкологических больных стимулирует развитие нарушений костной ткани по нескольким механизмам, оказывающим друг на друга взаимное влияние [622].

Таким образом, в данном разделе были рассмотрены ключевые молекулы, опосредующие развитие побочных эффектов GC, а также резистентности к стероидам.

1.3.2.3. Перепрофилирование лекарственных препаратов в онкологии и использование этого подхода при поиске ингибиторов побочных эффектов глюкокортикоидов

Онкологические заболевания занимают лидирующие позиции по смертности несмотря на то, что колоссальные ресурсы ежедневно затрачиваются на развитие химиотерапии, ранней диагностики рака и его первичной профилактики. За последние 15 лет, в связи с развитием новых технологий создания противоопухолевых препаратов, были открыты сотни фармацевтических компаний. В США удвоилось количество инвестиций в фармацевтический сектор, в России и странах Евросоюза они также растут. Однако это не привело к пропорциональному росту количества эффективных противоопухолевых препаратов новых классов. В США более 5 тыс. препаратов ежегодно получает одобрение Управления по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами для клинических испытаний, однако лишь 1-5% зарегистрированных препаратов демонстрируют эффективность на I фазе клинических исследований. В России рынок фармацевтических средств отечественного производства гораздо меньше, и, хотя отмечается его рост, количество препаратов, дошедших до непосредственного применения в клинической практике, невелико [623, 624]. В настоящее время появились новые программы по перепрофилированию или перепозиционированию используемых в медицинской практике лекарственных средств. Перепрофилирование препаратов позволяет не только использовать отработанные схемы синтеза биологически активных соединений, но и избежать проведение исследований, необходимых для внедрения новых лекарственных препаратов в медицинскую практику - по фармакокинетике, канцерогенности, острой и хронической токсичности, в том числе кардиотоксичности, нефротоксичности, аллергенности и т.д. Это создает возможность как сократить объем необходимых исследований, так и снизить затраты на них.

В онкологии программы перепрофилирования лекарственных средств включают как поиск препаратов, обладающих противоопухолевой активностью или потенцирующих действие противоопухолевых препаратов, среди известных и широко применяемых лекарственных средств, используемых для лечения неонкологических заболеваний, так и анализ возможности использования уже известных противоопухолевых препаратов для лечения каких-либо новых нозологических форм заболевания. Основанием для поиска противоопухолевых свойств среди препаратов иного назначения является тот факт, что сигнальные пути в клетке характеризуются большим количеством перекрестных взаимодействий, и некоторые из них могут ингибировать пролиферацию опухолевых клеток. Современные достижения геномики, протеомики, биоинформатики, появление объемных баз данных по молекулярным эффектам лекарственных препаратов, мощных аналитических систем и их постоянное совершенствование уже позволяет

исследователям одновременно проанализировать большое количество существующих препаратов в применении к конкретной молекулярной мишени.

В то же время выявление препаратов с противоопухолевой активностью среди уже существующих лекарственных средств, прошедших доклинические и клинические испытания безопасности, может существенно ускорить процесс введения препарата в использование и снизить затраты на развитие химиотерапии злокачественных новообразований. В то же время, использование лекарственных препаратов, которые уже применяются в медицинской практике, делает невозможным их патентование. В связи с этим данная область исследований, в основном, относится к некоммерческому сектору, что объясняет сложность поиска финансирования для их проведения.

Методы перепрофилирования

Выбор эффективной стратегии для поиска препарата, тестирования его противоопухолевой активности и внедрения в клиническую практику трансформировался с течением времени [625]. Выделяют следующие методы, используемые для перепрофилирования:

1) Слепой поиск или метод интуитивного скрининга. При слепом поиске препаратов не принимают в расчет фармакологические и биологические свойства молекулы, выбор препарата часто был основан на интуиции исследователя [626]. Этот подход позволил за период с 1999 по 2009 обнаружить дополнительный спектр биологической активности у 34% зарегистрированных в США препаратов. Так, в частности, силденафила цитрат, известный также как Виагра, изначально был предназначен для лечения болезней сосудов, но затем зарекомендовал себя как средство для терапии эректильной дисфункции. Ритуксимаб, моноклональное антитело для таргетной терапии гемобластозов, нашел свое применение также при терапии РМЖ, а этопозид, разработанный для терапии рака легких (РЛ) и яичников (РЯ), в настоящее время применяется также при лечении рака почки и ряде злокачественных новообразований кроветворной системы [627].

2) Метод, основанный на поиске соединений, действующих на определенную молекулярную мишень. Развитию этого метода способствовало появление и совершенствование систем скрининга высокой производительности (High Throughput Screening, HTS). Основной целью скрининга является определение аффинности препарата из химической библиотеки к конкретному биомаркеру [628]. Частота успешного выбора препарата в данном случае была значительно выше, чем при слепом методе поиска, поскольку большинство молекулярных мишеней напрямую связаны с механизмом развития заболевания. Данный метод позволяет провести скрининг больших химических библиотек в течение относительно короткого периода времени и довольно популярен среди исследовательских групп при поиске новых химиопрепаратов [629].

3) Метод, основанный на анализе данных о свойствах и эффектах химических соединений. В данном методе применяют био- или хемоинформатический анализ. В процессе поиска происходит сопоставление информации, полученной из клинических исследований, из скрининга взаимосвязей между препаратом и его мишенью, а также из анализа химической структуры препарата и мишени, а также сигнальных путей, вовлеченных в реализацию эффекта лекарственного средства. Использование опубликованных данных позволяет обнаружить сходства в действии препаратов и предсказать новые мишени их действия [630]. В качестве примера можно привести препарат сунитиниб, использовавшийся для терапии РМЖ. Анализ экспрессии генов после применения препарат сунитиниб показал наличие общих мишеней сунитиниба в клетках РМЖ и опухоли головного мозга. Кроме того, было известно, что РМЖ часто метастазирует в головной мозг. На этом основании сунитиниб был рекомендован для терапии опухолей головного мозга. Затем, с помощью анализа экспрессии генов, метода, описанного ниже, были обнаружены общие мишени сунитиниба в клетках РМЖ и опухоли головного мозга. В настоящее время сунитиниб был рекомендован для лечения глиобластом и проходит II фазу клинических испытаний [626, 631, 632].

4) Метод, основанный на анализе изменения профиля экспрессии генов при действии соединения. К развитию данного метода привело накопление данных анализа профилей экспрессии генов на ДНК-микрочипах. Количество данных продолжает увеличиваться в настоящее время за счет все большего распространения метода полногеномного секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS). С помощью описанного метода было продемонстрировано, что сиролimus (рапамицин) способен восстанавливать чувствительность к глюкокортикоидам у пациентов с ОЛЛ и данный препарат был включен в протоколы химиотерапии ОЛЛ [626, 633].

5) Метод, основанный на анализе сигнальных путей, вовлеченных в действие препарата. Этот метод схож с предыдущим подходом, за тем исключением, что в анализ также включают данные по известным компонентам сигнальных или метаболических путей и данные по белок-белковым взаимодействиям для построения каскада, специфического для конкретного заболевания. Основным достоинством метода является использование большого количества информации об основных сигнальных путях, поддерживающих жизнедеятельность клетки, для построения специфического малокомпонентного каскада [634]. С помощью данного метода, а также метода, основанного на анализе профилей экспрессии генов из 164 препаратов, с одной стороны, и 100 различных заболеваний, с другой стороны, была построена «карта» взаимодействий препаратов и ключевых молекул патогенеза заболевания. В результате был отобран препарат циметидин для терапии РЛ и, после установления его эффективности на

моделях ксенографтов у бестимусных мышей, данный препарат был разрешен для клинических испытаний [626, 635].

б) Метод, основанный на анализе специфических механизмов развития заболевания. Данный подход направлен на выявление молекулярного механизма развития патологии благодаря использованию расширенного состава данных: анализа схем взаимодействия белков, сигнальных путей, ОМИКСных данных (данный неологизм, получивший распространение в молекулярной биологии, основан на том, что английские термины genomics, proteomics, transcriptomics имеют одинаковые окончания) и перепрофилирование препаратов на основе этих данных. Этот метод зарекомендовал себя при исследованиях развития лекарственной устойчивости во время лечения, поскольку с его помощью возможен выбор наиболее эффективного препарата [629].

В целом, все рассмотренные методы основаны на процессе последовательного анализа данных, выдвижения гипотезы и ее проверки. Эффективность данных подходов определяется, прежде всего, выбором баз данных, на основе которых проводится биоинформатический/хемоинформатический анализ.

Базы данных, используемые при перепрофилировании препаратов

В настоящее время существует большое количество библиотек и баз данных, на основе которых возможно проводить биоинформатический анализ по заданным параметрам. Биоинформатические и хемоинформатические методы и подходы, позволяющие анализировать данные одновременно из нескольких репозиториях, постоянно совершенствуются и описаны во многих источниках литературы [626, 636–638]. Среди известных репозиториях можно выделить системы, хранящие и анализирующие следующие категории данных:

1) ОМИКСные данные. К ним относятся хранилища соматических мутаций (проект «Атлас генома онкологических заболеваний» (The Cancer Genome Atlas, TCGA), включающий в себя данные секвенирования более 10 тыс. образцов от пациентов с более чем 20 типами злокачественных новообразований; проекты ICGC и sBioPortal, и наиболее крупное хранилище COSMIC), базы данных транскриптомного анализа (крупнейший репозиторий данных секвенирования и анализа профилей экспрессии генов на ДНК-микрочипах Gene Expression Omnibus (GEO), содержащих более 3,5 тыс. групп данных из более 1,5 миллионов образцов, а также базы данных OncoMine и Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), включающие в себя результаты анализа ~100 тыс. образцов, а также анализа профилей экспрессии генов в более чем 1000 клеточных линиях злокачественных новообразований человека, репозитории данных анализа эпигенетического профиля регуляции экспрессии генов (проекты «Функциональное аннотирование генома млекопитающих» (Functional annotation of the mammalian genome 5, FANTOM5), «Энциклопедия элементов ДНК» (Encyclopedia of DNA Elements, ENCODE),

включающие в себя функциональный анализ генома: топология регуляторных элементов в ДНК, соматические мутации в некодирующих последовательностях; проект Genotype-Tissue Expression (GTEx), содержащий данные об экспрессии генов и вариантах их регуляции в различных тканях человеческого организма), базы данных функционального анализа протеома (проект The Cancer Proteome Atlas (ТСПА), позволяющий понять патофизиологию злокачественных новообразований, а также физиологию ответа на терапию), а также базы данных профилей экспрессии генов на различных стадиях опухолевой прогрессии, до и после химиотерапии и/или радиотерапии (проект The Cancer Imaging Archive (TCIA), позволяющие связать фенотипические данные с генетикой опухоли) [639, 641].

2) Данные по взаимодействиям препаратов с генами/белками. К доступным базам данных, включающим в себя результаты определения аффинности препарата к белку/гену, относятся проекты DrugBank, Therapeutics Target Database (TTD), ChEMBL, BindingDB, PharmGKB, STITCH, PubChem, PROMISCUOUS, canSAR и DGIdb. В частности, база данных DrugBank включает в себя результаты анализа для ~2 тыс. зарегистрированных низкомолекулярных препаратов, ~ 200 препаратов биотехнологического происхождения (белки, пептиды), и более 6 тыс. экспериментальных препаратов. Репозиторий STITCH содержит данные о взаимодействии более 430 тыс. химических соединений с белками, DGIdb включает в себя более 25 тыс. уникальных взаимодействий ~ 7 тыс. препаратов и ~ 7 тыс. генов. Также существует ряд ресурсов, где содержатся данные о взаимодействиях лекарственных средств с некодирующими РНК [639, 641].

3) Данные по профилям экспрессии генов при воздействии препаратов. Первой аналитической системой для получения информации о действии препаратов, профилей экспрессии генов, характерных для эффектов лекарственного средства, а также для конкретного заболевания, была так называемая «карта взаимодействий» (Connectivity Map, CMap), включающая в себя более 7 тыс. профилей экспрессии генов в 4 клеточных линиях после воздействия ~ 1300 зарегистрированных препаратов [640]. Существенным недостатком этой системы являлась ограниченность нозологических форм злокачественных новообразований. Затем была разработана подобная, более усовершенствованная система Library of Integrated Cellular Signatures (LINCS), текущая версия которой содержит данные по эффектам более чем 10 тыс. препаратов в ~80 клеточных линиях опухолей человека LINCS [642].

4) Данные по фармакогеномике опухолей. К ним относятся уже упоминаемое в тексте хранилище CCLE, а также репозитории Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC), CellMiner, Cancer Therapeutic Response Portal (CTRP), хранилище данных анализа экзосом клеточных линий опухолей человека, относящихся к панели NCI-60, используемой для определения потенциальной противоопухолевой активности химических соединений. В частности, CCLE и

GDSC обеспечивают доступ к данным по профилям фармакогеномных маркеров (онкогенным белкам, специфическим мутациям) [639, 641].

5) Данные системной биологии. Для хранения и обработки данных системной биологии существуют базы данных BioGRID, HPRD, STRING, PINA, InnateDB, PhosphositePlus, PTMcode, Interactome3D, NetworkKinomeX, содержащие тщательно отобранную и проверенную информацию о взаимодействии белков друг с другом, их фосфорилировании и других изменениях при воздействии того или иного агента [639, 641].

Примеры препаратов, прошедших успешное репрофилирование

К настоящему времени появились специальные интернет-ресурсы, посвященные репрофилированию лекарственных препаратов, среди которых одними из наиболее информативных являются Drug Repurposing Portal (<http://www.drugrepurposingportal.com>), предоставляющие информацию по новостям, методам, а также финансированию и сотрудничеству в области исследований по репрофилированию лекарственных препаратов и “Repurposing drugs in oncology” (ReDO, <http://www.redo-project.org>), международный проект организованный Бельгийским противораковым фондом и американской организацией GlobalCures, предоставляющей подробные результаты клинических и доклинических исследований по репрофилированию лекарственных средств.

Наиболее успешными примерами репрофилирования в онкологической практике, являются препараты следующих классов:

1) Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), среди которых наилучшие результаты были получены для Диклофенака.

Диклофенак представляет собой производное фенилуксусной кислоты, которое применяется с 60-х годов прошлого века в качестве противовоспалительного, жаропонижающего и обезболивающего средства. Механизм его противовоспалительного действия заключается в ингибировании провоспалительного гена циклооксигеназы (COX-2). Этот же процесс лежит в основе противоопухолевого действия диклофенака, поскольку подавление COX-2 также снижает пролиферацию клеток и их жизнеспособность. Так, было показано, что диклофенак проявляет антипролиферативный эффект на клеточных линиях рака толстой кишки, нейробластомы, глиобластомы, глиомы, меланомы, РЯ. Более того, *in vivo* было продемонстрировано значительное сокращение объема опухоли на моделях рака толстой кишки, поджелудочной железы и меланомы у мышей. Однако в экспериментах с перевиваемым РЯ противоопухолевый эффект был незначительным. Также представляют интерес исследования, посвященные изучению цитотоксичности диклофенака в комбинации с ингибиторами киназ и других ферментов. В частности, наиболее выраженный противоопухолевый эффект был описан для комбинации диклофенака с мульткиназным ингибитором сорафенибом. Немногочисленные

клинические исследования по использованию диклофенака при РМЖ и немелкоклеточного РЛ (НМКРЛ) свидетельствуют о том, что он увеличивает общую выживаемость больных по сравнению с пациентами, не получавшими препарат. Клинические испытания продолжаются в настоящее время [643].

2) Антипаразитарные препараты

Ацетурат диминазена представляет собой ароматический диамидин, который с 1955 года используется для борьбы с трипаносомозом у животных. Механизм действия ацетурата диминазена основан на ингибировании аэробного гликолиза и синтеза ДНК у простейших, что приводит к разрушению их клеточной структуры и гибели. Однако помимо его применения в этой области данное соединение благодаря известному токсикологическому профилю является идеальной платформой для разработки новых терапевтических средств. Диминазен хорошо известен по механизму связывания с ДНК как АТ-специфичный узкобороздочный лиганд [644] и является конкурентом в связывании с ДНК с PARP1 [645], однако недавно было показано так же, что его сродство к G-квадруплексам в 1000 раз превышает сродство к двухцепочечной ДНК с константой диссоциации, приближающейся к 1 нМ, что является одной из самых сильных аффинностей, зарегистрированных на настоящий момент [646, 647]. Эти данные представляют хорошую отправную точку для разработки новых G-квадруплексных лигандов в качестве химиотерапевтических препаратов. В качестве потенциальных противоопухолевых препаратов представляются интересными различные комплексы беренила с платиной, для которых на клеточных линиях рака молочной железы MCF-7, MDA-MB-231, и на линии Т-клеточного лейкоза человека Molt-4 было показано усиление образования активных форм кислорода, уменьшение активности антиоксидантных ферментов (например, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы) и уменьшение уровней антиоксидантов (глутатиона, витаминов E и A) [648, 649]. Антипролиферативная активность платиновых производных беренила была выше, чем эффект цисплатина [650, 651]. Для ряда производных также показано увеличение экспрессии проапоптотического гена *Bax*, цитохрома C и каспазы-9 (активация митохондриального апоптотического пути) и увеличение концентрации каспазы-8 (инициирование внешнего апоптотического пути) [652].

3) Иммуносупрессоры

Рапамицин (сиролимус) представляет собой липофильный антибиотик и ингибитор сигнального пути mTOR, был введен в клиническую практику в 1999 г в качестве иммуносупрессора для предотвращения отторжения трансплантатов. Поскольку опухоли многих типов характеризуются повышенной активностью mTOR, впоследствии были протестированы противоопухолевые свойства рапамицина. Для хронического миелолейкоза (ХМЛ), резистентного к иматинибу, и для ОМЛ была показана противоопухолевая активность данного

препарата. Более того, было продемонстрировано, что рапамицин способен восстанавливать чувствительность к глюкокортикоидам (ГС) у пациентов с ОЛЛ [626, 653]. Интересным является тот факт, что в наших исследованиях при поиске генов, отвечающих за побочное действие ГС, был идентифицирован ген *REDD1* (консервативный индуцируемый стрессом ингибитор mTOR). Биоинформатический скрининг предполагаемых ингибиторов *REDD1* с помощью аналитической системы CMap, а затем LINCS, позволил отобрать 1500 зарегистрированных лекарственных препаратов, где одним из наиболее потенциально эффективных ингибиторов являлся рапамицин. Далее в исследованиях *in vitro* и *in vivo* была подтверждена способность рапамицина ингибировать *REDD1* и модулировать активацию глюкокортикоидного рецептора в сторону снижения побочных эффектов [553, 654]. Таким образом, перспективность использования рапамицина в терапии гемобластозов для оптимизации ее эффективности и безопасности была показана и на молекулярном уровне. В настоящее время клинические исследования проходят ряд аналогов рапамицина, эверолимус, темсиролимус и дефоролимус. Следует отметить, что темсиролимус был введен в клиническую практику для использования в химиотерапии почечно-клеточного рака более 10 лет назад.

4) Противоконвульсивные препараты

Депакин (вальпроевая кислота, valproic acid, VPA), относящийся к семейству короткоцепочечных жирных кислот, используют в качестве препарата для лечения конвульсий и мигреней. VPA была включена в тестирование ее противоопухолевых свойств после того, как противоконвульсивное средство, 1-метил-1-циклогексанкарбоновая кислота (МССА), проявило противоопухолевую активность. Для VPA также были продемонстрированы противоопухолевые свойства на клетках лейкоза человека. В дальнейших исследованиях было показано, что VPA способна ингибировать гистоновые деацетилазы (HDAC), и вероятно, этим объясняется ее способность подавлять жизнеспособность и инвазивный потенциал опухолевых клеток, а также стимуляцию неоангиогенеза и метастазирования [655–657]. Кроме того, было показано, что VPA подавляет продукцию цитокинов и модулирует активацию провоспалительных сигнальных каскадов в опухолевых клетках. В частности, в клетках моноцитарного лейкоза, рака предстательной железы и глиомы наблюдали подавление экспрессии IL-6 и TNF- α [623]. Более того, в клетках меланомы VPA увеличивает уровень ацетилирования белков семейства STAT, что стимулирует связывание STAT-1 с NF- κ B и снижает его активность. В клинических исследованиях было проведено тестирование VPA как противоопухолевого агента для моно- и полихимиотерапии. В испытаниях, направленных на терапию рецидивов глиобластомы, рака щитовидной железы, острого миелолейкоза (ОМЛ), резистентных лейкозов, мелкоклеточного РЛ (МКРЛ) и НМКРЛ, В-клеточной лимфомы, РМЖ, меланомы, рака предстательной железы и

высокозлокачественных сарком, были получены результаты, свидетельствующие об эффективности VPA как противоопухолевого препарата [623].

5) Гипотензивные препараты

Пропранолол, относящийся к неселективным бета-адреноблокаторам, широко используется в кардиологической практике. Изначально он был предложен в качестве средства коррекции серьезного побочного эффекта преднизолона, развивающегося в ходе лечения инфантильной гемангиомы (ИГ) – обструктивной гипертрофической кардиомиопатии. Однако в 2008 году группой исследователей был открыт антиангиогенный эффект препарата при лечении ИГ [658]. Дальнейшие исследования показали, что он блокирует воздействие катехоламинов на клетку, таким образом снижая экспрессию генов, задействованных в ангиогенезе, таких как VEGF и MMP [659, 660]. В 2014 FDA одобрило использование пропранолола гидрохлорида в первой линии терапии ИГ, требующей системной терапии. Кроме того, эффективность применения бета-блокаторов в онкологии продемонстрирована не только в отношении ИГ. Так, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* пропранолол активирует апоптоз и инициирует арест клеточного цикла в клетках злокачественной меланомы, РМЖ и рака печени [661–663]. Помимо химиотерапии, в настоящее время предпринимаются попытки применения препарата в хирургической практике. В частности, в пилотном исследовании периоперационное введение пропранолола снижало сывороточное содержание СА-125 после операции в сравнении с пациентами, его не получавшими [664]. Несмотря на то, что данный проект является пилотным, полученные результаты могут стать толчком в дальнейшем исследовании пропранолола в хирургической практике.

6) Противоопухолевые препараты

Перепрофилирование противоопухолевых препаратов также широко распространено. Примером такого перепрофилирования является иринотекан, производное кампотецина, пролекарство (+)-7-Этил-10-гидроксикамфотецин-10-[1,4'-биперидин]-1'-карбоксилат гидрохлорид, которое в процессе метаболизма превращается в мощный специфический ингибитор фермента топоизомеразы 1 (Top1) SN-38. Механизм противоопухолевой активности иринотекана основывается на стабилизации переходных комплексов ДНК-Top1 молекулой SN-38, что препятствует последующему лигированию цепи ДНК. В процессе столкновения ДНК-или РНК-полимераз в стабильном комплексе ДНК-Top1-SN-38 происходит повреждение ДНК, что приводит к апоптозу. Наиболее изученным онкологическим заболеванием в отношении экспрессии Top1 является рак толстой кишки. Доказано, что существует положительная корреляция между уровнем экспрессии гена Top1, количеством и активностью фермента Top1 в тканях опухоли [665]. Ингибиторы Top1, в частности, иринотекан, широко применяются для лечения местнораспространенного и метастатического рака ободочной и прямой кишки [666].

Однако за последние 7-10 лет был проведен ряд исследований, подтверждающих, что повышение уровня экспрессии Top1 отмечается также при опухолях другого генеза. Так, возможно использование иринотекана в комбинации с другими химиопрепаратами при РЯ, раке желудка и МКРЛ. Активно исследуется возможность применения иринотекана в виде монотерапии или в комбинации с другими препаратами при опухолях головного мозга, саркомах, немелкоклеточном раке лёгких, раке пищевода. Особый интерес представляет использование иринотекана в качестве второй линии химиотерапии метастатического РМЖ, при котором в 41% случаев наблюдается повышение уровня экспрессии Top1 [665, 667]. Наиболее эффективным является использование иринотекана в комбинации с цетуксимабом при лечении тройного негативного РМЖ [668].

За последние 10-15 лет интерес к перепрофилированию лекарственных препаратов резко возрос. Так, первые публикации по данной тематике в базе данных PubMed датируются 90-ми гг XX века и их весьма немного, в то время как за 2017-2018 гг в PubMed было загружено более 200 статей, посвященных проблеме поиска нового использования уже существующих лекарств. Большие объемы накопленных знаний о биологическом действии препаратов на организм, хорошо изученные процессы фармакокинетики и фармакодинамики, а также известные молекулярные мишени действия препаратов делают перепрофилирование лекарственных средств востребованным на фармацевтическом рынке. Однако только некоторые из описанных препаратов в настоящее время одобрены для использования в клинической практике для терапии онкологических заболеваний (талидомид, целекоксиб, золендроновая кислота и др.). Для многих других соединений в процессе исследований было показано, что молекулярные механизмы их действия сложнее, чем предполагалось, что, в свою очередь, может приводить к развитию осложнений, которые трудно спрогнозировать. Более того, упомянутые побочные эффекты и/или отсутствие достаточной эффективности перепрофилируемого препарата в отношении конкретного заболевания в многих случаях обнаруживают только на III фазе клинических испытаний, наиболее дорогостоящей стадии введения лекарственного средства в клинику. Соответственно, использование в разработках противоопухолевых препаратов молекул с уже известным молекулярно-биологическим профилем активности в многом упрощает задачу исследователей, но не решает полностью проблему увеличения эффективности и снижения стоимости химиотерапии онкологических заболеваний. Однако в заключение хотелось бы отметить, что в целом данная идея о перепрофилировании созвучна все более ярко проявляющейся идее существования общества в настоящее время – переходу от чрезмерного потребления ресурсов к рациональному их использованию и грамотной переработке.

1.4. Заключение

В обзоре литературы были рассмотрены физиологические, биохимические и молекулярные механизмы действия глюкокортикоидов, как лежащие в основе их противоопухолевых эффектов, так и способствующие малигнизации опухоли и развитию метаболических и атрофических побочных эффектов. Очевидна плеiotропность эффектов глюкокортикоидов и их зависимость от условий окружающей среды, типа клеток, стадии заболевания и др. В связи с этим, выделение и направленная регуляция отдельных GR-зависимых процессов, является актуальным для конкретизации мишеней GR-опосредованной терапии гемобластозов, повышению ее безопасности и эффективности.

По данным литературы, одним из наиболее перспективных подходов к избирательной активации GR является использование селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), запускающих механизм транс-репрессии, ассоциированный с реализацией терапевтического действия. Определенные успехи в исследовании новых SEGRA стероидной и нестероидной структуры описаны в литературе, наработаны методы и подходы к разработке новых химических соединений, оптимизации их доставки и определению эффективности терапевтического действия. Одно из известных и изученных SEGRA, соединение CpдA, было протестировано в представленной работе в качестве противоопухолевого препарата. Приведенные в обзоре литературы данные позволяют предложить пути повышения эффективности терапии злокачественных новообразований путем селективной активации транс-репрессорных механизмов действия GR с использованием энантиомеров CpдA и его более стабильных химических производных.

Другим возможным подходом к повышению безопасности и эффективности GC является поиск «генов побочных эффектов» глюкокортикоидов, функции ряда из которых описаны в данном обзоре литературы, и подавление их экспрессии и/или активности кодируемых ими белков. Перспективным является подбор ингибиторов таких генов с помощью биоинформатического скрининга на основании идеи перепрофилирования лекарственных препаратов. В представленной работе в качестве подхода к подавлению побочных эффектов глюкокортикоидов будет рассмотрено ингибирование гена REDD1 с помощью препаратов, отобранных в результате биоинформатического скрининга.

К настоящему времени накоплены многочисленные экспериментальные данные о механизмах как терапевтического действия GC при лечении лейкозов. Таким образом, представленная работа, с точки зрения уже описанных в литературе результатов, является актуальной и своими целями и задачами отвечает современным тенденциям в области исследованиях GR-зависимой терапии злокачественных новообразований.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Список используемых реактивов

1. GCP60474, «LC laboratories», США
2. MLN4924, «Calbiochem», США
3. OSI-027, «Selleck Chemicals», США
4. Агар-агар бактериологический, «Диаэм», Россия
5. Агароза, «Fisher Biotech», Испания
6. Ампициллин, «ПанЭко», Россия
7. Аполипопротеин-1, «Meridian Life Sciences», США
8. п-Ацетоксистирол, «Sigma-Aldrich», США
9. Борная кислота, «Sigma-Aldrich», США
10. Бортезомиб (BZ), «LC Chemicals», США
11. Бромистый этидий, «Sigma-Aldrich», США
12. Винкристин (Vinc), «Sigma-Aldrich», США
13. Гематоксиллин, «BioVitrum», Россия
14. Гентамицин, «ПанЭко», Россия
15. Гептан, «Химмед», Россия
16. Гидроксиметан, «Химмед», Россия
17. Гистомикс, среда для заливки блоков, «BioVitrum», Россия
18. Глицерин, «Serva», Германия
19. (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), «ПанЭко», Россия
20. Дексаметазон (Dex), «Sigma-Aldrich», США
21. Диметилсульфоксид (ДМСО), «ПанЭко», Россия
22. 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), «ПанЭко», Россия
23. (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфобензил)-2Н-тетразолиум (МТS), «Sigma-Aldrich», США
24. Диметилформамид (ДМФА), «Химмед», Россия
25. Диминазен, «Sigma-Aldrich», США
26. Дитиотрейтол (ДТТ), «ThermoFischer Scientific», США
27. Диэтиловый эфир, «Химмед», Россия
28. Дрожжевой экстракт, «ПанЭко», Россия
29. Доксорубицин (Dox), «Sigma-Aldrich», США
30. Изоамиловый спирт, «Химмед», Россия
31. Изопропиловый спирт, «Химмед», Россия

32. Иксазомиб (IXZ), «LC Chemicals», США
33. Йодистый пропиций (PI), «Sigma-Aldrich», США
34. Калий хлорид, «Химмед», Россия
35. Кальций хлорид, «Химмед», Россия
36. Карфилзомиб (CFZ), «LC Chemicals», США
37. Кислота серная, «Химмед», Россия
38. Кислота соляная, «Химмед», Россия
39. Клобетазол пропионат (CBP), «Sigma-Aldrich», США
40. Красители: бромфенол синий («Biotech», Англия), ксилен-цианол («Sigma-Aldrich», США)
41. Кротоновое масло, «Sigma-Aldrich», США
42. Ксилол, «Sigma-Aldrich», США
43. Левамизол (Leva), «Sigma-Aldrich», США
44. Липопротеины высокой плотности: 1,2-дипальмитоил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[3-(2-пиридилдитио)пропионат, 1,2-диолеoil-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[3-(2-пиридилдитио)пропионат, кардиолипин, 1,2-дилиноил-Sn-глицеро-3-фосфо- (10-глицерин), «Avanti Polar Lipids», США
45. Магний хлорид, «Химмед», Россия
46. Магний сульфат, «Химмед», Россия
47. Маркер молекулярного веса белков Page Ruler Plus, 10-250 kDa «ThermoFischer Scientific», США США)
48. Маркеры молекулярного веса НК: маркер 100 bp («Biotech», Англия), pBR322/TaqI, pBR322/BsuRI, lambda/EcoRI, Hind III («СибЭнзим», Россия)
49. Матрица формообразующая Matrigel Matrix, «BD Biosciences», США
50. Метронидазол (Met), «Sigma-Aldrich», США
51. Меди бромид, «Химмед», Россия
52. Метилен хлористый, «Химмед», Россия
53. Митоксантрон (Mito), «Sigma-Aldrich», США
54. Монтирующая среда Bio-Mount, «Sigma-Aldrich», США
55. Наночастицы золота, «Ted Pelle», США
56. Набор реактивов для выделения РНК RNAeasy kit, «Qiagen», США
57. Набор реактивов для выделения РНК из тканей TRIzol reagent kit, «ThermoFischer Scientific», США
58. Набор реактивов для выделения плазмидной ДНК QIAprep Spin Miniprep Kit, «Qiagen», США

59. Набор реактивов для определения активности люциферазы Luciferase Assay System, «Promega», США
60. Набор для определения аффинности препаратов к глюкокортикоидному рецептору PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor (GR) Competitor Assay, Green, «ThermoFischer Scientific», США
61. Набор реактивов для ПЦР, «Синтол», Россия
62. Набор реактивов для трансфекции Lipofectamine LTX, «Promega», США
63. Натрий ацетат, «Химмед», Россия
64. Натрий боргидрид, «Химмед», Россия
65. Натрий гидрид, «Химмед», Россия
66. Натрий гидроксид, «Химмед», Россия
67. Натрий дезоксихолат, «Химмед», Россия
68. Натрий додецилсульфат (SDS), «Химмед», Россия
69. Натрий хлорид, «Химмед», Россия
70. Натрий цитрат, «Химмед», Россия
71. Нетропсин (Net), «Sigma-Aldrich», США
72. Нонидет Р-40 (NP-40), «Amresco», США
73. Обратная транскриптаза MMLV, «Синтол», Россия
74. Олигонуклеотиды, синтезированные НПФ «Синтол», Россия
75. Пентамидин (Pent), «Sigma-Aldrich», США
76. Петролейный эфир, «Химмед», Россия
77. Пируват натрия, «ПанЭко», Россия
78. Преднизолон (Pred), «Sigma-Aldrich», США
79. Пурамицин, «Sigma-Aldrich», США
80. Рапамицин (Rapa), «LC laboratories», США
81. Раствор фикоλλα, «ПанЭко», Россия
82. Реагент для определения концентрации белков Bio-Rad Protein Assay, «Bio-Rad», США
83. Реагент для стереоселективного синтеза AD-mix- α , «Sigma-Aldrich», США
84. Реагент для стереоселективного синтеза AD-mix- β , «Sigma-Aldrich», США
85. РНКаза А, «ThermoFischer Scientific», США
86. Силикагель, «Химмед», Россия
87. 12-О-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат (ТРА), «Sigma-Aldrich», США
88. Тионилхлорид, «Химмед», Россия
89. Трабектедин (Trab), «Baxter Oncology», Германия
90. Триптон, «Диаэм», Россия

91. Тритон-X100, «Sigma-Aldrich», США
92. Трис-гидроксиметиламинометан, «Sigma-Aldrich», США
93. Физостигмин (Phys), «Sigma-Aldrich», США
94. Формалин 10% забуференный, «BioVitrum», Россия
95. Фосфорно-солевой буфер (PBS), «Flow Laboratories», Англия
96. Флуоцинолона ацетонид (FA), «Sigma-Aldrich», США
97. Хлороформ, «Химмед», Россия
98. Эметин (Eme), «Sigma-Aldrich», США
99. Эозин, «BioVitrum», Россия
100. Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (EDTA), «Sigma-Aldrich», США
101. Этиловый спирт

2.2. Список используемых приборов

1. Проточный цитофлуориметр FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США);
2. Спектрофотометр BioPhotometr Eppendorf, Германия;
3. Спектрофотометр NanoVue Plus GE Healthcare;
4. ПЦР-анализатор Bio-Rad iQ5 Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA;
5. Флуоресцентный микроскоп Zeiss;
6. Микропланшетный ридер Infinite F500 Tecan (Tecan, Австрия).

2.3. Синтез энантиомеров CpдA

Окисление соединения **1** в **2** проводили по методу Шарплесса (рис. 7) [669]. Реакция проходила с выходом 30% с использованием хиральных катализаторов AD-mix- α и AD-mix- β на стадии **A**. Невысокий выход обусловлен прохождением побочной реакции гидролиза ацетатного фрагмента, ввиду, основных условий реакции. Получение соответствующего тозилата **3** проводилось по стандартной методике для такого типа диолов [669], при этом получился только продукт тозилирования первичной гидроксильной группы (выход 85%). Стадия **C** включала в себя образование эпоксида, после обработки субстрата эквивалентным количеством гидрида натрия в диметилформамиде, а затем раскрытия получившегося эпоксида бокированным производным метиламина по наименее замещенному атому углерода по механизму $S_N 2$ (75%). Соединение **4** было обработано одним эквивалентом хлористого тионила в диоксане при отрицательной температуре, продуктом реакции было соединение **5** (выход 88%). Дальнейшее снятие защиты позволило получить соединение **6** (выход 50%). Снятие защитной группы проводили в диэтиловом эфире, насыщенном соляной кислотой, что позволяет избежать протекания побочной реакций гидролиза ацетатного фрагмента. На рисунке 7 представлена

схема синтеза R-энантиомера СpdА. Спектр ЯМР ^1H (400 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$): 2.24 м.д. (s., 3H); 2.51 - 2.53 (m. 3H); 3.19 - 3.27 (m., 2H), 4.88 – 4.91 (m., 1H); 6.84 – 6.86 (d., 2H); 7.17 – 7.19 (d., 2H).

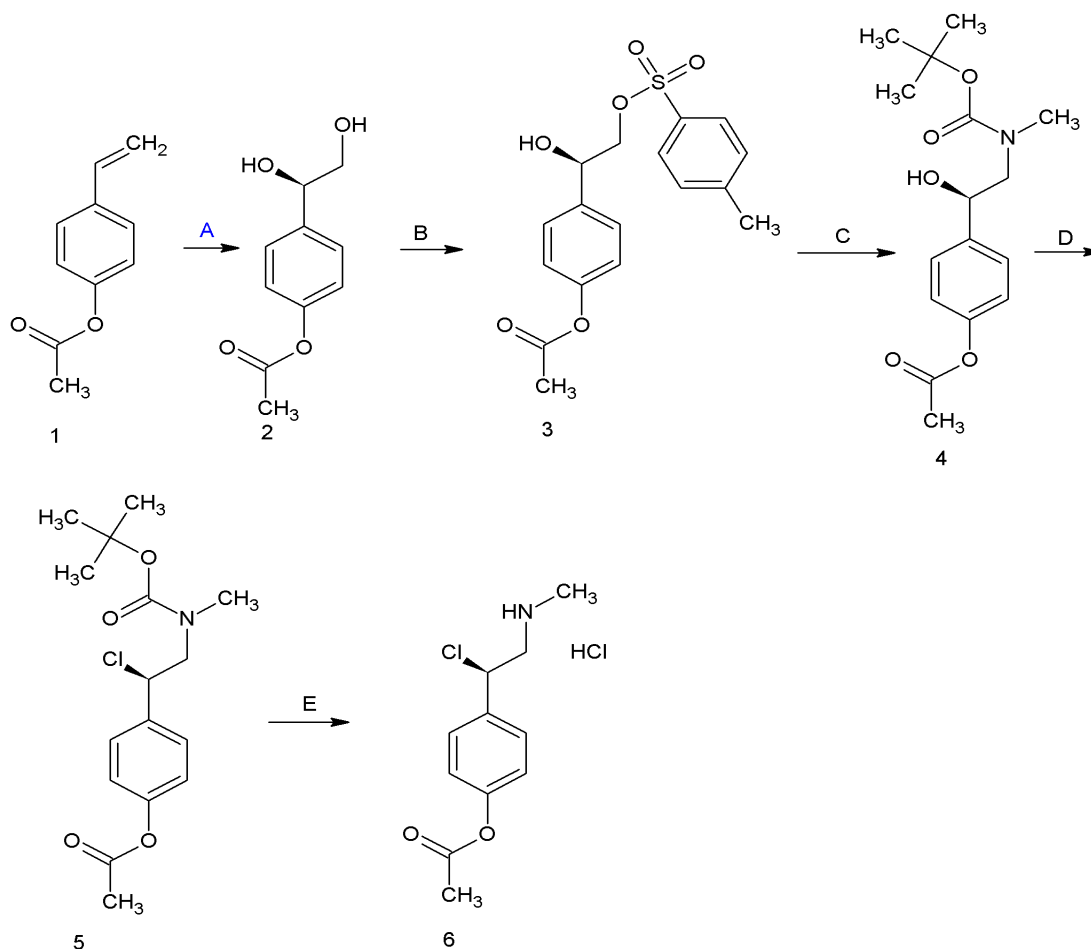


Рисунок 7 - Схема синтеза R-изомера СpdА

2.4. Синтез химических производных СpdА

Первая синтетическая стратегия включает четырех стадийный метод исходя из коммерчески доступных 1-арилэтанолов. На первой стадии проведено региоселективное бромирование, дальнейшее нуклеофильное замещение на пиперидиновый остаток протекает в хлористом метиле в присутствии двукратного избытка пиперидина. Последующее восстановление боргидридом натрия приводит к аминспирту. Целевое соединение было получено кипячением аминспирта в токе сухого хлористого водорода в абсолютном диэтиловом эфире (Рисунок 8).

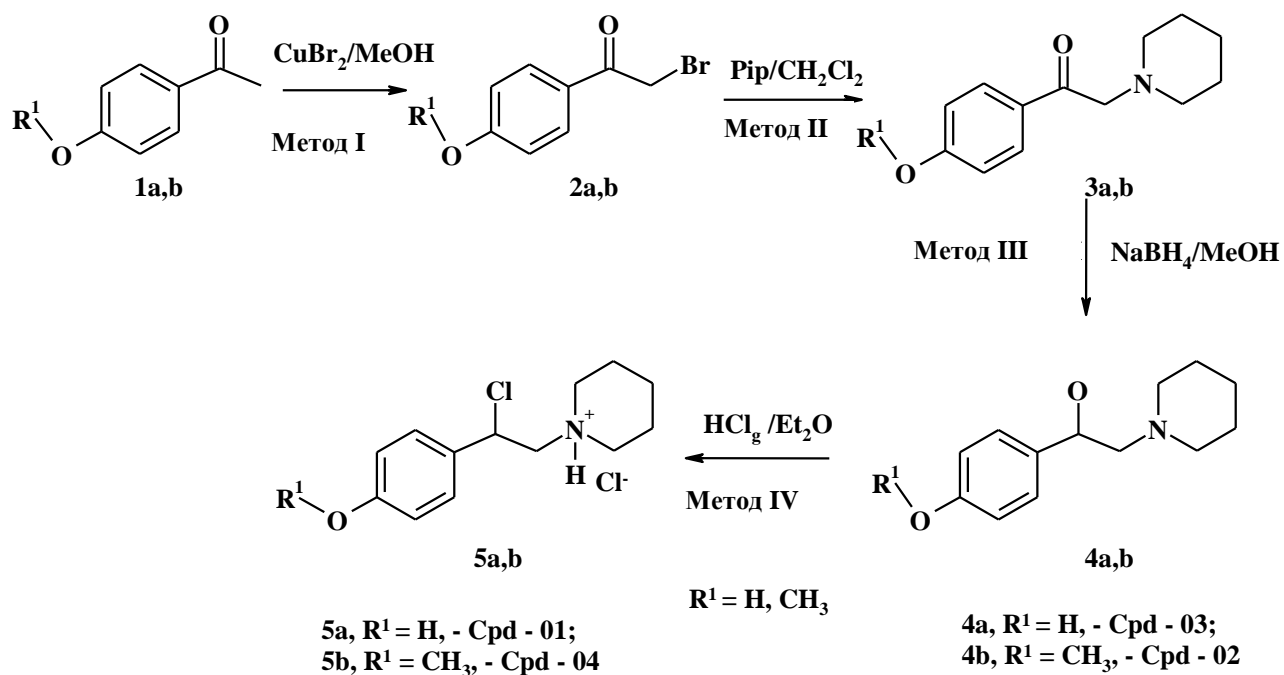


Рисунок 8 - Схема синтеза пиперидиновых химических производных CpdA

Метод I. Синтез бромкетонов 2a,b

Смесь ацетофенона **1** (3.00 ммоль) и бромида меди (II) (7.50 ммоль) в метаноле (15 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем – кипятили до полного исчезновения в реакционной массе исходного кетона (контроль при помощи тонкослойной хроматографии (ТСХ)), вылили в ледяную воду (200 мл), экстрагировали хлористым метиленом (3×60 мл), объединённые органические фазы промыли водой (3×40 мл), профильтровали через слой (1 см) силикагеля, упарили и остаток очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (элюент петрол. эфир/этилацетат 6:1). Полученный твердый остаток перекристаллизовали из смеси петролейный эфир-этилацетат.

Метод II. Получение аминокетонов 3a,b

Смесь бромкетона **2** (0.26 ммоль), пиперидина (0.55 ммоль) в абс. хлористом метиле (8 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, затем – кипятили до полного исчезновения в реакционной массе исходного бромкетона (ТСХ-контроль), вылили в ледяную воду (60 мл) и экстрагировали хлористым метиленом (3×20 мл). Объединённые органические фазы промыли водой (2×30 мл), высушили над сульфатом магния, упарили, остаток очистили с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (элюент петрол. эфир / этилацетат/Et₃N 3:1;0.05). Твердый остаток перекристаллизовали из смеси петролейный этанола.

Метод III. Синтез аминоспиртов 4a,b

К охлажденному до 10 °С раствору аминокетона **3** (3.0 ммоль) в абс. метаноле (30 мл) порциями добавили боргидрид натрия (30 ммоль) и перемешивали раствор при комнатной температуре в течение 5 часов. Реакционную смесь вылили в воду (150 мл), экстрагировали этилацетатом (3×30 мл), экстракт промыли водой (50 мл) и упарили. Остаток очистили хроматографически (элюент петролейный эфир / этилацетат/Et₃N 1:1:0,05), диастереомеры не были разделены. Остаток перекристаллизовали из смеси хлористый метилен -гептан.

Метод IV. Синтез аналогов CpдA 5a,b

Через раствор аминоспирта **3** (3.0 ммоль) в абс. диэтиловом эфире (60 мл) при перемешивании и кипячении пропускали сухой хлористый водород в течение 20 ч. После охлаждения реакционной смеси выпавший белый осадок отфильтровали и тщательно промыли абсолютным диэтиловым эфиром. Остаток сушили под вакуумом при комнатной температуре.

Второй синтетический протокол базируется на подходе, где ключевой стадией является синтез аминоспиртов по реакции азометинового илида с ароматическими альдегидами [670]. Азометиновый ирид получают *in situ* взаимодействием саркозина с параформальдегидом. Дальнейшее кипячение аминоспирта в токе сухого хлористого водорода в абсолютном диэтиловом эфире (Рисунок 9).

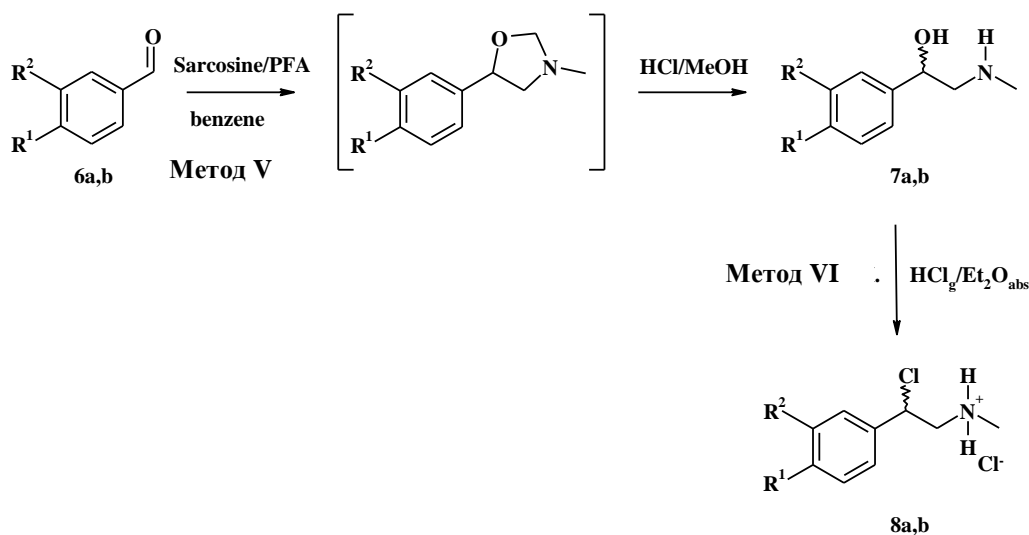


Рисунок 9 - Схема синтеза химических производных CpдA из ароматических альдегидов

Метод V. Синтез аминоспиртов 7a,b.

Смесь соответствующего ароматического альдегида (1,0 ммоль), тонко измельченного саркозина (1,5 ммоль) и параформальдегид (3,0 ммоль) кипятят с обратным холодильником в сухом бензоле (5,0 мл) при перемешивании и снабженной ловушкой Дина-Старка, в течение 15 ч. После полного исчезновения в реакционной массе исходного альдегида (ТСХ-контроль),

полученный раствор упаривают в вакууме с получением маслянистого остатка, который были использован без дополнительной очистки. Для получения аминоспиртов 7a,b соответствующий масляный остаток (оксазолидин) растворяют в гидроксиметане (3 мл) и обрабатывали концентрированной соляной кислотой (0,30 мл). Полученную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 1,5 ч, затем реакционную смесь подщелочили до нейтральной среды и экстрагировали хлористым метиленом (2x15 мл). После отгонки растворителя остаток очистили хроматографически (элюент петролейный эфир / этилацетат/Et₃N 1:1:0,05), диастереомеры не были разделены. Остаток перекристаллизовали из смеси хлористый метилен-гептан.

Метод VI. Синтез аналогов SpdA 8a,b

Через раствор аминоспирта 7 (3.0 ммоль) в абс. диэтиловом эфире (60 мл) при перемешивании и кипячении пропускали сухой хлористый водород в течение 20 ч. После охлаждения реакционной смеси выпавший белый осадок отфильтровали и тщательно промыли абсолютным диэтиловым эфиром. Остаток сушили под вакуумом при комнатной температуре.

2.5. Синтез наночастиц золота и липопротеинов высокой плотности (HDL NP)

Для синтеза HDL NP использовали 5 мл суспензии наночастиц золота диаметром 5 нм, стабилизированных цитратом натрия («Ted Pella», США.), которые инкубировали в присутствии 5-кратного молярного избытка аполипопротеина-1 в стеклянной посуде при комнатной температуре в течение 2 ч при периодическом перемешивании. После инкубации добавляли растворенные в хлороформе липиды внутреннего слоя образующейся наночастицы 1,2-дипальмитоил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N- [3- (2-пиридилдитио) пропионат и 1,2-диолеоил-Sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N- [3- (2-пиридилдитио)пропионат в 250-кратном молярном избытке и быстро перемешивали образовавшуюся суспензию. Далее добавляли липиды внешнего слоя кардиолипидов и 1,2-дипальмитоил-Sn-глицеро-3-фосфо- (10-гас-глицерин) в 125-кратном молярном избытке, а также SpdA в 5-кратном молярном избытке, быстро перемешивали образовавшуюся суспензию и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 ч при периодическом перемешивании. После инкубации полученные наночастицы подвергали 3-5 воздействиям ультразвука в течение 5-7 сек до тех пор, пока суспензия не приобрела молочно-розовый оттенок. Затем полученные HDL NP перемешивали при 63°C до полного испарения хлороформа, о чем судили по достижению раствором красного цвета. Далее HDL NP давали остыть и проводили их очистку с использованием фильтровальной системы Kros Flo II Tangential Flow Filtration System (Spectrum Labs, США).

2.6. Клеточные линии

В работе использовали клетки острого лимфобластного лейкоза линии СЕМ, любезно предоставленные д.б.н. Г.А. Посыпановой, МНИИМЭ, Москва, Россия, хронического миелолейкоза линии К562, лимфомы мантийной зоны селезенки линий NCEB, Jeko и Granta, любезно предоставленные проф. Бернштейном, университет Рочестера, Рочестер, США., трансформированные кератиноциты человека HaCaT, любезно предоставленные проф. Будуновой, университет Норсвестерн, США, а также первичные культуры моноядерной фракции клеток пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы НИИ клинической онкологии и НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Клетки культивировали в стандартной среде DMEM (HaCaT) или RPMI-1640 (СЕМ, Granta, К562, NCEB, Jeko, первичные трансформированные лимфобласты), содержащей 5%-ную эмбриональную сыворотку телят («РАА», Австрия) и гентамицин (50 ед/мл) при 37°С и в 5%-ном CO₂.

2.7. Определение цитотоксического эффекта и кинетики пролиферации

Эксперименты по определению кинетики пролиферации проводили путем прямого подсчета живых клеток с помощью автоматического счетчика клеток Celigo Cytometer («Cyntellect», США). Клетки высевали в 24-луночные платы с плотностью 50 тыс клеток/луноч. Через 24 ч после посева клетки обрабатывали исследуемыми соединениями, подсчет клеток проводили каждые 24 ч. Каждая экспериментальная или контрольная группа состояла из трех лунок.

Эксперименты по определению цитотоксического эффекта проводили с помощью МТТ-или МТС-теста. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты («BD Micro-FinePlus», США) (3000 клеток/луноч) и инкубировали 24 ч. В день экспериментов приготавливали разведения необходимых соединений. Клетки инкубировали с агентом в течении 24, 48 или 72 ч часов, затем вносили 20 мкл раствора реагента МТТ (5 мг/мл, «ПанЭко», Россия) или МТС (5 мг/мл, «Sigma-Aldrich», США) в солевом растворе Хэнкса («ПанЭко», Россия) и инкубировали 2 ч при 37°С до развития фиолетовой окраски в случае МТТ и коричневой окраски в случае МТС. Образовавшийся формазан или формазановый продукт растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, ПанЭко, Россия), инкубировали при 37°С. После полного растворения кристаллов формазана измеряли оптическую плотность содержимого лунок на мультилуночном спектрофотометре MultiScan MCC 340 (Labsystems, США) при длине волны 570 нм. Построение кривых выживаемости проводили по средним значениям жизнеспособности клеток. При построении за 100% жизнеспособность принимали оптическую плотность формазана в контрольных лунках, в которые был добавлен растворитель. Построение кривых и

определение величин воздействий, приводящих к 50% жизнеспособности относительно контроля (IC50), производили в программном пакете Origin Pro 8.1 (OriginLab, США). Эффективность совместного воздействия препаратов оценивали с помощью комбинационного индекса (combination index, CI) [671] по формуле:

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

где D1 и D2 – величины воздействий (концентрации препаратов), дающие 50% эффект в комбинации, а D501 и D502 – величины воздействий, требуемые для достижения такого же эффекта при отдельном применении данных воздействий. CI < 1, CI = 1 и CI > 1 показывают соответственно синергизм, аддитивный эффект или антагонизм рассматриваемых воздействий.

При построении изоболограмм использовали метод фиксированных доз [672]. На изоболограммах точками являются воздействия, при которых была достигнута гибель половины клеток. Первоначально на график наносили точки, соответствующие IC50 для двух препаратов при их отдельном применении и, следовательно, лежащие на координатных осях. Затем эти точки соединяли прямой (линией аддитивности). Экспериментальные точки, оказавшиеся лежащими на прямой, говорят об аддитивном эффекте двух воздействий; точки ниже или выше линии аддитивности соответствуют синергическому или антагоническому эффекту соответственно.

2.8. Определение уровня апоптоза

Уровень апоптоза определяли с помощью иммуноблоттинга по расщеплению полимеразы поли(АДФ-рибозы) (PARP). Также использовали метод проточной цитофлуориметрии после окраски йодистым пропидием (PI), для чего клетки центрифугировали, осадок суспендировали в 1 мл раствора, содержавшего 5 мкг/мл PI, 0,1% цитрата натрия и 0,3% NP-40. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США). Число апоптотических клеток (в процентах) определяли как пре-G1-пик на ДНК-гистограмме.

2.9. Выделение РНК и обратная транскрипция

Выделение тотальной клеточной РНК проводили с помощью набора для выделения РНК RNeasy kit в случае клеточных культур и TRIzol reagent kit в случае тканей. Концентрацию РНК определяли по оптической плотности раствора, измеренной на бесцветном спектрофотометре NanoVue (GE Healthcare, США) при длине волны 260 нм. Об отсутствии примесей в образце судили по соотношению значений оптической плотности раствора при длине волны 260 и 280 нм. После выделения РНК для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции. Для этого 1 мкг РНК смешивали с 0,4 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов, денатурировали при 4°C и охлаждали на льду. В смесь для обратной транскрипции входили: 2

ед. обратной транскриптазы MMLV, соответствующий буфер, 2 мМ дитиотрейтола, 0,5 ед. ингибитора рибонуклеаз, 0,5 мМ дНТФ, и дистиллированная вода до 20 мкл. Реакцию проводили при 37°C в течение 1 ч, затем останавливали реакцию инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 мин, добавляли 80 мкл дистиллированной воды и использовали аликвоты для проведения ПЦР-амплификации со специфическими праймерами.

2.10. Полуколичественный ПЦР-анализ

Реакция проводилась с использованием программируемого аппарата PTC-100 («MJ Research Inc», США), набора реактивов для ПЦР. Используемая реакционная смесь содержала 1х амплификационный буфер, 1,5 мМ MgCl₂, 0,8 мМ дНТФ, по 100 нг прямого и обратного праймера, 2 ед. Taq ДНК-полимеразы, 0,5 мкг геномной ДНК или кДНК, дистиллированная вода до конечного объема 25 мкл. Программа амплификации была следующей: 94° - 4 мин, (94°C - 30 секунд; 58°C – 30 секунд; 72°C – 45 секунд), 72°C - 8 мин, 4°C - окончание программы. ПЦР-продукты разделяли электрофоретически в 1,5% агарозном геле, количество ПЦР-продуктов оценивали с помощью анализатора Agilent 2001 Bioanalyzer и нормализовали по количеству ПЦР-продукта глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH).

2.11. Количественный ПЦР-анализ

Рабочие разведения кДНК после реакции обратной транскрипции были получены путем разведения образцов 1:10 стерильной деионизированной водой. 5 мкл рабочего раствора кДНК добавляли к 20 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green Master Mix, по 500 нМ обратного и прямого праймеров. Количественный ПЦР-анализ в режиме реального времени проводили с использованием ПЦР-анализатора Bio-Rad iQ5. Программа амплификации была следующей: 95°C – 10 мин, 40 циклов (95°C – 15 с, 60°C – 30 с, 72°C - 30 с). Относительное изменение экспрессии исследуемой мРНК вычисляли методом $\Delta\Delta C_t$, где $\Delta\Delta C_t$ определяли путем вычитания среднего ΔC_t контроля из ΔC_t экспериментальных образцов [654]. Для каждого анализируемого гена ПЦР-анализ был проведен в трех повторах, а также были получены кривые плавления для каждой пары праймеров для подтверждения специфичности. Анализ кривых плавления проводили при увеличении температуры с 55°C до 95°C с шагом 0,5°C. В качестве контроля использовали ген рибосомального белка L27 (*Rpl27*). Праймеры для амплификации кДНК были сконструированы с помощью базы данных Primer-Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) и пакета программ Oligo 6. Последовательности праймеров указаны в таблице 4.

Таблица 4 - Последовательность используемых праймеров

Ген		Последовательность (прямая/обратная)
мышь	человек	
<i>Il1b</i>		ATGCCACCTTTTGACAGTGATGA CTGAAGCTCTTGTTGATGTGCTG
<i>Il22</i>		AGTGAGAAGCTAACGTCCATCATT CTACCTCTGGTCTCATGGACAACCTT
<i>Mmp3</i>		TCTCTGAAGGAGAGGCTGACATA GGAATAGGTTGGTACCAGTGACA
<i>Nfkb/p50</i>		TATGTGGGGCCTGCAAAGGTTA TTTGCAAAGCCAACCACCATGT
<i>Redd1</i>		GCCCTGGTGGCTGGAATTGACC TTGCGCTTCAAAGCTGGGTCCC
<i>RelA/p65</i>		GATTCCGGGCAGTGACGC TGAGGGGAAACAGATCGTCCAT
<i>Rpl27</i>		GCC CTG GTG GCT GGA ATT GAC C TTG CGC TTC AAA GCT GGG TCC C
<i>S100a8</i>		AATCTTTCGTGACAATGCCGTCT TTATATTCTGCACAAACTGAGGACA
<i>S100a9</i>		TGGCAACCTTTATGAAGAAAGAGAA GCTTCTCATGACAGGCAAAGATCA
	<i>ARMCX3</i>	AGATGATACCGTTTTGTCCCCT AGACCACCCAGATCACGAATAAT
	<i>CCND1</i>	CTACCTTCCGCAGTGCTCCTA CCCAGCCAAGAAACGGTCC
	<i>CCND2</i>	GCTGGAGCCCGTGAAAAAGA CTCCGCCTCTGGCATTTTG
	<i>CLIC3</i>	CCTCAAGGGCGTACCTTTCAC GTCGCTGTCATAGAGCAGGA
	<i>CTH</i>	GGCCTGGTGTCTGTTAATTGT GCCATTCCGTTTTTGAAATGCT
	<i>CXCL6</i>	TGTTTACGCGTTACGCTGAGAG TTCAGGGAGGCTACCACTTCCA
	<i>FKBP51</i>	GAATGGTGAGGAAACGCCGAT TGCCAAGACTAAAGACAAATGGT
	<i>GILZ</i>	AACACCGAAATGTATCAGACCC TGTCCAGCTTAACGGAAACCA
	<i>IL-1β</i>	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA
	<i>IL-6β</i>	AATTCGGTACATCCTCGACGG TTGGAAGGTTTCAGGTTGTTTTCT
	<i>KLF9</i>	GAAACACGCCTCCGAAAAGAGG GAAAGGGCCGTTACCTGTATG

Ген		Последовательность (прямая/обратная)
мышь	человек	
	<i>KRT1</i>	TTGACAAGGTGAGGTTCTCTGG TTGGTCCACTCTCTCTCGGA
	<i>MKP-1</i>	ACCACCACCGTGTTCACCTTC TGGGAGAGGTCGTAATGGGG
	<i>MMP13</i>	TCCTGATGTGGGTGAATACAATG GCCATCGTGAAGTCTGGTAAAAT
	<i>MYB</i>	ATCTCCCGAATCGAACAGATGT TGCTTGGAATAACAGACCAAC
	<i>NFE2L1</i>	CATTCTGCTGAGTTTGATTGGGG TTGTGGAACTGGGTCTGAGTAT
	<i>REDD1</i>	TAGCCTTTGGGACCGCTTCTCGT CAGGTAAGCCGTGTCTTCCTCCG
	<i>RPL27</i>	ACCGTACCCCCGCAAAGTG CCCGTCGGGCCTTGCGTTTA
	<i>SES2</i>	CCTCTGGGCGAGTAGACAAC GGAGCCTACCAGGTAAGAACA
	<i>SERPINA9</i>	GTGCTCCAATCTACTGTGTGTC AAAGTCGGTGTGAGGGAATAC
	<i>STS</i>	TCCCGCACTGGAGTTTCC CCGTGATGTAAAGGGTGGTGA
	<i>TP53INP1</i>	TTCCTCCAACCAAGAACCAGA GCTCAGTAGGTGACTCTTCACT
	<i>RANKL</i>	CAGCATCGCTCTGTTCTGTGA CTGCGTTTTTCATGGAGTCTCA
	<i>OPG</i>	ACCCAGAAACTGGTCATCAGC CTGCAATACACACACTCATCACT

2.12. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез проводили в 0.7 -2 %-ном агарозном геле при напряжении 60 В в стандартном Трис-боратном буфере (ТВЕ), (рН 8), содержащем 0,089 М Трис-НСl, 0,089 М 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% ксиллцианола, 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.

2.13. Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS

Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS проводили в соответствии с методом, описанном Лэммли [673]. 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.

2.14. Вестерн блоттинг

Для проведения Вестерн блоттинга тотальные клеточные лизаты выделяли, используя RIPA буфер (10 mM Трис, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM 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 mM Трис-HCl, 5 mM KCl, 1 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 1% NP-40) и ядерной (20 mM Трис-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 0,05% NP-40, 1 mM 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 иммуоблоттинга использовали антитела к GR- α (кроличьи антитела в разведении 1:500 и 1:2000 производства «Santa Cruz Biotechnology», США), расщепленной PARP, p-гpS6, 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 («Bio-Rad», США) в TBS-буфере (20 mM Трис-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl), затем инкубировали с первичными антителами в течение 6 ч при комнатной температуре. В качестве контроля использовали антитела к актину, GAPDH и гистоновой деацетилазе-1 (HDAC-1) («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.

2.15. 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 CaCl₂ (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 °C в течение 10 мин. В пробирки добавляли 800 мкл среды LB и инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. Содержимое пробирок растирали на чашках Петри с L-агаром и ампицилином. Чашки оставляли в термостате при 37°C на ночь.

2.16. 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 готового набора QIAprep Spin Miniprep Kit («QIAGEN», США) в соответствии с рекомендациями фирмы производителя. Концентрация полученной ДНК измеряли на бескуветном спектрофотометре NanoVue (GE Healthcare, США).

2.17. 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 H₂O 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.

2.18. Использованные генетические конструкции

Для получения трансформированных клеток с измененной экспрессией GR («System Bioscience», США) использовали лентивирусные вектора, представленные на рисунке 10А. Для получения трансформированных клеток, экспрессирующих ген люциферазы светлячка под

контролем минимального CMV-промотора, содержащего сайты связывания NF- κ B и GR, а также для получения трансформированных клеток с измененной экспрессией GR («System Bioscience», США) использовали лентивирусные вектора («System Bioscience», США), представленные на рисунке 10B.

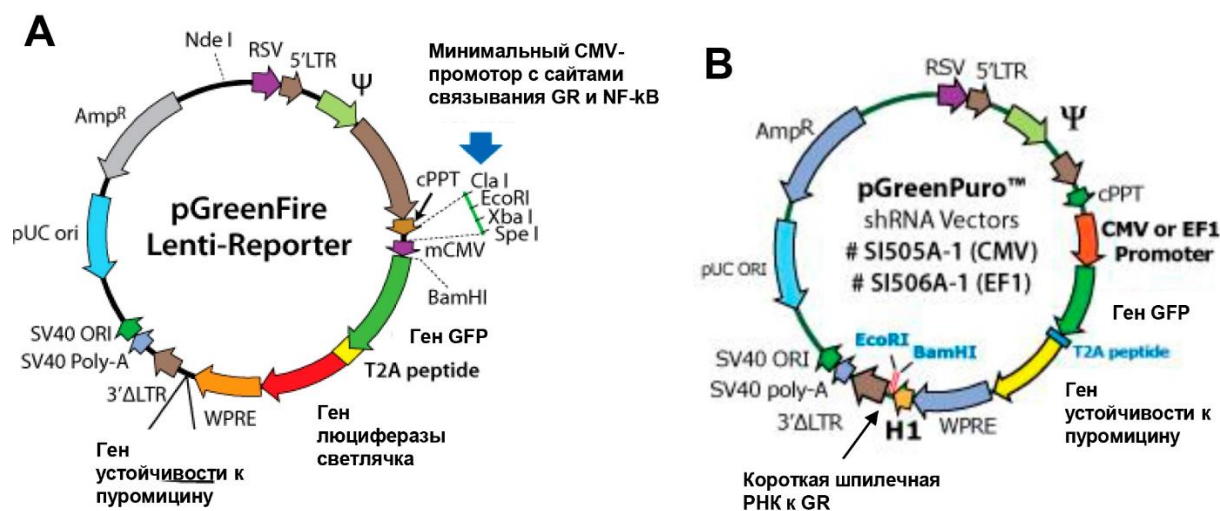


Рисунок 10 - Структура используемых генетических конструкций

2.19. Трансдукция клеток лентивирусными векторами

Вирусные стоки высокого титра получали путем ко-трансфекции клеток линии 293T 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. В результате инфекции были получены стабильные линии клеток. Далее полученные трансформированные клетки культивировали на селективной среде, содержащей антибиотик пурамицин. Эксперименты с полученными трансформированными клеточными линиями проводили через 7-14 суток после проведения трансдукции.

2.20. 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).

2.21. Оценка связывания лигандов GR с рецептором

Анализ связывания CpdA, CpdA-01, CpdA-03-05, и Dex проводили с использованием набора PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor Competitor Assay («ThermoFischer Scientific», США) по протоколу производителя. В 96-луночном черном планшете смешивали буферный раствор, содержащий рекомбинантный GR в концентрации 4 нМ, буферный раствор, содержащий 2,5 нМ флуоресцентно-меченого лиганда GR Fluormone GS1, а также водные растворы исследуемых соединений в конечных концентрациях 0,1 нМ-0,1 мМ. Далее пробы инкубировали в защищенном от света месте при комнатной температуре 4 ч. Поляризацию флуоресценции измеряли на микропланшетном ридере Infinite F500 Tecan (волна возбуждения 485 нм, эмиссии - 535 нм). За концентрацию тестируемого соединения, при которой наблюдалось 50% ингибирование связывания Fluormone GS1 (IC50), принимали ту концентрацию соединения, при которой наблюдалось уменьшение поляризации комплекса GR с Fluormone GS1 в 2 раза.

2.22. Бактериальный тест на мутагенную активность Эймса

Изучение потенциальной мутагенной активности было проведено в соответствии с рекомендациями авторов теста [674]. Были использованы индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA98 (генотип hisD3052 rfa uvrB/pKM101) и TA100 (генотип hisG46 rfa uvrB/pKM101). Индукция ферментов микросомного окисления была осуществлена с помощью предварительного введения крысам линии «Вистар» смеси полихлорированных бифенилов «Совол» однократно, в дозе 300 мг/мл внутрибрюшинно, за 5 суток до забоя [675]. После забоя животных вскрывали, извлекали печень, ткань печени гомогенизировали и центрифугировали при 9000 об/мин, в течение 10 мин, при 4°C. Супернатант отбирали и использовали в качестве источника микросомных белков (фракция S9). Микросомная активирующая смесь состояла из 6 мг/мл б1 белка фракции S9, 4 мМ НАДФ, 5 мМ глюкозо-6-фосфата, 33 мМ KCl, 8 мМ MgCl2 и 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,4. В 0,7% L-агар без гистидина последовательно вносили 0,1 мл препарата необходимой концентрации, 0,1 мл суспензии бактерий, 0,5 мл микросомной активирующей смеси (либо соответствующий объем буфера). После полного застывания L-агара чашки Петри помещали в термостат при 37°C. Учёт результатов проводили через 48-72 часа инкубации. В качестве положительных контролей были использованы вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров при наличии или в отсутствие активации смесью S9. Для вариантов тестирования без активирующей смеси был использован азид натрия и 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дизапирен (ДДТДП) [676, 677]. При использовании активирующей фракции S9, ее активность контролировали по эффекту бенз(а)пирена и 2-аминофлуорена (2-АФ). Стоковые растворы тестируемых соединений готовили в стерильном ДМСО; для приготовления дальнейших разведений использовали

стерильную бидистиллированную воду. Мутагенный эффект считался положительным при двукратном превышении числа мутантных колоний в опыте по сравнению с соответствующим контролем.

2.23. Выделение моноцитарной фракции клеток крови пациентов

Выделение моноядерной фракции клеток из образцов, полученных от пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы, проводили с помощью центрифугирования в течение 25 мин. при 650g. в градиенте Фиколла [678].

2.24. Анализ профилей экспрессии генов на ДНК-микрочипах Illumina

Тотальная мРНК была выделена из клеток Granta или HaCaT обработанных исследуемыми соединениями. Эксперимент бы повторен дважды. Амплификация, мечение, гибридизация РНК были проведены с помощью набора Illumina Whole-Genome Gene Expression BeadChip (HumanHT-12) согласно протоколу производителя сервисной службой по работе с ДНК и РНК, NorthwesternUniversity, Chicago, США.

2.25. Биоинформатический скрининг потенциальных ингибиторов REDD1

Биоинформатический анализ лекарственных препаратов был проведен в сотрудничестве с лабораторией Дж. Т. Дадли (госпиталь Маунт Синай, Нью Йорк, США). Отбор препаратов проводили с помощью баз данных Connectivity Map (<https://www.broadinstitute.org/cmap/>). Каждый препарат получал свой порядковый номер в системе в зависимости от степени изменения экспрессии гена REDD1/DDIT4. Для препаратов, которые были протестированы несколько раз, было рассчитано среднее значение изменения экспрессии REDD1. Скрининг был проведен с использованием языка программирования R, версия 3.2.5 (<https://www.r-project.org/>).

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

Бестимусных мышей (самки, nu/nu, «Taconic», США) делили на группы по 10 голов в каждой. Клетки линии Granta-519 вводили подкожно по 10 млн клеток/мышь. В качестве жидкой фазы для получения клеточной суспензии при инокуляции клеток была использована формообразующая матрица Matrigel (BD Biosciences, США), которая находится в жидком состоянии при температуре от 0°C до 4°C, а при повышении температуры полимеризуется и образует гель. Также данная матрица выполняет функцию питательной среды, поскольку в ней содержатся необходимые для роста клеток аминокислоты, соли и другие компоненты. Введение препаратов начинали по достижению опухолевыми узелками размера 50 мм³ и будет

проводиться на 1, 3 и 5 дни недели до достижения опухолью размера в 2000 мм³. При экспериментах, описанных в разделе 4.1., Dex (1 мг/кг), CpдA (5 мг/кг) вводили внутривентриально на 1, 3 и 5 дни недели, бортезомиб (0,5 мг/кг) вводили внутривентриально на 2 и 4 дни недели. При экспериментах, описанных в разделе 4.3., рапамицин (5 мг/кг), Dex (1 мг/кг) вводили внутривентриально на 1, 3 и 5 дни недели, рапамицин вводили за 6 ч до введения Dex. Критерием оценки противоопухолевого эффекта являлось торможение роста опухоли, определяемое по изменению объема опухоли. Через 28-32 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.

2.27. Оценка противоопухолевой активности CpдA-03 *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей

Перевивку лимфомы мыши P388 производили путем введения асцитной жидкости подкожно мышам DBA/2 в количестве 1 млн клеток на мыш. После формирования опухолевых узелков начинали внутривентриальное введение растворов Dex, 1мг/кг, CpдA, 7,5 мг/кг, CpдA-03, 7,5 мг/кг, на 1, 3, 5 дни недели. Критерием противоопухолевой активности исследуемых соединений являлась динамика изменения роста опухоли.

2.28. Оценка атрофических и воспалительных процессов *in vivo* у мышей

Мышей F1 C57Blx129 (самки, «Taconic», США) делили на группы по 10 голов в каждой и брили за 3 суток до начала обработки.

Острое воздействие на кожный покров. Животные были обработаны рапамицином (0.5 мг/мыш) в течение 6 ч, затем были обработаны флуоцинолона ацетонидом (ФА, 2 мкг/мыш) в течение 8-24 ч. Кожу собирали, отделяли эпидермис от дермы, затем выделяли тотальную РНК, а также тотальную белковую фракцию.

Тест на атрофию кожного покрова при хроническом воздействии. Животных обрабатывали местно растворителем, ФА или комбинацией ФА с рапамицином в дозах, как указано выше, каждые 72 ч в течение 2 недель. Образцы кожного покрова собирали через 24 ч после последней обработки ФА.

Контактный дерматит. Животных обрабатывали рапамицином местно в дозах, указанных выше, через 6 ч обрабатывали ТРА (4 мкг/мыш)+/-ФА (1 мкг/мыш) каждые 72 ч в течение 2 недель. Животных контрольной группы обрабатывали растворителем. Образцы кожного покрова собирали через 24 ч после последней обработки. Из эпидермиса извлекали тотальную мРНК.

Тест на воспаление на ушах. Тест был выполнен, как описывали ранее [553]. Ушные раковины животных обрабатывали растворителем или рапамицином (0.25 мг) в течение 6 ч, затем в течение 9 ч обрабатывали неспецифическим раздражающим агентом кротоновым маслом (5% раствор в ацетоне) +/-FA (1 мкг). Далее с помощью панчей для биопсии из каждого уха были отобраны образцы 4 мм диаметром. Масса образцов служила критерием развития воспаления.

Глюкокортикоид-индуцированный остеопороз. Глюкокортикоид-индуцированный остеопороз моделировали как описано в [680]. Самкам Valb/c вводили внутривенно каждый 1, 3 и 5 дни недели в 10 ч. рапамицин в дозе 5 мг/кг или физиологический раствор. Затем в 16 ч вводили дексаметазон в дозе 10 мг/кг. Введение продолжали в течение 5 недель. После окончания эксперимента через 24 ч после последнего введения собирали образцы кожного покрова и больших берцовых костей. Количественный анализ проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином, как описано ранее [553]. Было проанализировано как минимум 30 независимых микрофотографий на каждую группу.

2.29. Оценка влияния глюкокортикоидов *in vivo* на кожу здоровых добровольцев

Клобетазол пропионат (СВР) наносили локально в виде крема с 0.05% содержанием СВР на правое плечо здоровых добровольцев (возраст 32-65) с внутренней стороны 1 раз в сутки в течение суток (добровольцы 4 и 5) и в течение 14 суток (добровольцы 1-3). Необработанную кожу на левом плече использовали в качестве контроля. Через 24 ч после последнего нанесения СВР были выделены участки кожи в полную толщину. Часть была использована для гистологического анализа, также из полученного опухолевого материала была выделена тотальная РНК для проведения количественной ПЦР

2.30. 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°C 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, TUNEL и CD31 (кроличьи антитела в разведении 1:200, «Cell Signaling», США) и инкубировали при 4°C в течение 16 часов, после чего стекла промывали 2 раза по 5 минут в фосфатном буфере. Для проявки 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 ксилолола и заключали под покровное стекло. Визуализацию и микроскопический анализ изображений проводили с использованием микроскопа Zeiss Axioplan2.

2.31. Морфометрический анализ

Количественный анализ толщины эпидермиса, количества кератиноцитов в базальном слое, а также количества Casp3-, TUNEL и CD31-положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином, как описано ранее [553]. Было проанализировано как минимум 30 независимых микрофотографий на каждую группу.

2.32. Статистическая обработка данных

Средние значения и среднеквадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакета программ Microsoft Excel. Для определения статистической значимости выявленных различий использовали парный двухвыборочный t-тест Стьюдента для средних. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование посвящено изучению роли избирательной активации глюкокортикоидного рецептора (GR) в процессах жизнедеятельности опухолевой клетки с целью оценки возможности использования селективного модулирования его функциональной активности в химиотерапии лейкозов и лимфом. В представленном исследовании в соответствии с поставленными задачами необходимо изучить два подхода к избирательному запуску GR-зависимой транс-репрессии *in vitro* и *in vivo* и оценен потенциал их возможного применения в клинической практике. Также задачей работы являлось изучение вариантов селективного модулирования функциональной активности GR при использовании комбинаций препаратов *in vitro* и *in vivo*, и оптимизация их доз и режима введения на различных моделях злокачественных новообразований кроветворной системы у мышей.

В частности, задачей первой части исследования (раздел 3.1) являлось исследование биологических свойств соединения, принадлежащего к классу селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), 2-(4-ацетофенил)-2-хлор-N-метилдиэтиламмоний хлорида (CpdA), более стабильного синтетического аналога предшественника фенилазиридина, выделенного из африканского кустарника семейства амарантовых *Salsola tuberculatiformis Botschantzev*, индивидуально и в комбинации как с классическими цитостатическими препаратами, так и с таргетными ингибиторами специфических клеточных процессов (ингибиторы убиквитин-протеосомной системы (УПС), узкобороздочные лиганды).

Вторая часть представленной работы посвящена разработке подходов к получению новых SEGRA на основе CpdA (раздел 3.2). Исследование включает три направления оптимизации CpdA: 1) получение наночастиц золота, содержащих данное соединение; 2) получение оптически чистых изомеров CpdA; 3) получение более стабильных химических производных CpdA. Для каждой формы CpdA или новосинтезированного соединения запланирована оценка следующих биологических свойств: 1) противоопухолевого эффекта *in vitro*, включающего в себя определение антипролиферативного и проапоптотического эффектов; 2) определение степени запуска транс-репрессии и транс-активации, а также, в случае новосинтезированных химических производных CpdA, измерение аффинности полученных соединений к GR. Противоопухолевый эффект наиболее активных соединений *in vivo* предполагается оценить на модели перевиваемого лимфолейкоза P388 у мышей в сравнении с исходным соединением CpdA и с глюкокортикоидом дексаметазоном (Dex).

В третьей части настоящей работы (раздел 3.3) представлен поиск ключевых генов, опосредующих побочные эффекты глюкокортикоидов (GC). Одним из основных генов с подобными свойствами является ген REDD1. Для него, с помощью биоинформатического

анализа базы данных «карта взаимодействий» (Connectivity Map, CMap), отображены потенциальные ингибиторы. Результаты биоинформатического анализа подтверждают молекулярно-биологическими методами *in vitro* и *in vivo*, а также исследуют роль гена *REDD1* в развитии терапевтических и побочных эффектов GC.

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

3.1.1. Оценка противоопухолевого эффекта CpдA in vitro и ex vivo

Для подбора модельной системы злокачественных новообразований кроветворной системы в представленной работе были использованы две линии лейкозных клеток СЕМ – лимфоидного ряда, и К562 – миелоидного ряда, а также три линии лимфом NCEB, Granta и Jeko. Все указанные линии были охарактеризованы по уровню экспрессии, функциональной активности и мутационному статусу GR. На рисунке 11А представлены данные Вестерн-блоттинга по определению уровню экспрессии GR в данных клетках. По данным денситометрического анализа наиболее высокий уровень белка GR наблюдался в клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ и в клетках мантийноклеточной лимфомы NCEB, клетки К562 и Granta экспрессировали меньшее количество рецептора, на клетках линии Jeko была показана очень низкая экспрессия GR. Так, среди клеточных линий лимфомы уровень GR в клетках NCEB был выше, чем в клетках Granta и Jeko, на 46,0% и 87,8%, соответственно. При сравнении клеточных линий СЕМ и К562 между собой количество экспрессируемого рецептора в клетках СЕМ превышало этот показатель в клетках К562 на 40,5% (Рисунок 11В). Для определения функциональной активности рецептора все исследуемые клетки были трансдуцированы лентивирусным вектором, несущим ген люциферазы светлячка под контролем GRE-содержащего CMV-промотора. После 24-часовой инкубации клеток всех указанных линий с глюкокортикоидом дексаметазоном (Dex) наблюдалось возрастание активности репортерного гена более чем в 21 раз, что свидетельствует о об образовании комплекса лиганда с рецептором, активации рецептора в полном объеме, связывании GR с ДНК и увеличении активности люциферазы (Рисунок 11С). Так, в клетках линии СЕМ наблюдали увеличение активности люциферазы после обработки Dex в 2,4 раза, в клетках линии К562 – в 8,1 раза, в клетках линии Granta, NCEB и Jeko – в 5,7, 3,3 и 1,6 раза, соответственно. Необходимо отметить, что при сравнении эффектов на клетках Granta и NCEB, наиболее высокий уровень активации GR отмечали в клетках Granta, несмотря на более низкий уровень экспрессии рецептора.

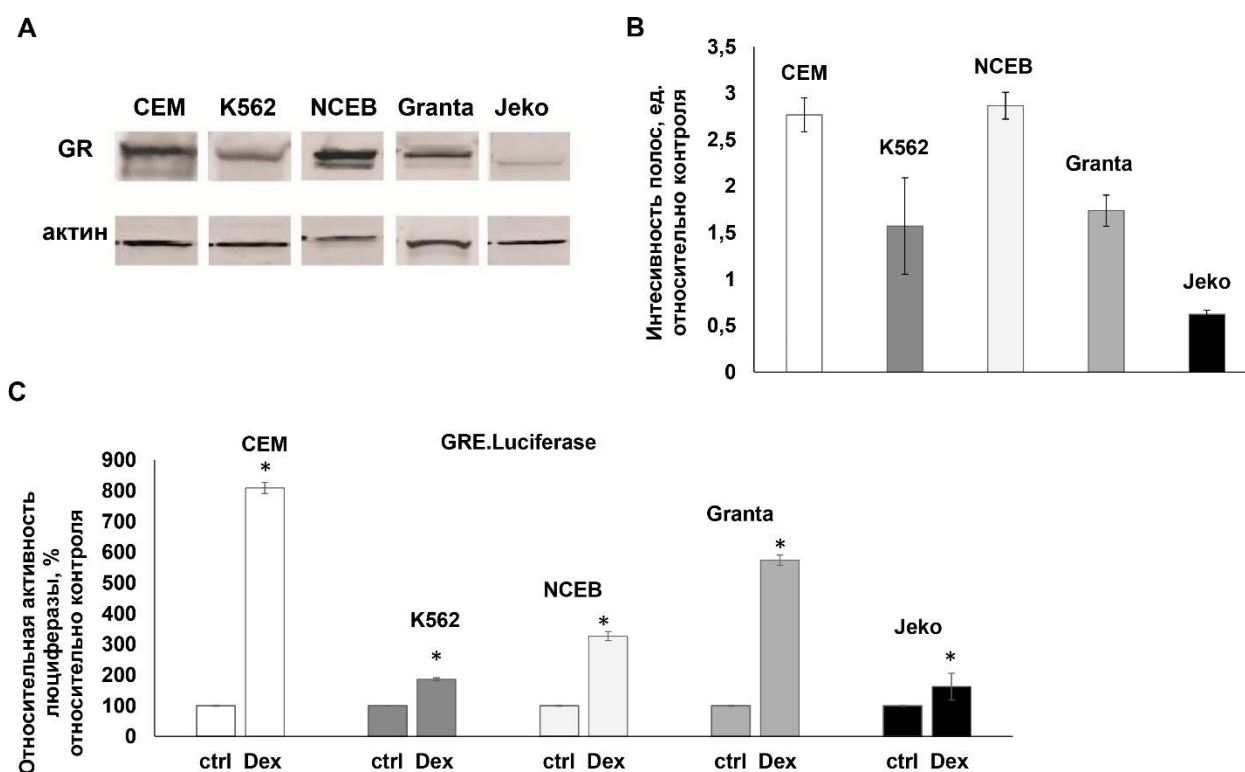


Рисунок 11 - Уровень экспрессии и функциональной активности GR в клетках CEM, K562, NCEB, Granta и Jeko. **А.** Оценка уровня экспрессии с помощью Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали антитела к актину. **В.** Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ Odyssey v2.1 («LI-COR», США). На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно актина. **С.** Клетки CEM, K562, NCEB, Granta и Jeko после трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя или Dex (1мкМ), CpдA, затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. На рисунке представлены нормализованные значения активности люциферазы в процентах от контроля, обработанного растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

При исследовании последовательностей 2-9 функциональных экзонов GR во всех исследуемых линиях с помощью прямого секвенирования было показано, что в данных участках гена GR отсутствуют мутации и последовательность совпадает с последовательностью дикого типа.

С учетом вышесказанного для дальнейшей работы были выбраны линия острого лимфобластного Т-клеточного лейкоза CEM и линия В-клеточной лимфомы мантийной зоны

селезенки Granta, как наиболее выразительно отвечающие на обработку клеток глюкокортикоидами и в то же время экспрессирующие достаточное количество рецептора.

Поскольку важной частью дальнейших исследований было изучение зависимости всех наблюдаемых эффектов от GR, нами была проведена трансдукция клеточных линий CEM и Granta лентивирусными конструкциями, экспрессирующими короткую шпилечную РНК к GR (shGR). В полученных клетках было продемонстрировано подавление экспрессии GR по сравнению с клетками, трансдуцированными пустым вектором. Как видно из рисунка 152 экспрессия GR в клетках CEM и Granta снизилась примерно на 85%.

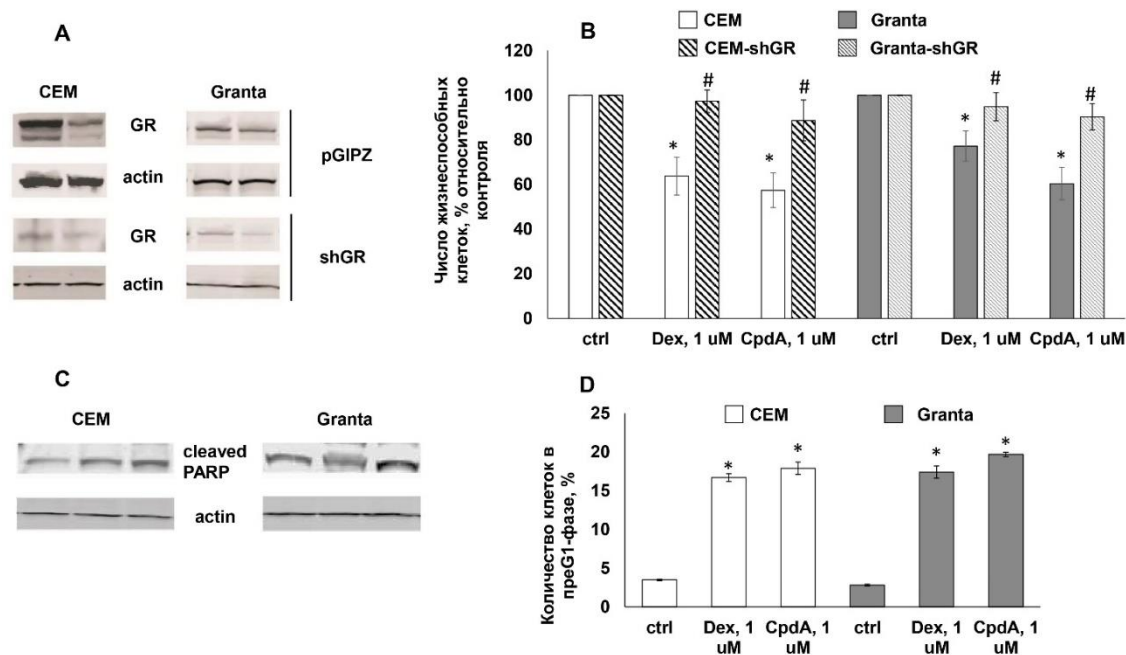


Рисунок 12 - Антипролиферативный и проапоптотический эффекты CpdA на клетки CEM, CEM-shGR, Granta и Granta-shGR. **А.** Уровень экспрессии GR в клетках CEM и Granta после трансдукции лентивирусного вектором pGF-shGR и культивирования в течение 24 ч в присутствии растворителя или Dex (1мкМ) оценивали с помощью Вестерн блоттинга. **В.** Антипролиферативный эффект CpdA и Dex на клетки CEM и Granta определяли после инкубации клеток с исследуемыми соединениями в течение 48 ч с помощью автоматического счетчика клеток. На рисунке представлено количество живых клеток в процентах от контроля, обработанного растворителем. **С, D.** Проапоптотический эффект Dex и CpdA определяли с помощью Вестерн блоттинга по расщеплению PARP после 24 ч обработки (**С**) и проточной цитофлуориметрии с использованием окраски пропидий йодидом в течение 48 ч обработки (**D**) растворителем, Dex (1мкМ) и CpdA (1мкМ). Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали иммуноблоттинг с антителами к актину. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие между числом жизнеспособных клеток, трансдуцированных вектором shGR и контрольным вектором pGIPZ, $p < 0.05$

Противоопухольевый эффект *in vitro* по современной терминологии определяется как антипролиферативное и проапоптотическое действие соединения на клетки. Определение антипролиферативного эффекта проводили в течение 24-часовой инкубации с Dex или CpдA с помощью прямого подсчета клеток. Общее количество клеток СЕМ при обработке Dex снизилось на 36,3% по сравнению с контролем; этот показатель для клеток Granta составил 22,8% (Рисунок 12В). Общее количество жизнеспособных клеток СЕМ при инкубации с CpдA в концентрации 1 мкМ уменьшилось на 42,6% по сравнению с контролем спустя 24 ч после обработки. Аналогичный эффект наблюдался для клеток Granta: CpдA снижал жизнеспособность клеток Granta на 39,6% (Рисунок 12В). Наблюдаемые эффекты являлись GR-зависимыми. При обработке Dex трансформированных клеток, в которых экспрессия GR была подавлена с помощью shRNA, количество жизнеспособных клеток практически не снижалось в случае клеток СЕМ, в случае клеток Granta 2% (Рисунок 12В). При инкубации данных клеток с CpдA это значение составило 21% для клеток СЕМ и 15% для клеток Granta (Рисунок 12В).

С помощью проточной цитофлуориметрии было продемонстрировано, что в клетках обеих линий инкубация с CpдA или с Dex вызывала запуск апоптоза после 24 часов обработки. Эти данные согласуются с данными по расщеплению белка PARP (Рисунок 12С, D).

Также в ходе выполнения исследования нами была собрана коллекция из 25 образцов крови от пациентов с гемобластозами отделения химиотерапии гемобластозов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Из полученных образцов была выделена моноцитарная фракция клеток, содержащая лимфобласты и лейкоциты. На полученных первичных культурах лимфобластных клеток был оценен цитостатический эффект CpдA и глюкокортикоидов. Клетки культивировали в присутствии указанных соединений или растворителя в течение 24 ч. С помощью прямого подсчета было показано, что цитостатический эффект CpдA на клетки сравним с эффектом GC. На рисунке 13 представлены 5 образцов, в которых эффект Dex и CpдA был наиболее сильно выражен. Так, например, количество живых клеток в образце, полученном от пациента 5, через 24 часов после обработки CpдA составило 58,9% от контрольного уровня, аналогичный показатель при обработке GC составил 66,5% живых клеток от контрольного уровня (Рисунок 13). Для пациентов 1-4, 6, 8-13, 15-17, 19-22 и 24-25 цитотоксический эффект был выражен слабее и колебался в пределах снижения количества жизнеспособных клеток на 20-40%. Данные по цитотоксическому действию CpдA и Dex на первичные трансформированные лимфобласты согласовались с результатами исследования проапоптотического действия соединений на данные клетки (Таблица 5).

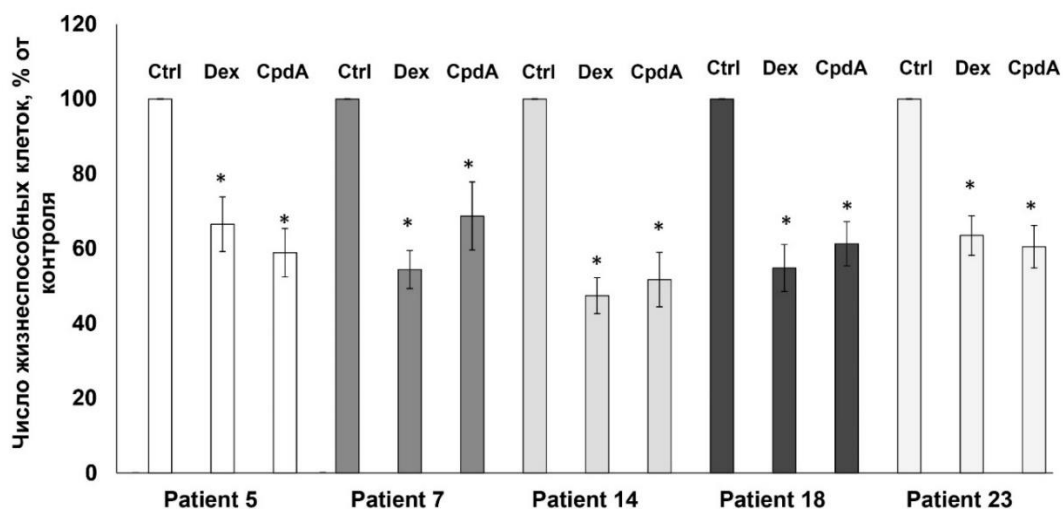


Рисунок 13 - Цитотоксический эффект Dex и Cp dA на первичные трансформированные лимфоциты от пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы. Выделение моноядерной фракции клеток из образцов, полученных от пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы, проводили с помощью центрифугирования в градиенте Фиколла. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex (1мкМ), Cp dA (1мкМ). Подсчет количества живых клеток проводили с помощью камеры Горяева. На рисунке представлено количество живых клеток в процентах от контроля, обработанного растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

Таблица 5 - Проапоптотический эффект Dex и Cp dA на первичные трансформированные лимфоциты от пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы. Проапоптотический эффект Dex и Cp dA определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием окраски пропидий йодидом в течение 48 ч обработки растворителем, Dex (1мкМ) и Cp dA (1мкМ). Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

№ пациента	% апоптотических клеток, контроль	% апоптотических клеток, Dex, 1мкМ, 48 ч	% апоптотических клеток, Cp dA, 1мкМ, 48 ч
1	3,5±0,6	10,9±2,7	9,3±0,7
2	6,7±1,4	11,4±4,2	12,1±1,3
3	9,6±0,9	13,3±1,8	14,0±3,1
4	8,1±0,4	12,7±2,4	10,4±1,1
5	2,7±0,6	18,9±3,1	19,6±3,2
6	11,3±1,7	16,4±4,5	14,2±3,6
7	4,8±0,5	19,5±8,2	18,4±1,4

№ пациента	% апоптотических клеток, контроль	% апоптотических клеток, Dex, 1мкМ, 48 ч	% апоптотических клеток, CpдA, 1мкМ, 48 ч
8	6,3±0,8	12,7±1,1	11,6±2,3
9	6,8±0,9	14,4±3,5	12,7±1,0
10	13,3±2,6	16,2±3,2	15,1±1,7
11	7,7±0,9	19,4±4,3	13,0±1,8
12	4,6±0,2	17,6±3,8	15,5±1,6
13	8,2±0,7	18,2±4,4	14,1±0,9
14	3,1±0,4	19,3±5,6	23,1±4,4
15	10,8±1,0	16,0±9,1	15,3±1,9
16	10,3±0,8	15,6±3,9	16,8±1,8
17	7,9±0,9	17,4±5,2	13,5±1,9
18	3,8±0,5	19,7±2,0	14,3±2,7
19	11,0±1,3	17,3±3,3	13,8±3,0
20	9,1±0,7	14,2±4,1	17,1±2,7
21	13,5±1,8	17,4±2,4	18,5±4,2
22	8,7±0,5	12,6±5,0	14,1±0,9
23	4,0±0,2	19,7±1,2	21,4±3,9
24	9,6±0,7	13,2±3,7	15,2±3,2
25	11,4±1,1	16,2±3,1	17,4±4,3

3.1.2. Исследование способности СрдА к запуску транс-репрессии и транс-активации глюкокортикоидного рецептора

ДНК-независимая транс-репрессия, запускаемая GR, обусловлена белок-белковым взаимодействием GR с другими транскрипционными факторами, такими как NF-κB, AP-1, Ets-1, Elk-1, SRF, CRE/ATF и NFATc [47]. В клеточные линии Granta и СЕМ с помощью трансдукции лентивирусного вектора были получены клеточные линии, несущие ген люциферазы под контролем минимального CMV-промотора с сайтами связывания NF-κB. Эффективность трансдукции клеток обеих линий составила 50-60%, о чем судили по экспрессии маркера – зеленого флуоресцентного белка GFP (Рисунок 14А). При исследовании влияния тестируемых лигандов GR на активность NF-κB было показано, что в клетках СЕМ и Granta при обработке СрдА наблюдается подавление активности NF-κB в большей степени, чем при обработке Dex. Так, уровень активности NF-κB под действием Dex в течение 8-часовой инкубации снижался в клетках СЕМ и Granta соответственно до 54,6% и 66,3%, а при действии СрдА аналогичные изменения были до 61,3% и 38,7% по сравнению с контролем (Рисунок 14В). Это подтверждалось данными количественного ПЦР-анализа экспрессии NF-κB-регулируемых генов интерлейкина-1 (IL-1) и интерлейкина-6 (IL-6) (Рисунок 14С). Более того, необходимо отметить, что Dex и СрдА статистически значимо оказывали более слабый эффект на транскрипционную активность NF-κB в клетках СЕМ и Granta с подавленной экспрессией GR (Рисунок 14В).

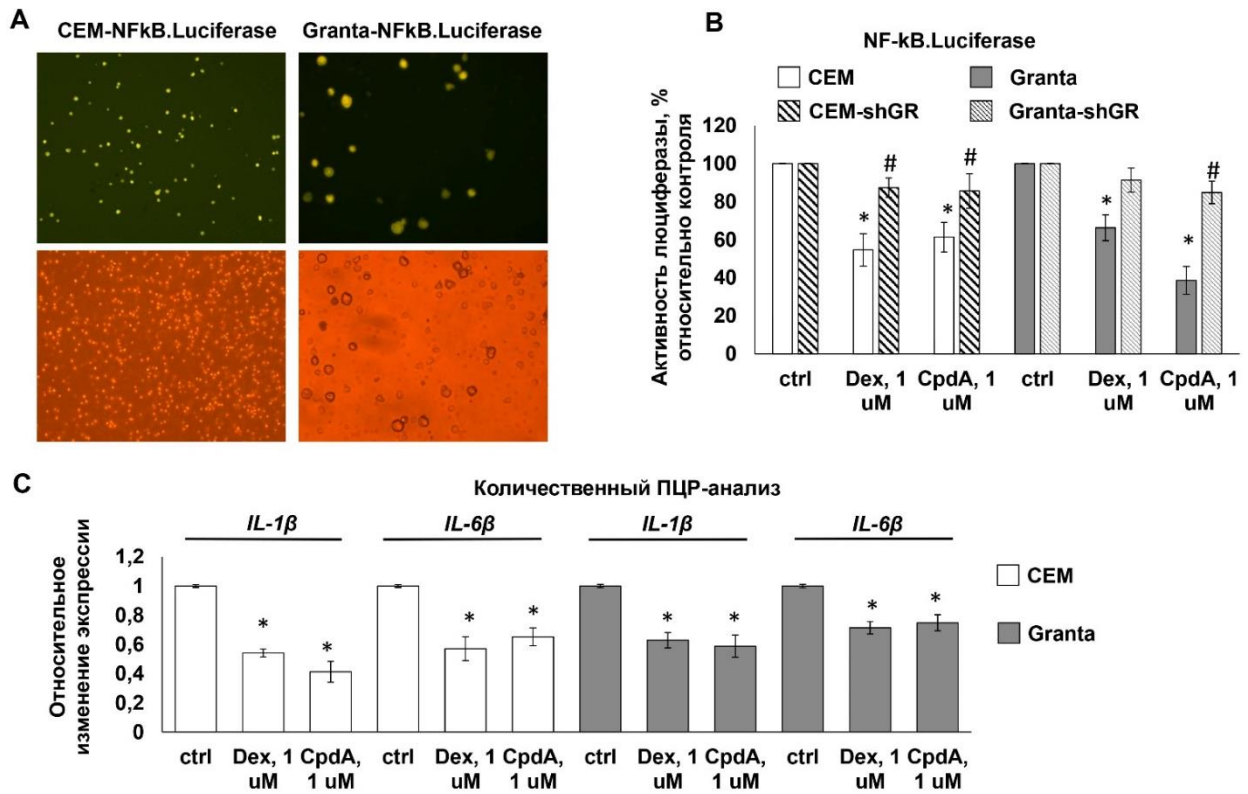


Рисунок 14 - Влияние Dex и CpdA на степень запуска GR-зависимой транс-репрессии.

А. Эффективность трансдукции лентивирусного вектора рGF1-NF-kB определяли по экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss и фильтра для FITC-флуоресценции. **В.** Клетки CEM, Granta, CEM-shGR и Granta-shGR после трансдукции лентивирусного вектора рGF1-NF-kB культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex (1мкМ), CpdA (1мкМ). Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. **С.** Количественный ПЦР-анализ экспрессии *IL-6β* и *IL-1β* в клетках CEM и Granta. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

Запуск транс-активационного механизма GR в клетке происходит при связывании гомодимера рецептора с палиндромными последовательностями нуклеотидов в ДНК – респонсивными элементами глюкокортикоидов (GRE). Это приводит к ацетилированию гистонов, уменьшению плотности хроматина, что увеличивает доступ к ДНК фермента РНК-полимеразы II и способствует активации транскрипции пропролиферативных и антиапоптотических генов. В данной работе мы исследовали транс-активационный потенциал SpdA с помощью трансдукции клеток лентивирусным вектором, несущим ген люциферазы светлячка под контролем GRE-содержащего CMV-промотора. После 8-часовой инкубации клеток Granta с Dex наблюдалось возрастание активности репортерного гена более чем в 21 раз, в то время как SpdA вызывал ее подавление на 33% (Рисунок 15А). В клетках линии СЕМ наблюдалось увеличение активности люциферазы после обработки Dex в 2,4 раза, в то время как SpdA снижал активность репортерного гена на 41% (Рисунок 15А). Необходимо отметить, что при проведении данных экспериментов на клетках Granta и СЕМ с пониженной экспрессией рецептора, увеличения активности при обработке как Dex, так и SpdA не происходило (Рисунок 15А).

Данные по активации GRE-зависимых генов при действии Dex и отсутствию их активации при обработке SpdA, полученные в люциферазном тесте, были подтверждены с помощью количественного ПЦР-анализа экспрессии GR-зависимых генов FKBP51, GILZ, MKP-1. Для каждого из этих генов в литературе подробно описаны последовательности GRE и отмечено возрастание экспрессии после обработки глюкокортикоидами [679, 681, 682]. Количество мРНК всех вышеперечисленных генов возрастало после обработки Dex в течение 24 ч, в то время как при инкубации клеток Granta и СЕМ с SpdA экспрессия данных генов оставалась на контрольном уровне или даже снижалась (Рисунок 15В).

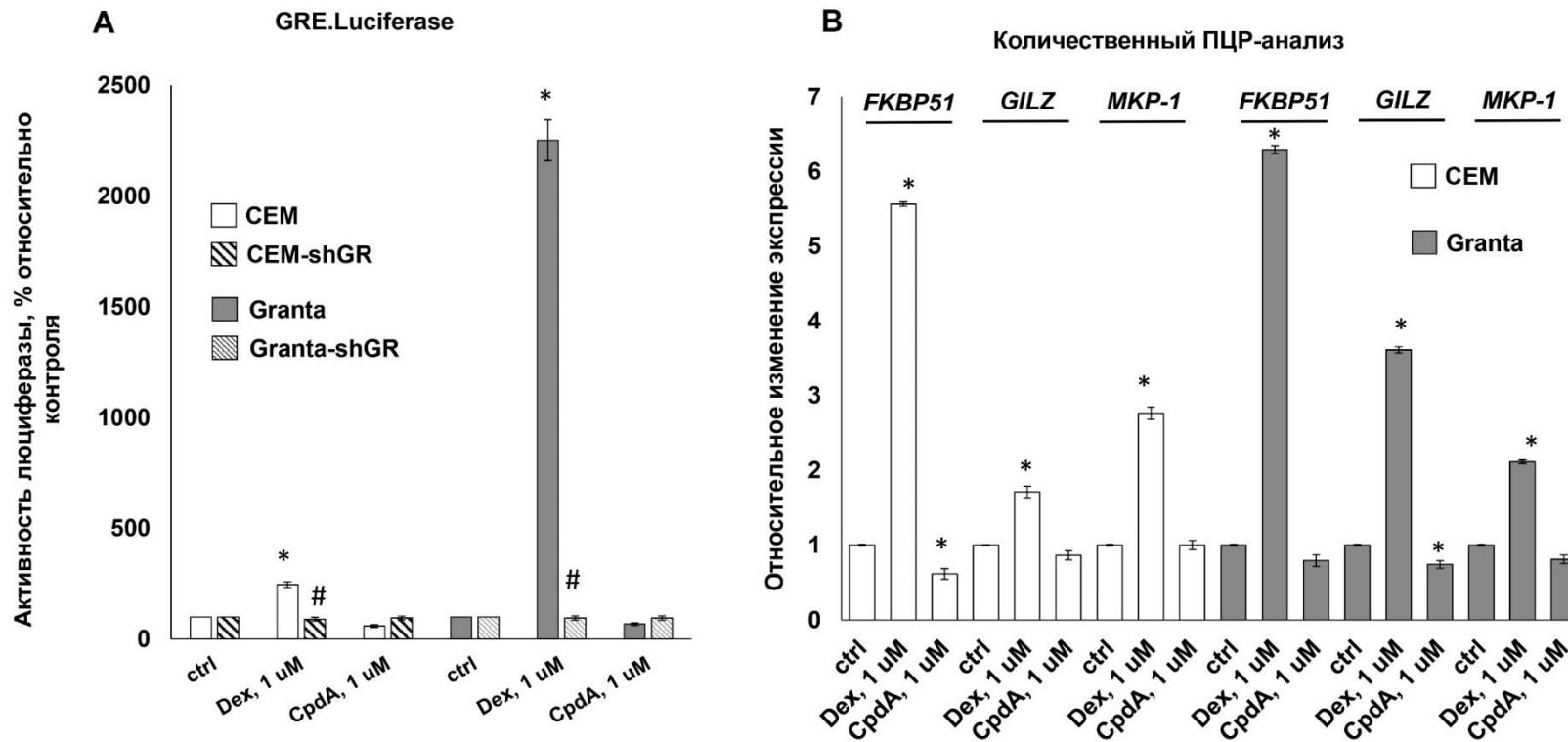


Рисунок 15 - Влияние Dex и CpdA на степень запуска GR-зависимой транс-активации. **А.** Клетки CEM, Granta, CEM-shGR и Granta-shGR после трансдукции лентивирусного вектора рGF1-GRE культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex (1 мкМ), CpdA (1 мкМ). Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. **В.** Количественный ПЦР-анализ экспрессии *FKBP51*, *GILZ* и *MKP-1* в клетках CEM и Granta. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

Далее было проведено исследование экспрессии генов в клетках Granta на ДНК-микрочипах Illumina после 24 ч обработки клеток Dex или CpдA (данные по профилю экспрессии генов загружены в базу данных NCBI, № GSE71099). Анализ общих закономерностей изменения экспрессии генов показал, что в клетках Granta 92% генов, экспрессия которых увеличивается в 2 и более раз после обработки Dex, что свидетельствует о запуске механизма трансактивации, не изменяется или понижается после обработки CpдA. Более того, 30% генов, экспрессия которых падала в результате обработки стероидами, также уменьшалась после обработки CpдA в 2 и более раза (Рисунок 16А).

Результаты исследования профилей экспрессии генов в клетках гемобластозов после обработки GC или CpдA были подтверждены с помощью количественного ПЦР-анализа ряда генов, экспрессия которых наиболее сильно увеличилась, и ряда генов, экспрессия которых наиболее сильно уменьшилась после обработки FA (Рисунок 16В). В частности, был проведен ОТ-ПЦР анализ генов *TP53INP1*, *CLIC3*, *SERPINA9*, *SGK1*, *DDIT3*, *STS*, *MYB*, *ARMCX3*, *SESN2*, *CTH* и *NFE2L1*.

Также полученные данные ДНК-микрочипирования были проанализированы с помощью базы данных ProfileChaser (<http://profilechaser.stanford.edu>), Интернет-ресурс, позволяющий сравнение профилей экспрессии генов в различных типах клеток и после воздействия различных агентов. Изменение экспрессии генов в клетках NCEB, обработанных глюкокортикоидами по сравнению с необработанным контролем, было во многом схоже с эффектами цитостатических препаратов при терапии опухолей гематологической природы (коэффициент сходимости 0,5), а также с действием других стероидных гормонов на клетки-мишени. Что касается CpдA, анализ данных ДНК-микрочипирования выявил значительное сходство с изменением профилей экспрессии генов при обработке лимфоидных клеток таргетными препаратами типа Гливек (Иматиниб), а также с эффектом Рапамицина на лимфоидные клетки, резистентные к глюкокортикоидам (коэффициент сходимости 0,42-0,43). Таким образом, было продемонстрировано, что глюкокортикоиды и CpдA регулируют различные функциональные группы генов, которые приводят к развитию цитотоксического эффекта в клетках гемобластозов.

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

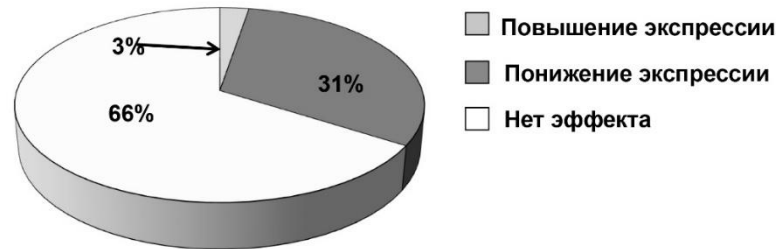
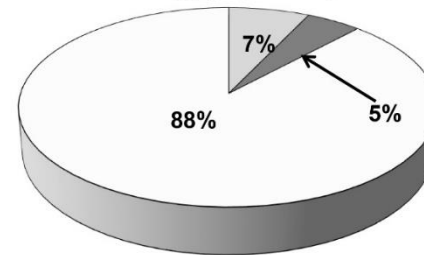
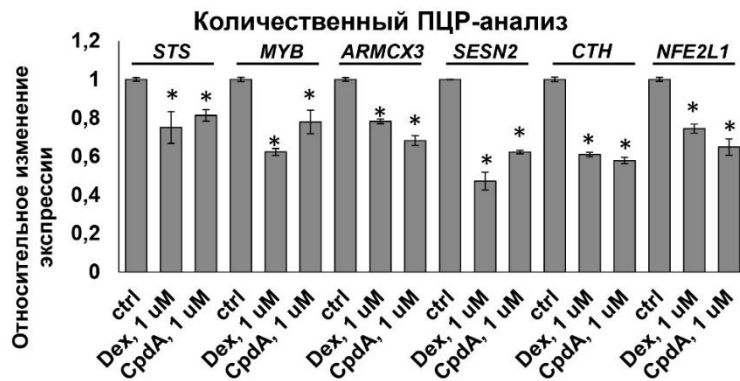
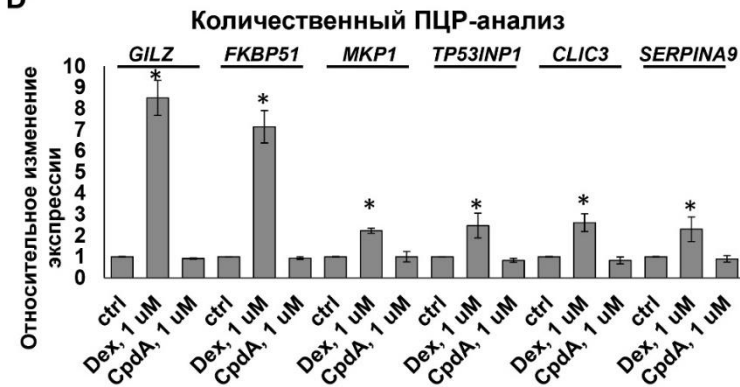
А Влияние *CpdA* на гены, экспрессия которых подавляется Dex**В** Влияние *CpdA* на гены, экспрессия которых повышается после воздействия Dex**С****Д**

Рисунок 16 - Сравнение изменения профилей экспрессии генов в клетках Granta после обработки Dex или *CpdA*. **А, В.** Тотальная мРНК была выделена из клеток Granta, обработанных растворителем, Dex (1 мкМ) и *CpdA* (1 мкМ) в течение 24 ч. Амплификация, мечение, гибридизация РНК были проведены с помощью набора Illumina Whole-Genome Gene Expression BeadChip (HumanHT-12) согласно протоколу производителя сервисной службой по работе с ДНК и РНК, Northwestern University, Chicago, США. **С, Д.** Количественный ПЦР-анализ экспрессии генов в клетках Granta. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

3.1.3. Определение противоопухолевого эффекта CpдA *in vivo*

Для определения противоопухолевого эффекта CpдA *in vivo* нами была отработана методика подкожного введения ксенографтов лимфомы человека бестимусным мышам. В первой серии экспериментов была протестирована эффективность перевивки двух клеточных линий злокачественных новообразований кроветворной системы: линия клеток острого лимфобластного лейкоза человека СЕМ и линия мантийноклеточной лимфомы Granta. Животным контрольных и экспериментальных групп подкожно перевивали 10 млн клеток СЕМ или Granta в физиологическом растворе (0,89% NaCl). Животные наблюдались в течение 35 дней с момента перевивки. Для клеток линии Granta у 25% животных наблюдалось наличие опухолей, которые к 35 дню эксперимента достигли среднего объема 1084 мм³, для клеток линии СЕМ данный способ перевивки оказался неэффективным. Методика введения ксенографтов была оптимизирована. В качестве жидкой фазы для получения клеточной суспензии при инокуляции клеток нами была использована формообразующая матрица Matrigel (BD Biosciences, США), которая находится в жидком состоянии при температуре от 0°C до 4°C, а при повышении температуры полимеризуется и образует гель. Также данная матрица выполняет функцию питательной среды, поскольку в ней содержатся необходимые для роста клеток аминокислоты, соли и другие компоненты. Во второй серии экспериментов были использованы только клетки линии Granta, как проявившие наибольшую способность формировать подкожный опухолевый узел. Животных делили на три группы, по 10 животных в каждой. Животным каждой группы подкожно вводили 10 млн клеток Granta в формообразующей матрице Matrigel. На 5-7 день после перевивки у 96% животных были отмечены опухолевые узлы средним объемом 54 мм³. На 7 день после перевивки было начато введение следующих препаратов:

Группа 1 – физиологический раствор;

Группа 2 – раствор Dex, 1 мг/кг

Группа 3 – раствор CpдA, 5 мг/кг.

Введение проводили на 1, 3 и 5 дни недели, объем опухоли измеряли 2 раза в неделю. Животные были забиты на 32 день эксперимента. Средний объем опухоли в группе 1 (физиологический раствор) составил 1969 мм³, в группе 2 (раствор дексаметазона) – 382 мм³, в группе 3 (раствор CpдA) - 362 мм³ (Рисунок 17А). Таким образом, CpдA подавлял рост опухоли у бестимусных мышей в 2,5 раза по сравнению с контролем.

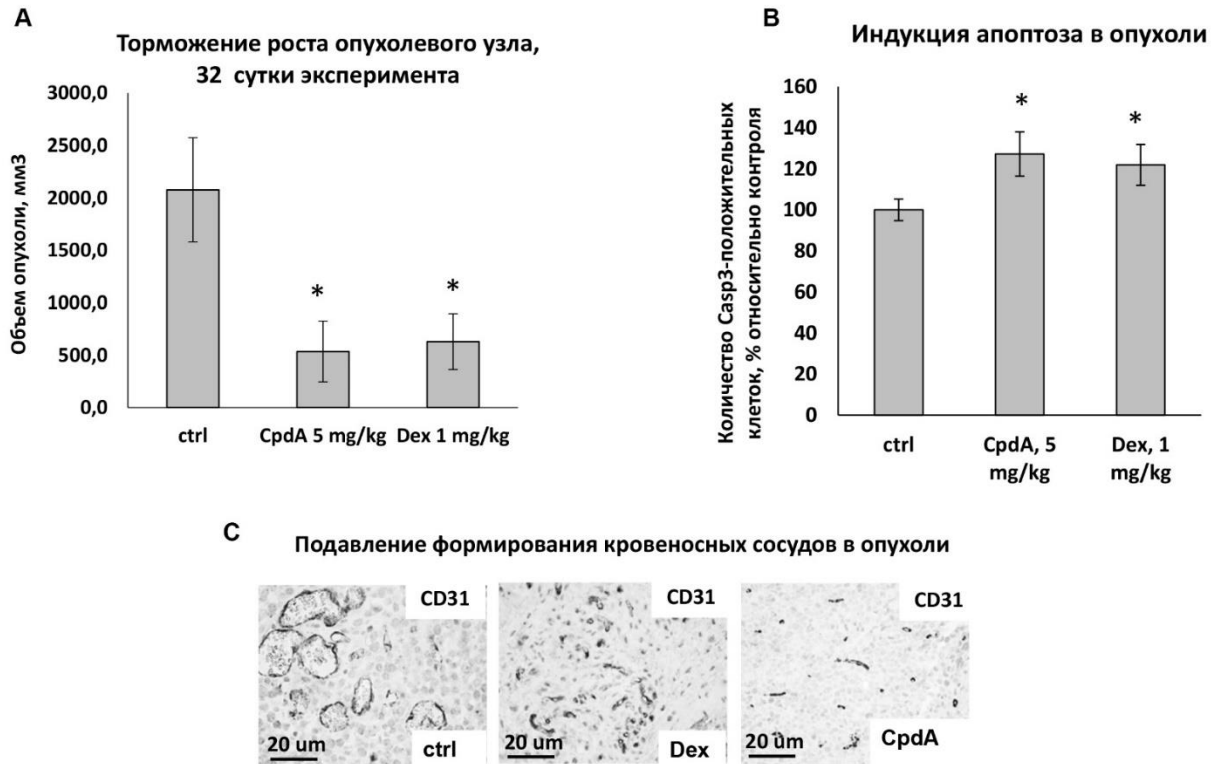


Рисунок 17 - Эффективность терапевтического действия Dex и CpdA на ксенографты лимфомы мантийной зоны селезенки Granta. **А.** Средний объем ксенографтов на 32 день эксперимента. Физиологический раствор (ctrl), Dex (1 мг/кг), CpdA (5 мг/кг) вводили внутривенно на 1, 3 и 5 дни недели. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=10$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. **В.** Характеристические гистологические срезы опухолей в контрольной и экспериментальных группах. **С, D, E.** Количественный анализ плотности клеток в опухоли (C), TUNEL- (D) и Casp3- (E) положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином или специфическими антителами к TUNEL и Casp3. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. **Ф.** Характеристическое иммуногистохимическое окрашивание CD31

При анализе результатов иммуногистохимического исследования было показано, что в образцах, полученных от животных, получавших CpдA, количество жизнеспособных клеток значительно меньше, чем в контроле, о чем судили по увеличению экспрессии каспазы 3, служащей маркером апоптоза (Рисунок 17В). Также было проведено исследование полученных образцов опухолевой ткани на степень ангиогенеза. С помощью иммуногистохимического окрашивания антителами к CD31 было показано, что число CD31-положительных клеток в контрольных образцах выше, чем в образцах опухолей животных, получавших CpдA, в 1,2 раза (Рисунок 17С). Формирование сосудов в группах, получавших Dex или CpдA, также было менее выражено (Рисунок 17С).

Таким образом, противоопухолевый эффект CpдA *in vitro* был также подтвержден с помощью исследований *in vivo*.

3.1.4. Исследование совместного влияния CpдA и противоопухолевых препаратов различных классов на жизнеспособность опухолевых клеток

Для изучения совместного действия CpдA и противоопухолевых препаратов различного механизма действия были выбраны следующие классы соединений:

- 1) Классические химиопрепараты, используемые при терапии злокачественных новообразований кроветворной системы (митоксантрон (Mito), доксорубицин (Dox), винкристин (Vinc));
- 2) Ингибиторы убиквитин-протеасомной системы (бортезомиб (BZ), карфилзомиб (CFZ), иксазомиб (IXZ), MLN4924);
- 3) Узкобороздочные лиганды (УБЛ), как уже применяющиеся в противоопухолевой терапии, так и потенциальные химиопрепараты (трабектедин (Trab), диминазен (Dim), пентамидин (Pent), нетропсин (Net)).

В качестве положительного контроля к CpдA был использован Dex в концентрации 1 мкМ.

Для всех указанных препаратов был оценен цитотоксический эффект в широком диапазоне концентраций (1 нМ – 1 мкМ) как индивидуально, так и в комбинации с Dex или CpдA на клетках мантийноклеточной лимфомы Granta и клетках лейкоза СЕМ. Были определены рабочие концентрации соединений, которые использовали для построения кривых выживаемости (Рисунки 18А-23А), а также для дальнейших экспериментов. Также были определен ряд концентраций, которые использовали для графического представления типа совместного действия препаратов: три концентрации, при которых при совместном использовании с CpдA также в различных концентрациях, наблюдали 50%-ную гибель клеток. С использованием этих данных были построены изоболограммы, представленные на рисунках 18В-23В. Одну из комбинаций используемых концентраций, при которой тип совместного действия

соединений был наиболее близок к синергизму, использовали также для расчета так называемого «комбинационного индекса» (combination index, CI), который представляет собой числовую характеристику типа совместного действия препаратов: синергизм, аддитивность или антагонизм. Расчет проводили как описано в разделе «Материалы и методы», результаты расчета представлены в таблице 6. Ни одна комбинация цитостатиков, ингибиторов УПС или УБЛ в комбинации с CpdA не проявляла антагонистических свойств, что характеризует данное соединение как потенциально возможный агент для комбинированной химиотерапии. Так, при использовании исследуемых препаратов в рабочих концентрациях (указаны на рисунках 23А-28А) отмечено, что жизнеспособность клеток СЕМ и Granta падает сильнее при использовании комбинаций соединений, чем при обработке клеток индивидуально каждым препаратом. В большинстве случаев после 3 суток обработки комбинацией препаратов количество жизнеспособных клеток падало до 7-12%.

Преимущественным типом совместного действия исследуемых веществ была аддитивность. В частности, расчетные значения $CI \approx 1$ на обеих клеточных линиях были получены для цитостатиков доксорубицина и винкристина, узкобороздочных лигандов диминазена, нетропсина и пентамидина (Таблица 6, Рисунки 21В, 22В, 25В, 26В). Митоксантрон проявил тенденцию к синергизму при обработке клеток СЕМ, однако этот эффект зависит от концентраций, в которых используется данный препарат и CpdA. Так, из рисунка 21В можно увидеть, что тенденция к синергизму при обработке Mito+CpdA клеток СЕМ наблюдается при использовании концентрации CpdA 0,9мкМ (0,1 IC50) и Mito 7 мкМ (0,82 IC50), а при использовании концентраций CpdA 7,5мкМ (0,83 IC50) и Mito 1,28мкМ (0,15 IC50) для построения изоболограммы полученная точка лежит на прямой аддитивности.

Синергизм совместного действия CpdA и исследуемых препаратов наблюдался наиболее выражено в случае бортезомиба. Расчетное значение CI для данной комбинации препаратов составило 0,746 для клеток СЕМ и 0,801 для клеток Granta (Таблица 6). На изоболограмме (Рисунки 25В и 26В) также видно, что используемые концентрации BZ и CpdA формируют точки, лежащие под прямой аддитивности в зоне синергии. Тенденцию к синергическому типу совместного действия проявил также узкобороздочный лиганд трабектедин (Рисунки 27В, 28В).

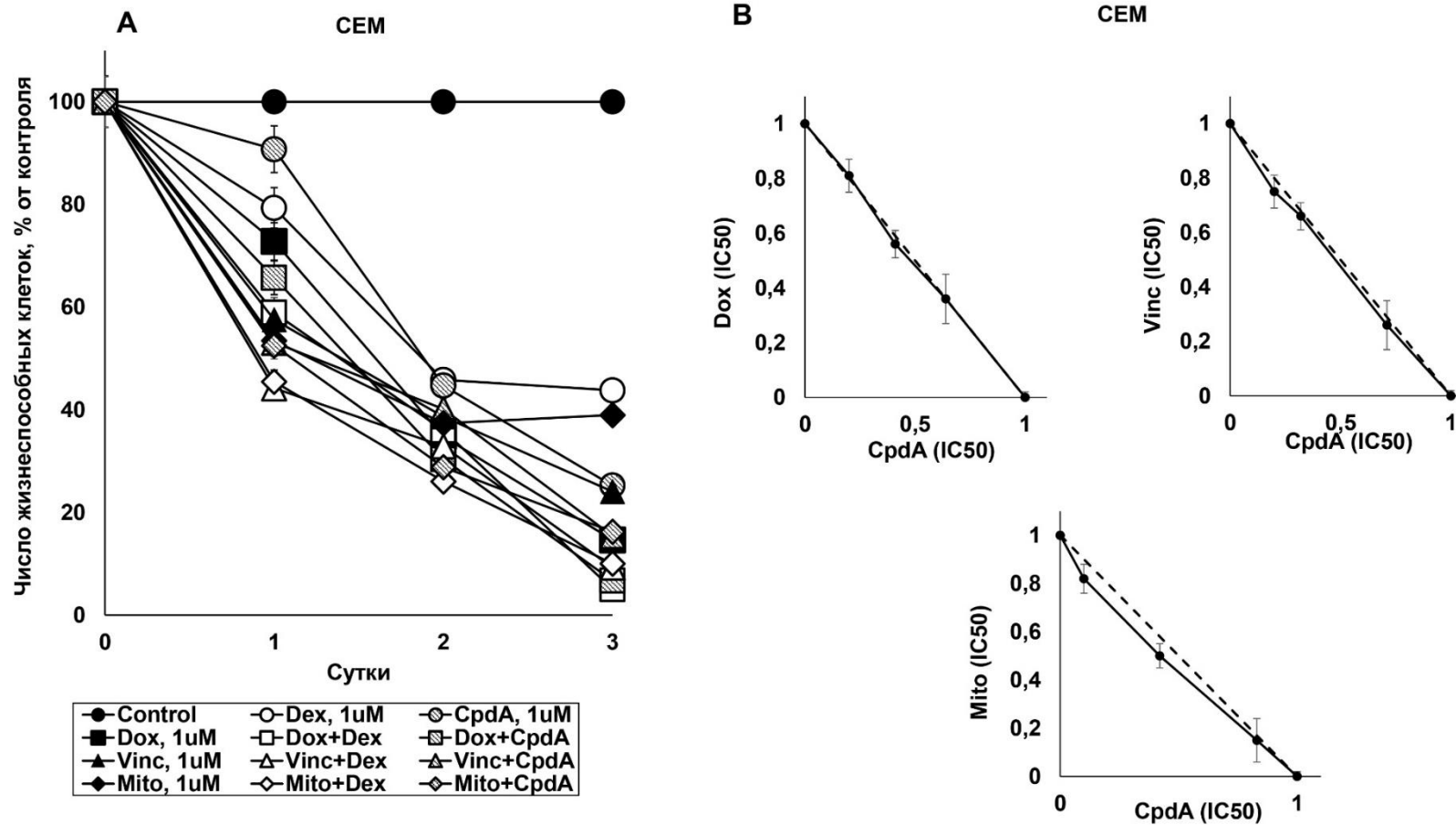


Рисунок 18 - Антипролиферативный эффект Dex, CpdA, Dox, Vinc, Mito и их комбинаций на клетки CEM. **А.** Клетки обрабатывали растворителем, Dex (1мкМ), CpdA (1мкМ), Dox (1мкМ), Vinc (1мкМ), Mito (1мкМ). Подсчет клеток проводили каждые 24 ч. **В.** Изоболограммы строили для комбинаций CpdA с Dox, Vinc и Mito. Концентрации исследуемых соединений, соответствующие IC50, принимали за 1,0 на осях абсцисс (CpdA) и ординат (Dox, Vinc или Mito)

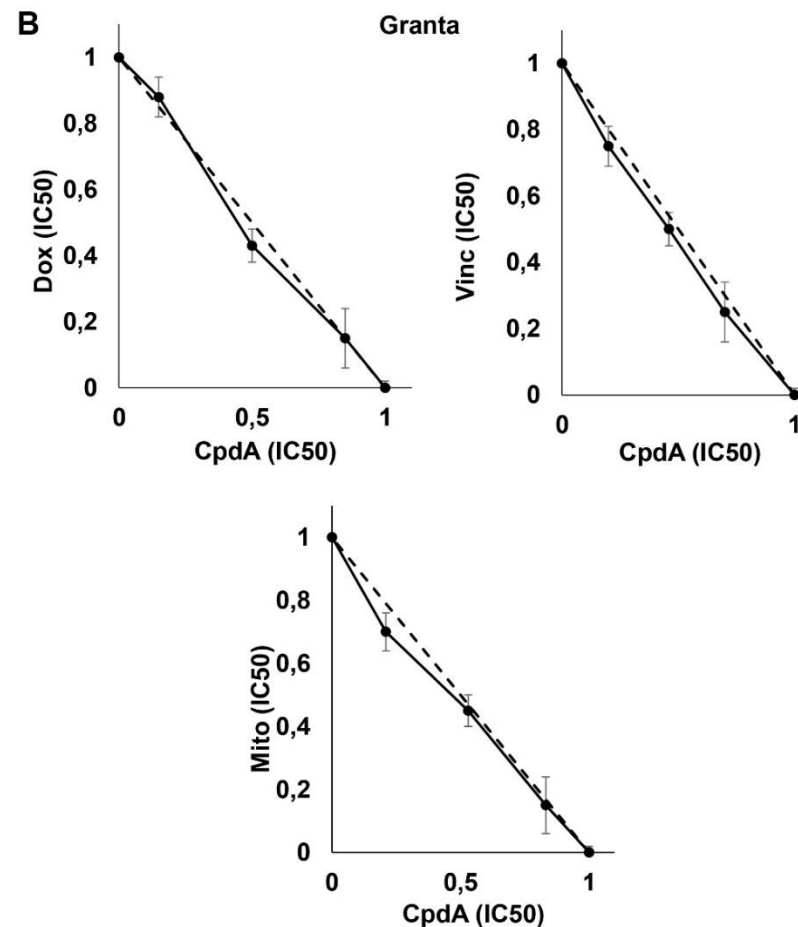
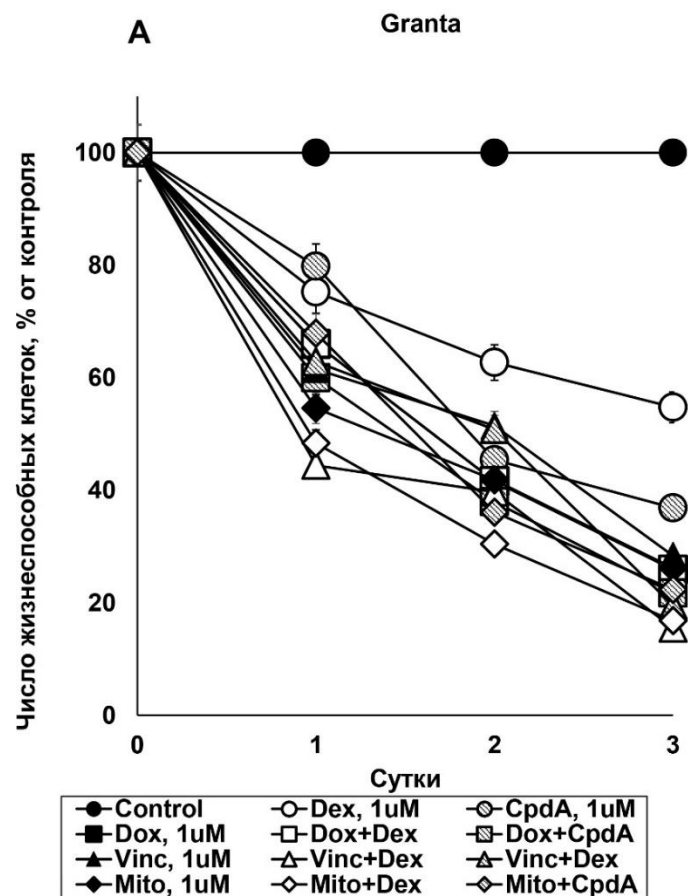


Рисунок 19 - Антипролиферативный эффект Dex, CpdA, Dox, Vinc, Mito и их комбинаций на клетки Granta. **A.** Клетки обрабатывали растворителем, Dex (1мкМ), CpdA (1мкМ), Dox (1мкМ), Vinc (1мкМ), Mito (1мкМ). Подсчет клеток проводили каждые 24 ч. **B.** Изоболограммы строили для комбинаций CpdA с Dox, Vinc и Mito. Концентрации исследуемых соединений, соответствующие IC50, принимали за 1,0 на осях абсцисс (CpdA) и ординат (Dox, Vinc или Mito)

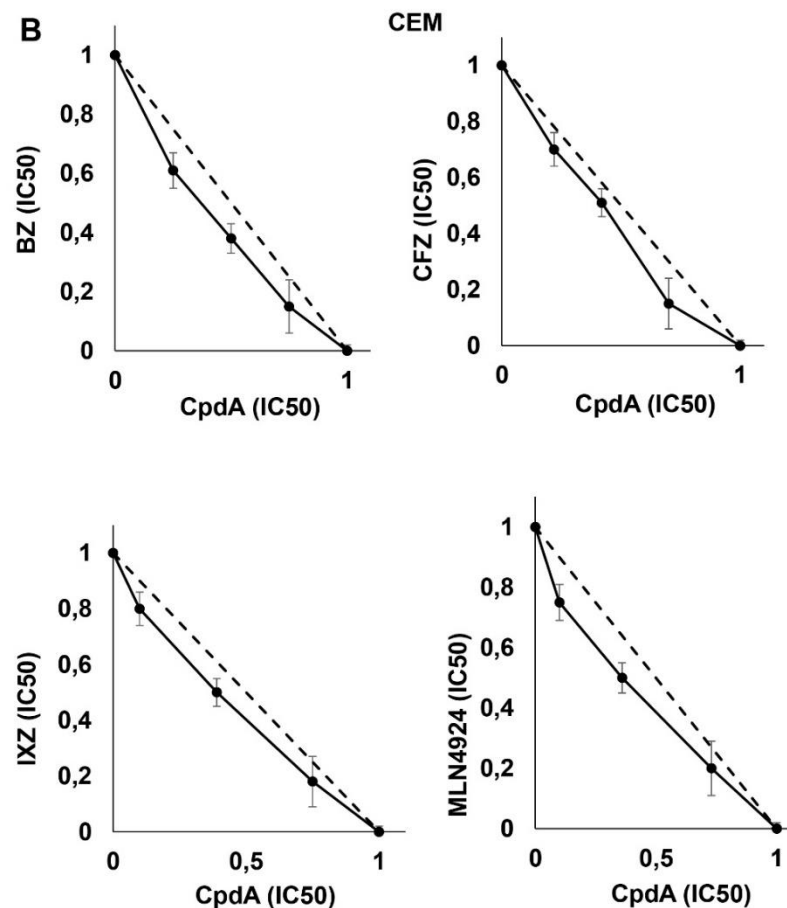
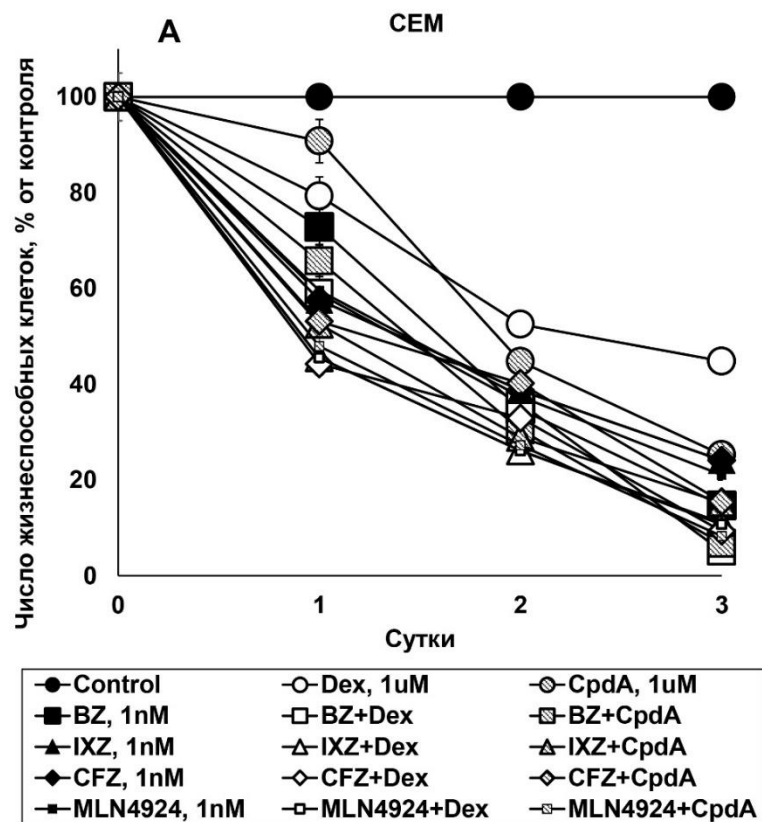


Рисунок 20 - Антипролиферативный эффект Dex, CpdA, BZ, CFZ, IXZ, MLN4924 и их комбинаций на клетки CEM. **A.** Клетки обрабатывали растворителем, Dex (1μM), CpdA (1μM), BZ (1nM), CFZ (1nM), IXZ (1nM), MLN4924 (1nM). Подсчет клеток проводили каждые 24 ч. **B.** Изоболограммы строили для комбинаций CpdA с BZ, CFZ, IXZ и MLN4924. Концентрации исследуемых соединений, соответствующие IC₅₀, принимали за 1,0 на осях абсцисс (CpdA) и ординат (BZ, CFZ, IXZ или MLN4924)

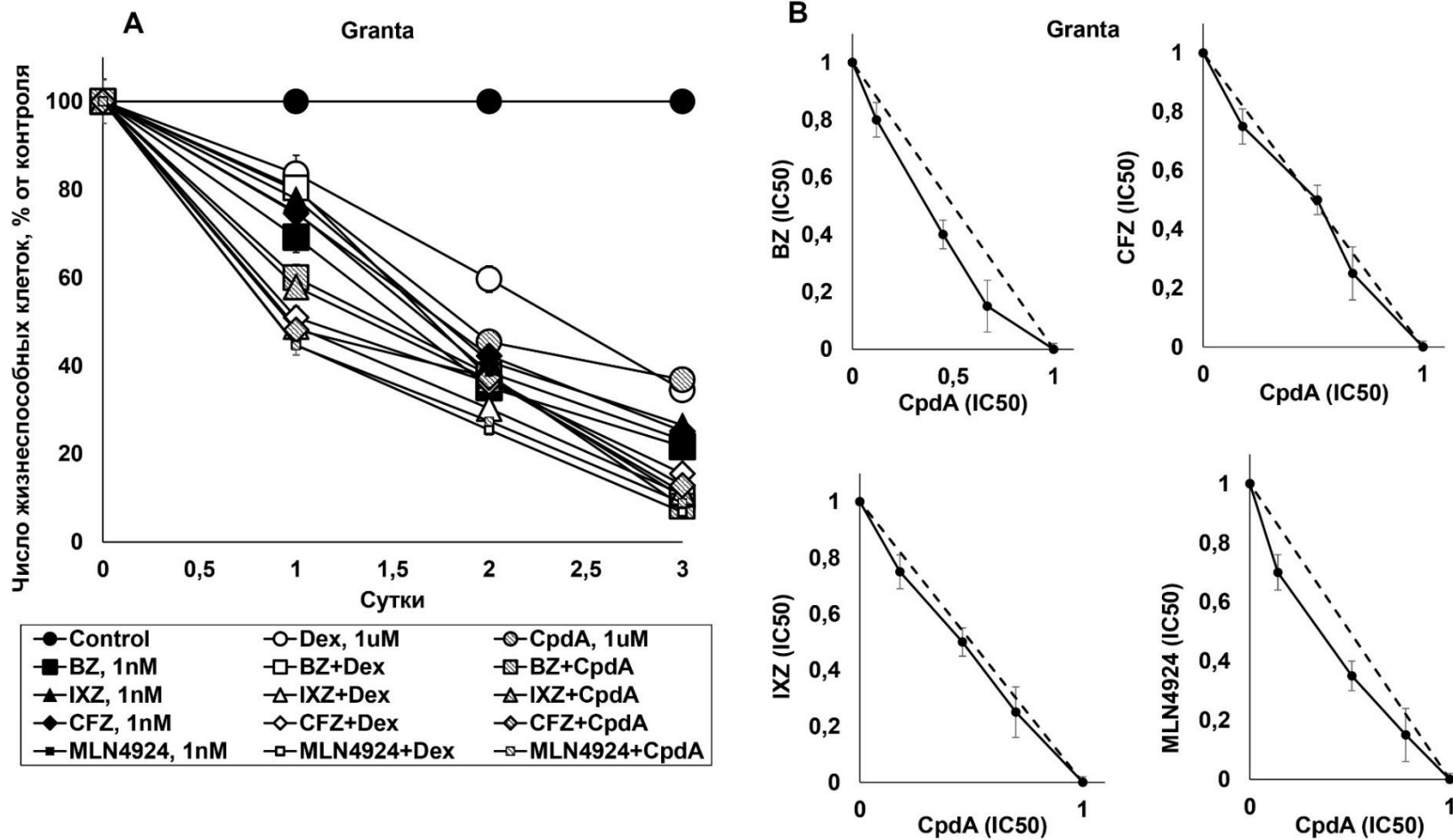


Рисунок 21 - Антипролиферативный эффект Dex, CpdA, BZ, CFZ, IXZ, MLN4924 и их комбинаций на клетки Granta. **А.** Клетки обрабатывали растворителем, Dex (1мкМ), CpdA (1мкМ), BZ (1нМ), CFZ (1нМ), IXZ (1нМ), MLN4924 (1нМ). Подсчет клеток проводили каждые 24 ч. **В.** Изоболограммы строили для комбинаций CpdA с BZ, CFZ, IXZ и MLN4924. Концентрации исследуемых соединений, соответствующие IC50, принимали за 1,0 на осях абсцисс (CpdA) и ординат (BZ, CFZ, IXZ или MLN4924)

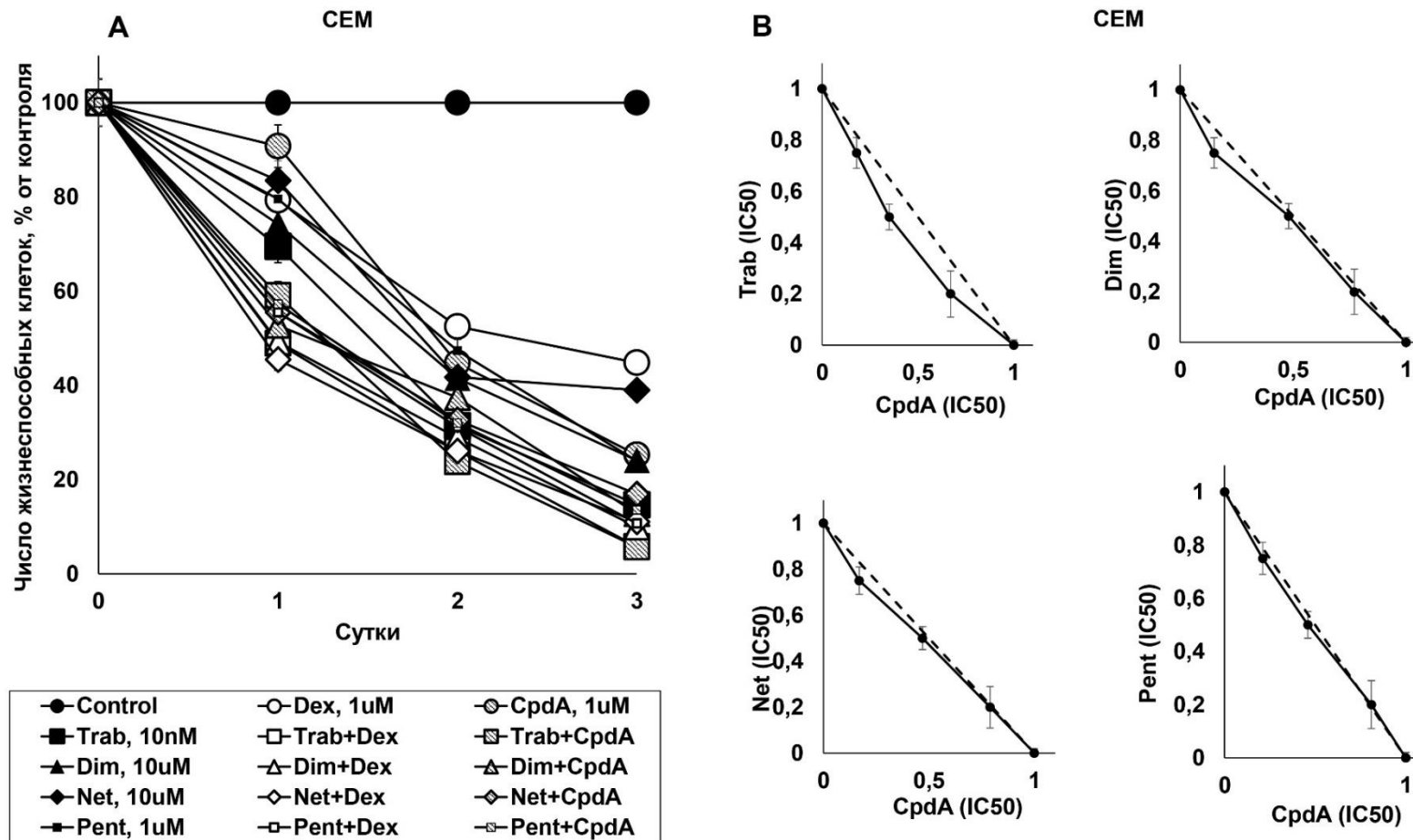


Рисунок 22 - Антипролиферативный эффект Dex, Cpda, Trab, Dim, Net, Pent и их комбинаций на клетки CEM. **А.** Клетки обрабатывали растворителем, Dex (1мкМ), Cpda (1мкМ), Trab (10нМ), Dim (10мкМ), Net (10мкМ), Pent (1мкМ). Подсчет клеток проводили каждые 24 ч. **В.** Изоболограммы строили для комбинаций Cpda с Trab, Dim, Net и Pent. Концентрации исследуемых соединений, соответствующие IC50, принимали за 1,0 на осях абсцисс (CpdA) и ординат (Trab, Dim, Net или Pent)

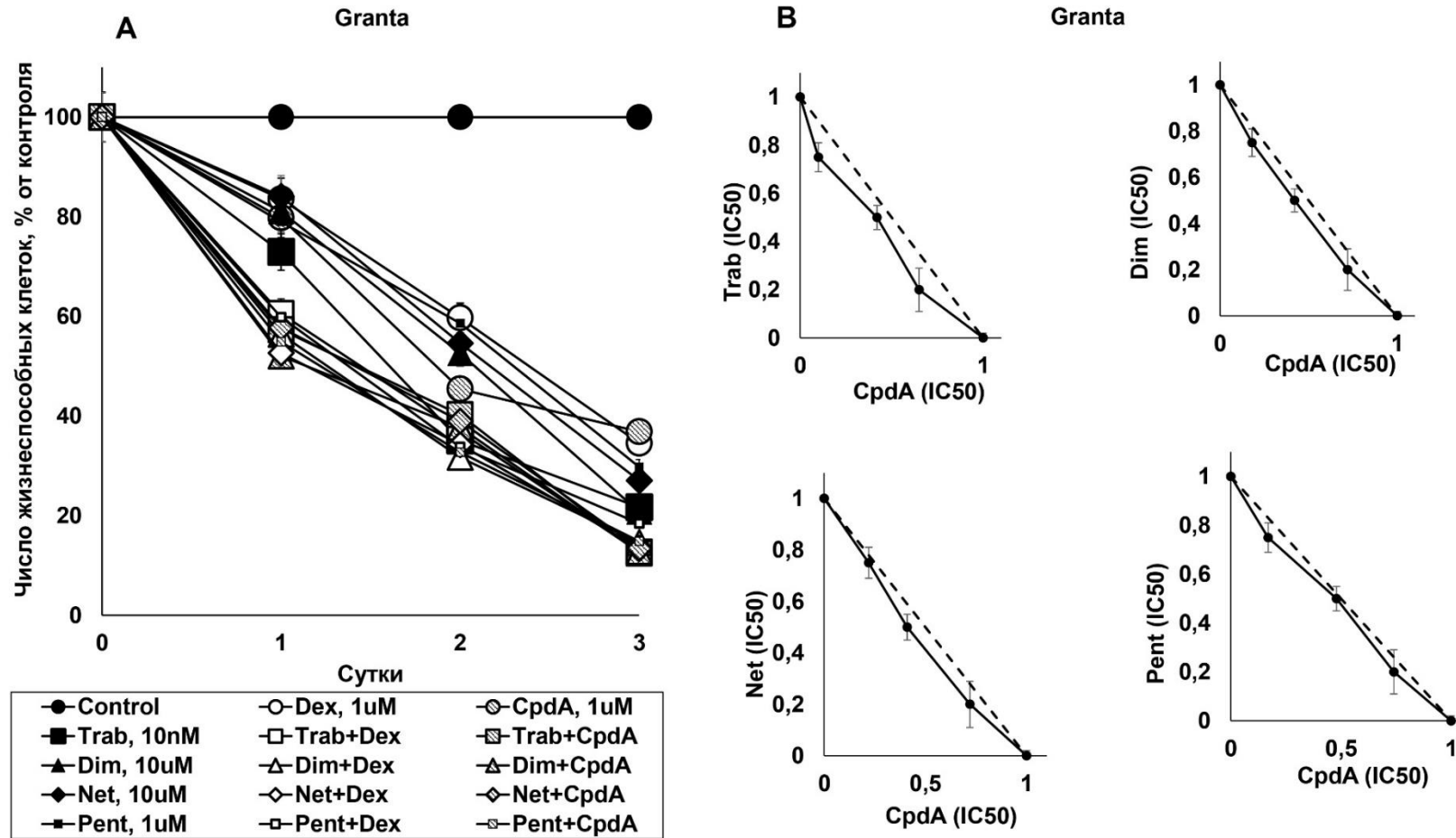


Рисунок 23 - Антипролиферативный эффект Dex, CpdA, Trab, Dim, Net, Pent и их комбинаций на клетки Granta. **A.** Клетки обрабатывали растворителем, Dex (1мкМ), CpdA (1мкМ), Trab (10нМ), Dim (10мкМ), Net (10мкМ), Pent (1мкМ). Подсчет клеток проводили каждые 24 ч. **B.** Изоболограммы строили для комбинаций CpdA с Trab, Dim, Net и Pent. Концентрации исследуемых соединений, соответствующие IC50, принимали за 1,0 на осях абсцисс (CpdA) и ординат (Trab, Dim, Net или Pent)

Таблица 6 - Комбинационный индекс (combination index, CI), характеризующий эффективность совместного действия CpdA и препаратов классов стандартных цитостатиков, ингибиторов УПС и узкобороздочных лигандов.

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

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

Было продемонстрировано, что антипролиферативный эффект данных соединений связан с усилением апоптоза в исследуемых клетках, причем для ряда препаратов степень подавления жизнеспособности клеток и тип совместного действия коррелирует со степенью индукции апоптоза. В частности, число клеток в пре-G1-фазе при 48-часовой инкубации клеток СЕМ индивидуально с дексаметазоном, CpdA или бортезомибом составило 18,2%, 14,8% и 26,7%, в сравнении с 7,3% клеток в пре-G1 фазе в контрольных образцах. При обработке клеток комбинациями BZ+Dex и BZ+CpdA этот показатель составил 36,1% и 42,7% (Рисунок 24А). Подобное потенцирование проапоптотических эффектов наблюдалось также в случае комбинирования лигандов GR с узкобороздочными лигандами диминазеном и трабектедином, а также с ингибитором убиквитинирования MLN4924 (Рисунок 24А). Для клеток лимфомы Granta данные эффекты были выражены слабее (Рисунок 24В).

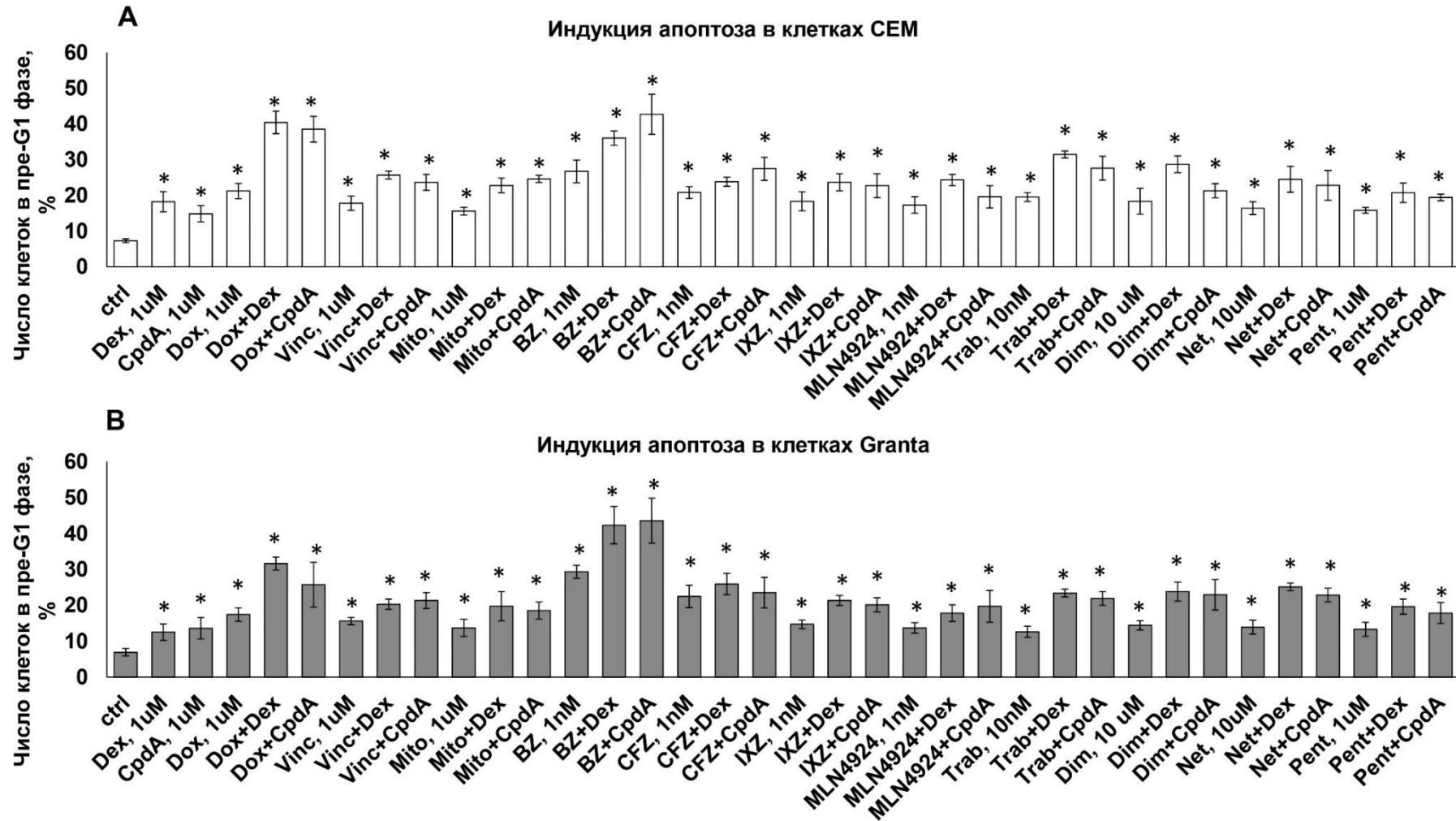


Рисунок 24 - Индукция апоптоза в клетках СЕМ (А) и Granta (В) после обработки Dex, CpdA, цитостатическими препаратами, ингибиторами УПС и узкобороздочными лигандами. Проапоптотический эффект Dex и CpdA определяли с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием окраски пропидий йодидом после 48 ч обработки. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

Наибольший интерес по своим эффектам на клетки лимфомы и лейкоза для нас представлял ингибитор протеасом бортезомиб. Во-первых, в наших и других исследованиях для него был показан синергизм цитотоксического действия в сочетании с CpдA (см. выше и [538]). Во-вторых, данный препарат уже одобрен FDA и зарегистрирован для использования в химиотерапии ряда злокачественных новообразований кроветворной системы.

В дополнение, были исследованы эффекты бортезомиба на Dех- и CpдA-индуцированные механизмы транс-репрессорный и транс-активационный механизмы. Было показано, что бортезомиб оказывает потенцирующее действие на эффекты CpдA. Так, с помощью люциферазного теста мы оценили влияние CpдA, бортезомиба и их сочетания на активность транскрипционных факторов NF-kB и AP-1. Как было продемонстрировано, в клетках СЕМ, несущих ген люциферазы под контролем промотора, содержащего регуляторные элементы NF-kB, падение активности репортерного гена после 8-часовой обработки комбинацией исследуемых соединений составило 69,5%. Следует отметить, что при инкубации клеток линии СЕМ отдельно с 1 мкМ CpдA или с 10 нМ бортезомиба это значение составило 51,3% и 27,4% относительно контроля, соответственно (Рисунок 25А). Аналогичные эксперименты на клетках линии Granta продемонстрировали падение активности NF-kB на 65,8%, 36,4% и 72,7% соответственно после 8-часовой инкубации клеток с 1 мкМ CpдA, 3 нМ бортезомибом, и их сочетанием. (Рисунок 25А).

Изучение совместного влияния CpдA и бортезомиба на транс-активационный механизм мы проводили на клетках СЕМ и Granta, несущих репортерный ген под контролем промотора, содержащего GRE. Было показано, что бортезомиб не вызывает запуска транс-активации, а CpдA, как уже было отмечено ранее, подавляет ее на 33% в клетках СЕМ и на 41% в клетках Granta (Рисунок 25В). Активность репортерного гена несущественно повышалась при обработке клеток обеих линий комбинацией CpдA и бортезомиба: относительно контроля увеличение составило 2-4% в случае линии СЕМ и 40% в случае клеток Granta (Рисунок 25С).

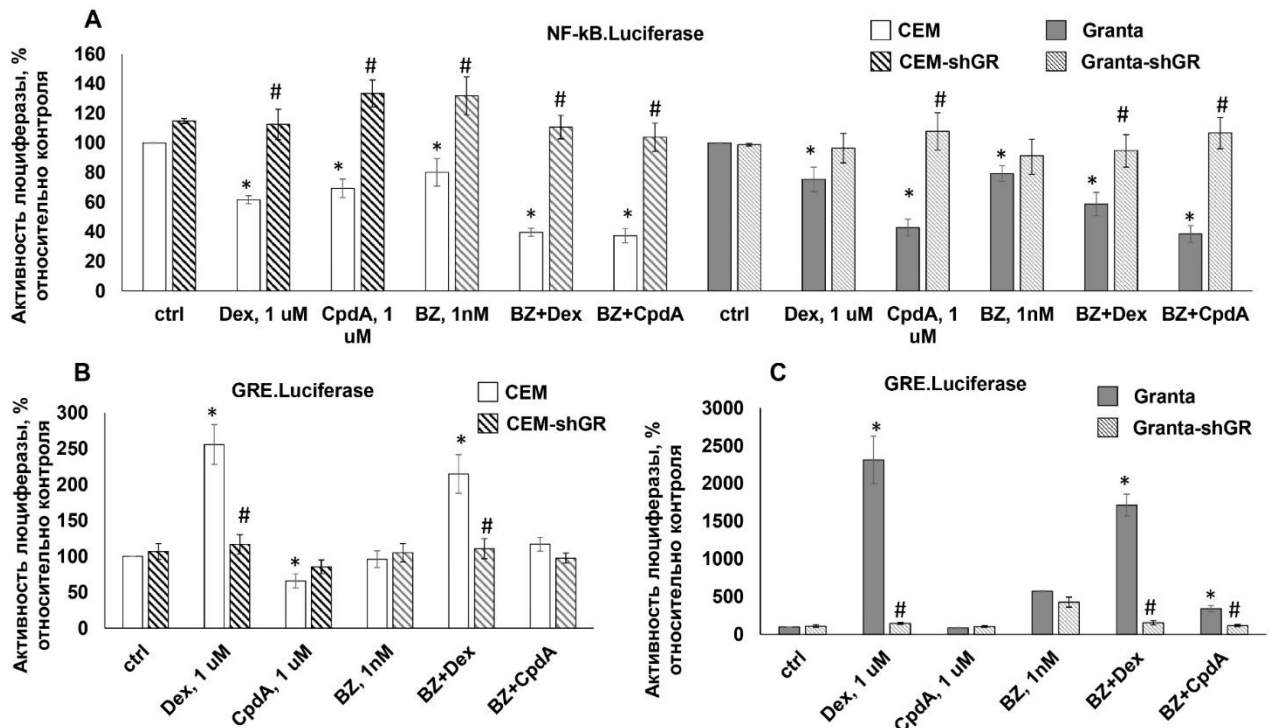


Рисунок 25 - Влияние Dex, CpdA, BZ и их комбинаций на степень запуска GR-зависимой транс-репрессии и транс-активации. Клетки CEM (A, B) и Granta (A, C) после трансдукции лентивирусных векторов pGF1-NF-kB и pGF1-GRE культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex (1мкМ), CpdA (1мкМ), BZ (1нМ) и их комбинаций. Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля ($p < 0.05$), # - статистически значимое отличие между активностью люциферазы в клетках, трансдуцированных вектором shGR и контрольным вектором pGIPZ, $p < 0.05$

Далее было исследовано противоопухолевое действие комбинации бортезомиба с CpдА. Ранее мы отработали методику подкожного введения ксенографтов лимфомы человека бестимусным мышам с использованием в качестве жидкой фазы для получения клеточной суспензии при инокуляции клеток формообразующей матрицы Matrigel (BD Biosciences, США) и провели эксперимент по изучению противоопухолевого действия дексаметазона, CpдА, бортезомиба или комбинации бортезомиб+CpдА *in vivo*. Было показано, что объем опухоли у животных, получавших раствор CpдА или глюкокортикоида дексаметазона, уменьшился в 3-4 раза по сравнению с животными контрольной группы (Рисунок 26А). Синергическое действие бортезомиба и CpдА наблюдали также и *in vivo*: у животных, получавших только бортезомиб, объем опухоли уменьшился в 2 раза, в то время как, у животных, получавших CpдА совместно с бортезомибом, объем опухоли уменьшился в 10 раз (Рисунок 26А).

При анализе результатов иммуногистохимического исследования было показано, что в образцах, полученных от животных, получавших CpдА, количество жизнеспособных клеток значительно меньше, чем в контроле, о чем судили по уменьшению экспрессии маркера пролиферации TUNEL (Рисунок 26В) и увеличению экспрессии каспазы 3, служащей маркером апоптоза (Рисунок 26С). Было проведено исследование полученных образцов опухолевой ткани на степень ангиогенеза. С помощью иммуногистохимического окрашивания CD31 было показано, что число CD31-положительных клеток в контрольных образцах выше, чем в образцах опухолей животных, получавших CpдА+бортезомиб, в 1,5 раза (Рисунок 26D). Формирование сосудов также было гораздо менее выражено в случае животных, получавших дексаметазон, CpдА, бортезомиб или их комбинацию (Рисунок 26D).

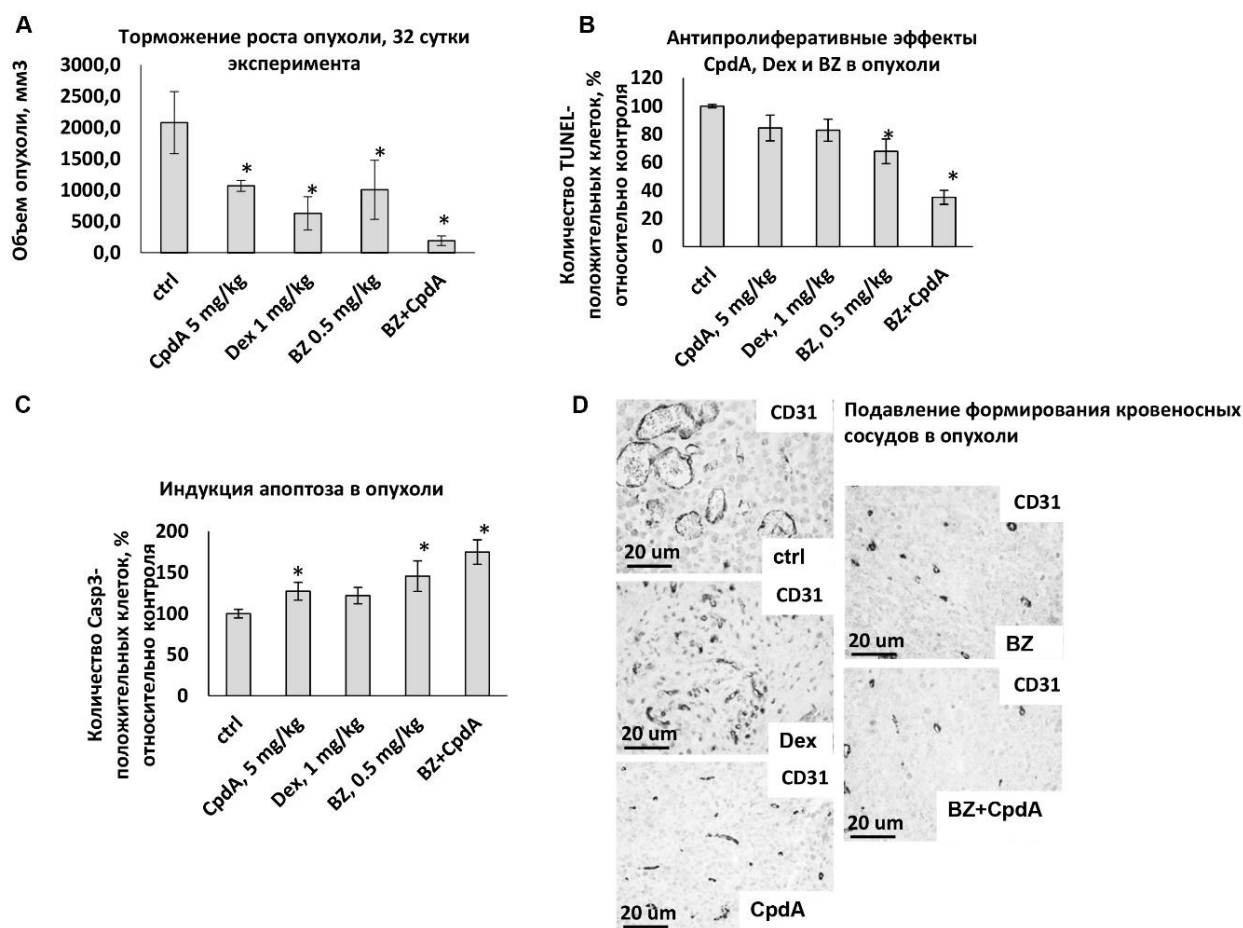


Рисунок 26 - Эффективность терапевтического действия Dex, CpdA и BZ на ксенографты лимфомы мантийной зоны селезенки Granta. **А.** Средний объем ксенографтов на 32 день эксперимента. Физиологический раствор (ctrl), Dex (1 мг/кг), CpdA (5 мг/кг) вводили внутривентриально на 1, 3 и 5 дни недели, BZ (0,5 мг/кг) вводили внутривентриально на 2 и 4 дни недели. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=10$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. **Б.** Характеристические гистологические срезы опухолей в контрольной и экспериментальных группах. **С, Д, Е.** Количественный анализ плотности клеток в опухоли (**С**), TUNEL- (**Д**) и Casp3- (**Е**) положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином или специфическими антителами к TUNEL и Casp3. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. **Ф.** Характеристическое иммуногистохимическое окрашивание CD31.

3.2. Разработка подходов к получению новых SEGRA на основе молекулы CpдA

Как было продемонстрировано в ходе исследований, описанных в разделе 3.1., CpдA имеет большой трансляционный потенциал по использованию в химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы. Однако данная молекула имеет также ряд недостатков. В частности, описана ее низкая стабильность в водных растворах [495], и, хотя также описана стабилизация молекулы CpдA белками сыворотки крови при введении в кровеносное русло, это не решает проблему реализации и хранения растворов. Также молекула CpдA является хиральной – один из атомов углерода в ее составе связан с 4 различными заместителями, от взаимного расположения которых зависит конформация молекулы и, следовательно, ее биологические свойства. Оптические изомеры хиральной молекулы обладают одинаковыми физико-химическими свойствами, однако их биологические свойства могут существенно различаться. Таким образом, следующим этапом наших исследований являлись разработки подходов к повышению стабильности молекулы CpдA, а также выделение и исследование свойства энантиомеров CpдA.

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

В качестве одного из подходов к стабилизации молекулы CpдA было предложено получить наночастицы из липопротеинов высокой плотности с ядром из золота (high density lipoprotein nanoparticles, HDL NP). Получение подобных наночастиц проводили совместно с лабораторией проф. Ш. Тэкстона (отдел урологии, университет Норсвестерн, Чикаго, США) и проф. И. Будуновой (отдел дерматологии, университет Норсвестерн, Чикаго, США). Методика получения HDL NP была отработана в лаборатории проф. Тэкстона ранее, а также были охарактеризованы их противоопухолевые свойства, основанные на их антиоксидантных, противомикробных, противовоспалительных и иммуногенных свойствах [683–685]. В то же время, HDL NP обеспечивают доставку холестерина в стероидогенные органы, где производится синтез стероидных гормонов, являющихся важными регуляторами процессов жизнедеятельности как нормальных, так и опухолевых клеток [686, 687]. В частности, была показана стимуляция метастазирования при агрессивном раке молочной железы при применении HDL NP [685]. Нами было высказано предположение, что загрузка CpдA в HDL NP будет способствовать его таргетной доставке в органы синтеза глюкокортикоидов и созданию более высокой конкуренции с эндогенными GC за связывание с GR. Более того, липопротеины высокой плотности, как и высокомолекулярные белки сыворотки, будут способствовать стабилизации молекулы CpдA, а также собственные противоопухолевые свойства HDL NP будут дополняться противоопухолевыми свойствами CpдA, что приведет к синергизму их совместного действия.

Синтез HDL NP был осуществлен по отработанной и описанной в «Материалах и методах» методике с добавлением CpдA в молярном избытке. С помощью МТТ-теста на цитотоксичность был оценен эффект HDL NP-CpдA на жизнеспособность клеток лейкоза СЕМ и клеток лимфомы Granta. Однако в ходе исследований было показано, что цитотоксичность HDL NP, не загруженных CpдA, идентична цитотоксичности HDL NP-CpдA (IC50 для клеток СЕМ в первом случае составило 0,11 мкМ, во втором случае – 0,14 мкМ, Рисунок 27А, для клеток Granta данные показатели составили 0,09 и 0,08 мкМ, соответственно, см. Рисунок 27В). При повторении части экспериментов нами было проведено сравнение цитотоксичных свойств исходного раствора CpдA с цитотоксичностью раствора остаточного раствора после синтеза HDL NP (Рисунок 27). Было показано, что эффект данных растворов совпадает, соответственно, проблема заключалась в недостаточной загрузке CpдA в HDL NP при синтезе, что может быть связано с отсутствием сродства CpдA к липопротеинам высокой плотности. Таким образом, была предпринята попытка стабилизации и усилению противоопухолевых свойств CpдA с помощью его загрузки в HDL NP, однако данный способ был признан неэффективным и требующим дальнейшей оптимизации, что не входило в задачи исследования.

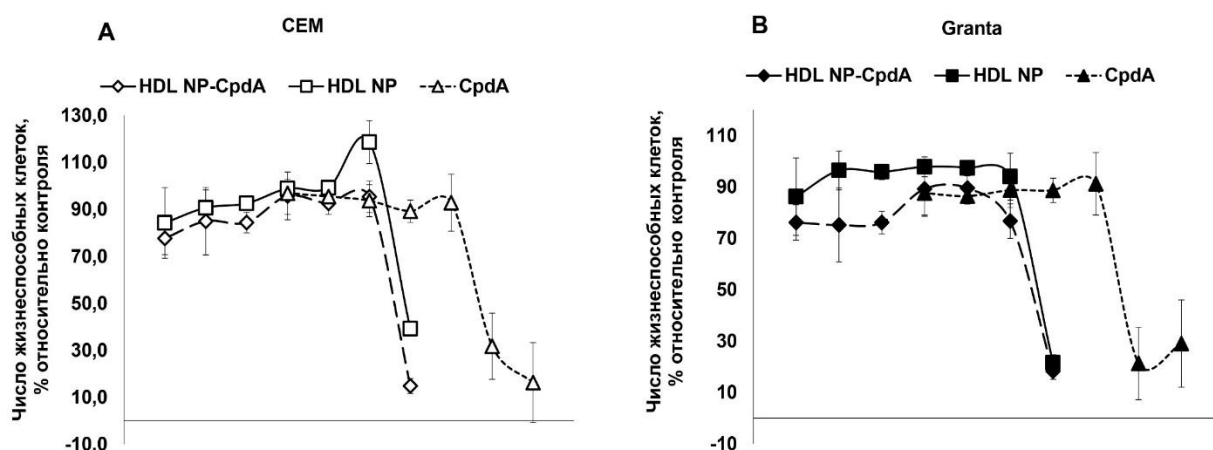


Рисунок 27 - Антипролиферативный эффект HDL NP, HDL NP-CpдA в сравнении с CpдA на клетках СЕМ (А) и Granta (В). После синтеза и очистки HDL NP, HDL NP-CpдA клетки обрабатывали растворителем, HDL NP, HDL NP-CpдA и CpдA в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТS-теста на цитотоксичность, как описано в «Материалах и методах»

3.2.2. Исследование противоопухолевой активности энантиомеров CpдА *in vitro*

3.2.2.1. Разработка подходов к получению энантиомеров CpдА

При выделении оптически чистых изомеров CpдА вначале нами была предпринята попытка разделить имеющуюся в наличии рацемическую смесь CpдА с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографической колонке с обращенной фазой C18 раствором элюента, содержащего метанол, ацетонитрил, воду, а также муравьиную кислоту и ацетат аммония (pH<7.0). Раствор элюента, содержащий CpдА, был получен спустя 2,5 мин после начала элюции. Структуру CpдА подтверждали на масс-спектрометре (детектировали присутствие иона с отношением молекулярной массы к заряду иона 192, что соответствует CpдА при потере атома хлора). Затем данный эксперимент повторяли при тех же условиях, но после инкубации CpдА в течение 3 суток при 6 С. При данных условиях было показано, что CpдА остается относительно стабильным в течение всего времени инкубации (в растворе были обнаружены только следовые количества азиридина). Таким образом, была показана стабильность CpдА при инкубации его водного раствора при 6°С в течение 3 суток.

Далее для разделения CpдА была использована хроматографическая колонка с хиральной фазой ReproSil 100 Chiral-AA, однако разделение энантиомеров на данной колонке провести не удалось. Мы связываем это со специфичностью данной колонки к аминокислотам.

В дальнейшем было принято решение провести синтез энантиомеров CpдА на оптически активном субстрате, что снимает проблему разделения рацемической смеси. На химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова проводили синтез чистых энантиомерных форм (Рисунок 28).

Синтез чистых энантиомеров CpдА осуществлен на основании асимметричного дигидроксилирования алкенов по Шарплессу [669] (Рисунок 29) по следующей схеме: Стирол, защищенный ацетатной группой (3), обрабатывали коммерчески доступной реакционной смесью AD-mix-β (тетраоксид осмия OsO₄ в качестве окислителя, гексацианоферрат (III) калия K₃Fe(CN)₆ в качестве кооксиданта, карбонат калия K₂CO₃ в качестве буфера для поддержания щелочной среды, и аддукт фталазина с дигидрохинидином, позволяющий получить чистый (R)-энантиомер CpдА).

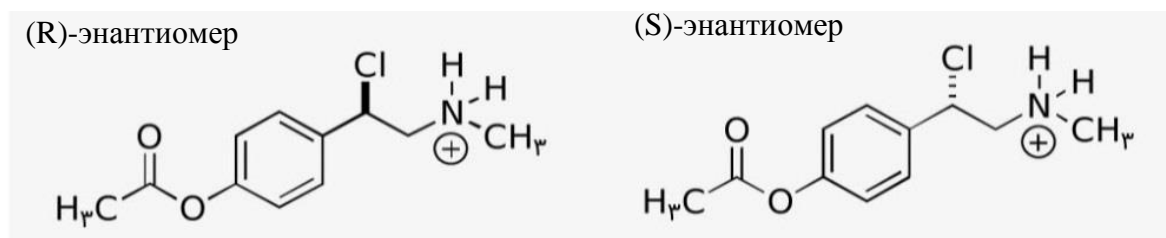


Рисунок 28 - Энантиомеры CpдА

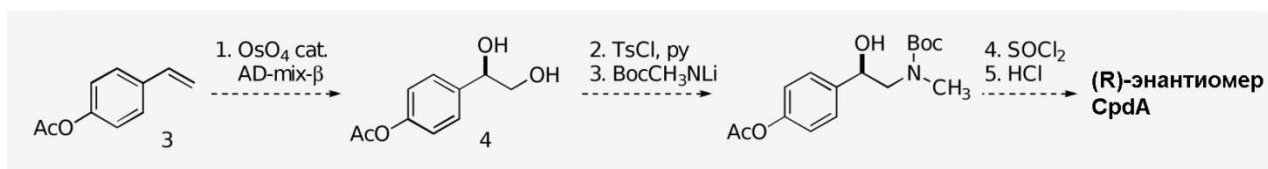


Рисунок 29 - Схема синтеза чистых энантиомеров CpдA на основании асимметричного дигидроксилирования алкенов по Шарплессу

Диол (4) обрабатывали в пиридине тозил хлоридом и N-Вос-N-метиламидом лития и получают спирт (5). При обработке продукта (5) тионилхлоридом и последующим удалением Вос-защитной группы при добавлении безводного хлороводорода получали (R)-энантиомер CpдA. Получение (S)-энантиомера CpдA проводили по аналогичной схеме с помощью реакционной смеси AD-mix- α , где в качестве стереоселективного катализатора использовали аддукт фталазина с дигидрохинином. Оценка чистоты полученных энантиомеров проводилась с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с хиральной неподвижной фазой. Наиболее оптимально проводить ВЭЖХ-анализ после обработки тионилхлоридом, но перед удалением Вос-защитной группы и образованием аммонийной соли, поскольку выделение CpдA из рацемической смеси представляет собой более трудоемкий процесс. Подтверждение пространственной структуры полученных энантиомеров проводилась по измерению угла вращения плоскости поляризации монохроматического света на поляриметре, подтверждение химической структуры проводили с помощью H^1 -ЯМР-спектроскопии (Рисунок 30).

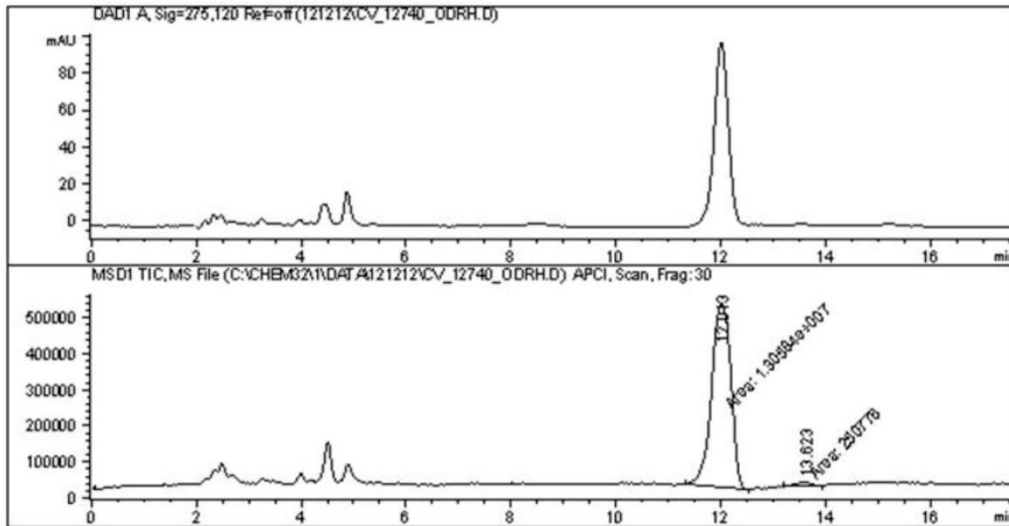
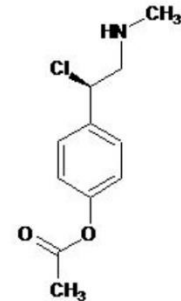
Chiralcel OD-RH
4.6*150 mm
1ml/min
55%H₂O 45%MeCN

Data File C:\CHEM32\1\DATA\121212\CV_12740_ODRH.D

```

=====
Acq. Operator   :
Acq. Instrument : Instrument 1          Location : Pl-F-09
Injection Date  : 12/12/2012 11:14:10 AM  Inj : 1
                                           Inj Volume : 2 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\CHIRAL_30.M
Last changed   : 12/12/2012 11:11:40 AM  (modified after loading)
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\CHIRAL_30.M
Last changed   : 12/10/2012 6:04:47 PM  (modified after loading)
Sample Info    : Chiralcel ODRH 150*4.6mm 45%MeCN
=====

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=275,120 Ref=off

Signal 2: MSD1 TIC, MS File

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area	Height	Area %
1	12.013	MM	0.4241	1.30584e7	5.13219e5	98.1158
2	13.623	MM	0.3714	2.50776e5	1.12528e4	1.8842

Totals : 1.33092e7 5.24472e5

Рисунок 30 - Фрагмент ¹H-ЯМР-спектра R-энантиомера CpдA. Спектры ¹H-ЯМР записаны на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker Avance-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц в D₆DMSO

3.2.2.2. Оценка антипролиферативного и проапоптотического эффектов энантиомеров CpdA

Определение антипролиферативного эффекта проводили в течение 24-х и 48-часовой инкубации с растворителем, Dex, CpdA или энантиомерами CpdA (R, S) с помощью прямого подсчета клеток. Рабочие концентрации энантиомеров CpdA, выбранные нами для использования в работе, составили 1 мкМ аналогично рабочим концентрациям рацемата CpdA, а также Dex, и для каждого из энантиомеров. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ после обработки Dex в течение 24ч составило 69,1%, после обработки CpdA – 54,7%. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ после обработки энантиомерами CpdA составило 57,2% после обработки S-энантиомером CpdA в течение 24-х часов, а после аналогичной обработки R-энантиомером CpdA - 43,8% (Рисунок 31А). В то же время цитотоксический эффект всех исследуемых соединений на клетки с подавленной экспрессией GR был гораздо менее выражен. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-shGR после обработки Dex в течение 24ч составило 87,3%, после обработки CpdA – 86,0%. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-shGR после обработки энантиомерами CpdA составило 80,0% после обработки S-энантиомером CpdA в течение 24-х часов, а после аналогичной обработки R-энантиомером CpdA - 83,3%. Аналогичные эффекты наблюдали для клеток линий Granta и Granta-shGR. В частности, наблюдали снижение жизнеспособности клеток после обработки Dex и CpdA на 30% и на 45%, при обработке клеток R- и S-CpdA число живых клеток составило порядка 50% относительно контроля. На клетках Granta-shGR с подавленной экспрессией рецептора в случае Dex число жизнеспособных клеток не снижалось, в случае рацемической смеси CpdA и его оптически чистых изомеров наблюдали незначительное подавление пролиферации клеток на 15-20% по отношению к контролю. Более того, число жизнеспособных клеток в случае линии Granta-shGR статистически значимо превышало количество живых клеток в случае линии Granta без нокаута GR.

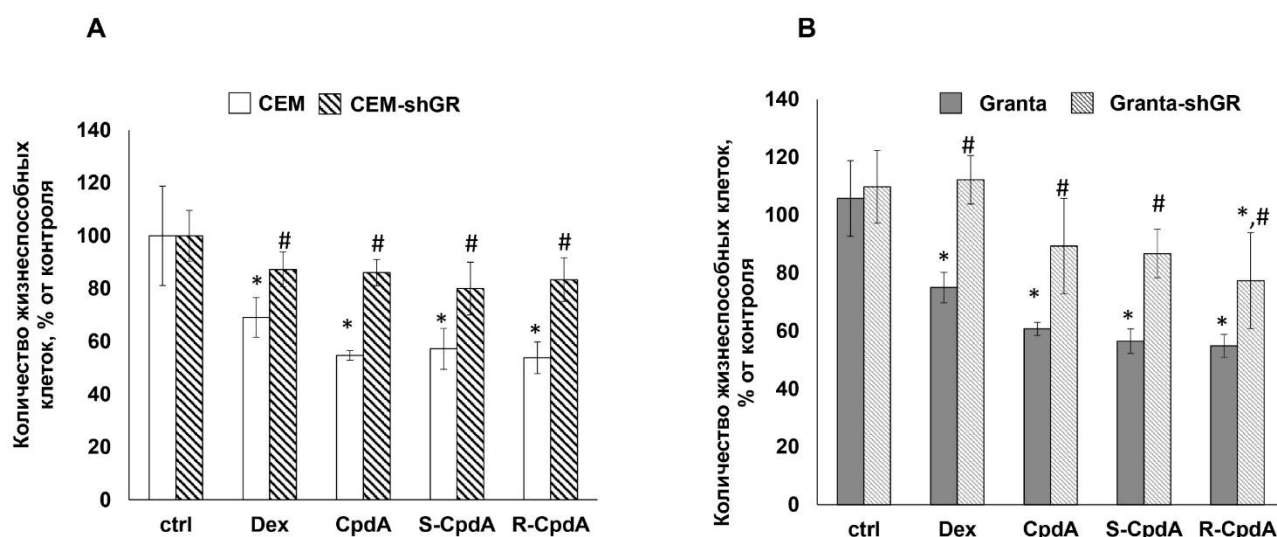


Рисунок 31 - Антипролиферативный эффект энантиомеров CpdA на клетки CEM, Granta, CEM-shGR, Granta-shGR. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантиомеров CpdA (R, S) (все соединения в концентрации 1мкМ). Подсчет количества живых клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток. На рисунке представлено количество живых клеток после обработки Dex, CpdA или одним из энантиомеров CpdA (R, S) в процентах от контроля, обработанного растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие между числом жизнеспособных клеток, трансдуцированных вектором shGR и контрольным вектором pGIPZ, $p < 0.05$

С помощью проточной цитофлуориметрии было продемонстрировано, что в клетках исследуемых линий инкубация с Dex, CpdA и с обоими энантиомерами CpdA, вызывала запуск апоптоза в клетках острого лимфобластного лейкоза CEM. Количество клеток, находящихся в пре-G₁ фазе, после обработки Dex в течение 48 ч составило 16,5% по сравнению с 3,6% в контрольных образцах, после обработки рацемической смесью CpdA – 15,7%. Однако после обработки R- и S-энантиомерами количество клеток, находящихся в пре-G₁ фазе, составило 18,0% и 20,5% соответственно. Таким образом, антипролиферативный эффект энантиомеров CpdA связан с запуском апоптоза, причем R- и S-энантиомеры обладают более ярко выраженным проапоптотическим эффектом, чем их рацемическая смесь или дексаметазон (Рисунок 32А). Данные для клеток линии Granta были менее выражены: в контрольных образцах уровень апоптоза составил 4,8%, в то время как при обработке Dex и CpdA число клеток в пре-G₁ фазе составило 10,8% и 9,1%. Для энантиомеров CpdA число апоптотических клеток лежало в том же диапазоне и составило 11,0% для R-CpdA и 10,3% для S-CpdA (рис. 37В).

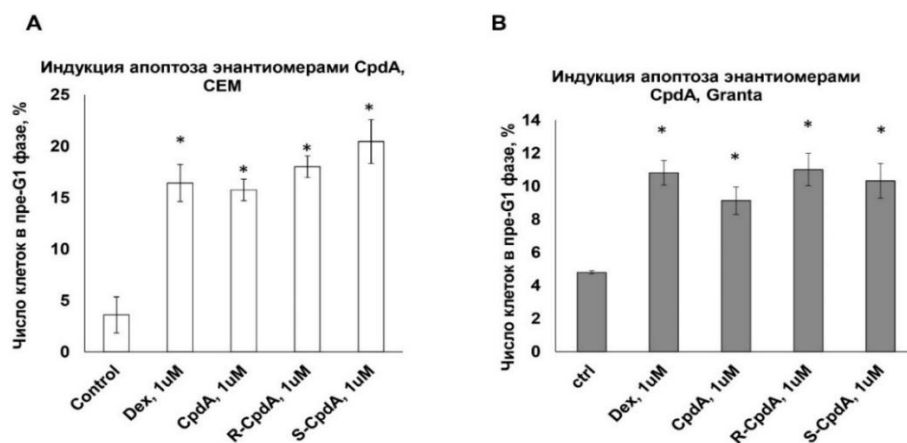


Рисунок 32 - Проапоптотический эффект GC, CpдA и энантиомеров CpдA в клетках CEM и Granta. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA, S-CpdA, R-CpdA (все соединения в концентрации 1мкМ). Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по количеству клеток в пре-G1-фазе. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

3.2.2.3. Исследование способности энантиомеров CpдA к запуску транс-репрессии и транс-активации

Оценку транс-репрессорного потенциала энантиомеров CpдA проводили по отработанной ранее схеме: анализ экспрессии генов - маркеров транс-репрессии совместно с репортерным анализом влияния на активность фактора транскрипции NF-κB. В качестве маркеров транс-репрессии были выбраны гены, регулируемые NF-κB – регуляторы клеточного цикла циклины D1 и D2, содержащих в промоторной области сайты связывания NF-κB для клеток CEM, и цитокины IL-6β и IL-1β для клеток Granta, поскольку основным патогенетическим звеном мантийноклеточной лимфомы является хромосомная транслокация t(11;14), затрагивающая гены иммуноглобулина H и *CCND1/D2* [688]. При обработке Dex клеток линии CEM экспрессия гена *CCND1* снизилась в 3,1 раза, в то время как при обработке CpдA этот показатель снизился в 1,7 раза. При обработке S- и R-энантиомерами экспрессия того же гена в клетках была подавлена в 1,3 и 2,2 раза (Рисунок 33А). Экспрессия гена *CCND2* после обработки Dex и CpдA снизилась на 15-20%. При обработке S- и R-энантиомерами экспрессия *CCND2* снизилась по сравнению с рацемической смесью в 1,2 и 1,3 раза соответственно, отличие от контроля показал лишь R-энантиомер (Рисунок 33В). Схожие результаты были отмечены для клеток линии Granta: экспрессия генов *IL-6β* и *IL-1β* снижалась после обработки исследуемыми соединениями в 1,3-1,7 раза. Более выраженный эффект на подавление экспрессии *IL-1β* был показан для S-CpdA, а в случае анализа экспрессии гена *IL-6β* было показано, что ингибирующий эффект R-CpdA выражен сильнее (Рисунок 33С, D).

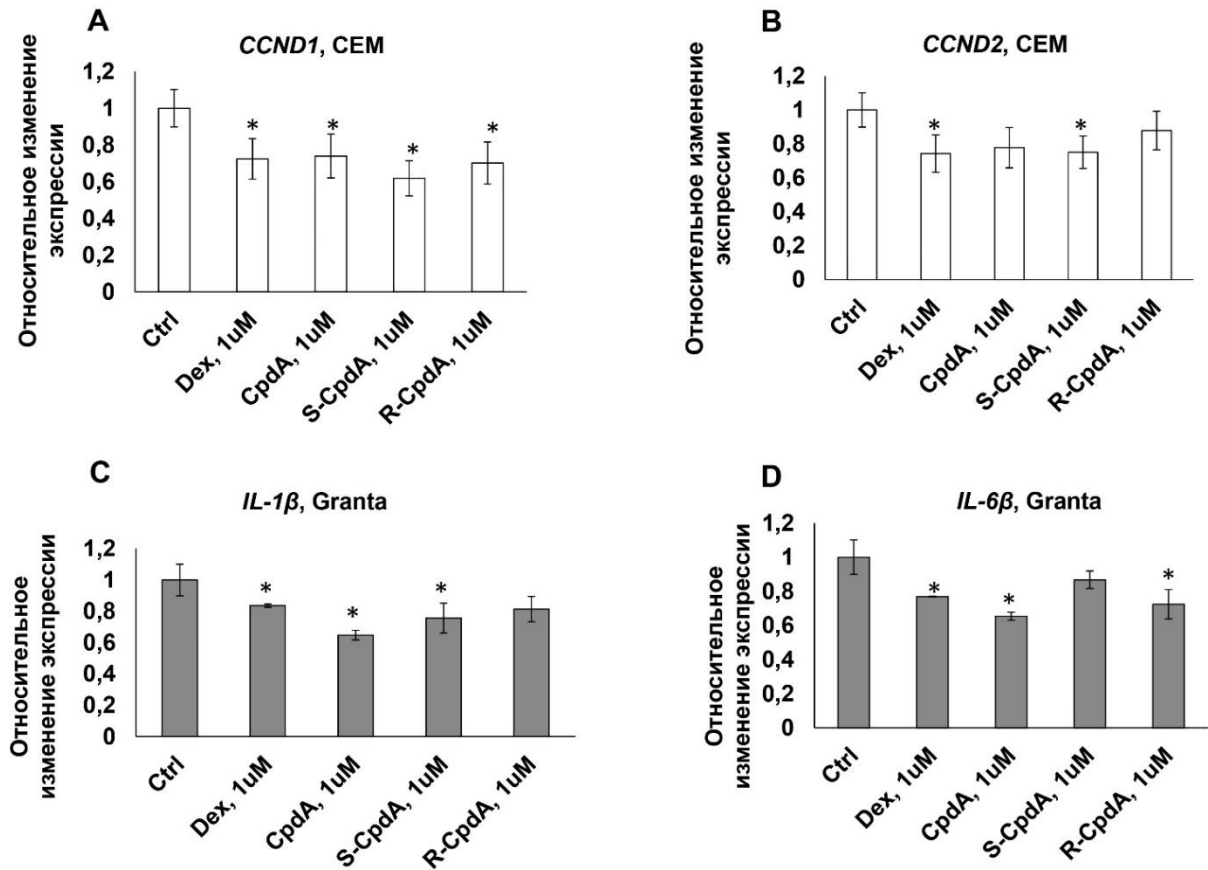


Рисунок 33 - Влияние энантиомеров Cpda на экспрессию генов-маркеров транскрипции в клетках CEM (A, B) и Granta (C, D). Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, Cpda, S-Cpda, R-Cpda (все соединения в концентрации 1мкМ). Уровень экспрессии генов *CCND1*, *CCND2*, *IL-6β* и *IL-1β* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

Данные ПЦР-анализа подтверждались результатами люциферазного репортерного анализа, представленными на рисунке 34. В клетках CEM-NF-kB.Luc, стабильно экспрессирующих люциферазу светлячка под контролем NF-kB-зависимого промотора, после обработки клеток энантиомерами Cpda, а также рацемической смесью Cpda и Dex в качестве положительного контроля, наблюдалось снижение активности NF-kB в 1,5-2,5 раза (Рисунок 34).

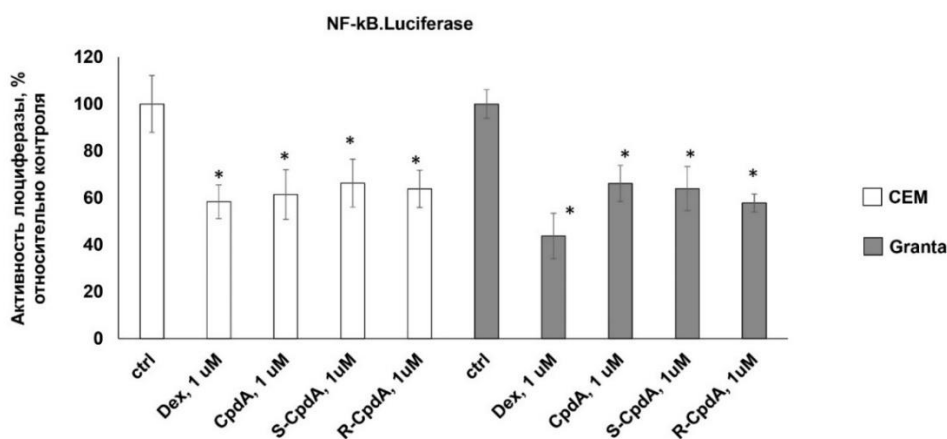


Рисунок 34 - Влияние энантиомеров CpdA на активность NF-kB. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-NF-kB клетки CEM и Granta культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, S-CpdA, R-CpdA (все соединения в концентрации 1 мкМ). Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

Транс-активационный потенциал энантиомеров CpdA был проанализирован путем оценки изменения экспрессии GR-зависимых генов *FKBP51* и *GILZ*, несущих в своих промоторах респонсивные элементы глюкокортикоидов, с помощью количественного ПЦР анализа. Мы исследовали изменение экспрессии генов *FKBP51* и *GILZ* при обработке Dex, CpdA и энантиомерами CpdA (R, S) клеток Granta и CEM. Количество мРНК вышеперечисленных генов сильно возрастало после обработки Dex в 6,1 и 5,5 раз для *FKBP51* и *GILZ* соответственно, в то время как при инкубации клеток CEM с CpdA экспрессия этих генов уменьшалась (Рисунок 35А, В). Для клеток Granta была показана индукция экспрессии *FKBP51* и *GILZ* после обработки Dex в 3,6 и 4,6 раза соответственно, а также незначительное снижение экспрессии этих генов при обработке CpdA на 15-25% (Рисунок 35С, D). Экспрессия гена *FKBP51* при обработке клеток CEM и Granta S-энантиомером CpdA снижалась в 2 раза, аналогичное наблюдение было сделано по экспрессии гена *GILZ* в клетках CEM при обработке вышеуказанным энантиомером (снижение в 3 и 2 раза). Однако в присутствии R-энантиомера экспрессия гена *GILZ* незначительно повышалась (на 10% и 20% соответственно) в клетках CEM, но эти показатели были статистически неотличимы от контроля. Несущественное снижение уровня транскрипции данных генов на 10-20% было показано для клеток Granta при обработке их R-CpdA.

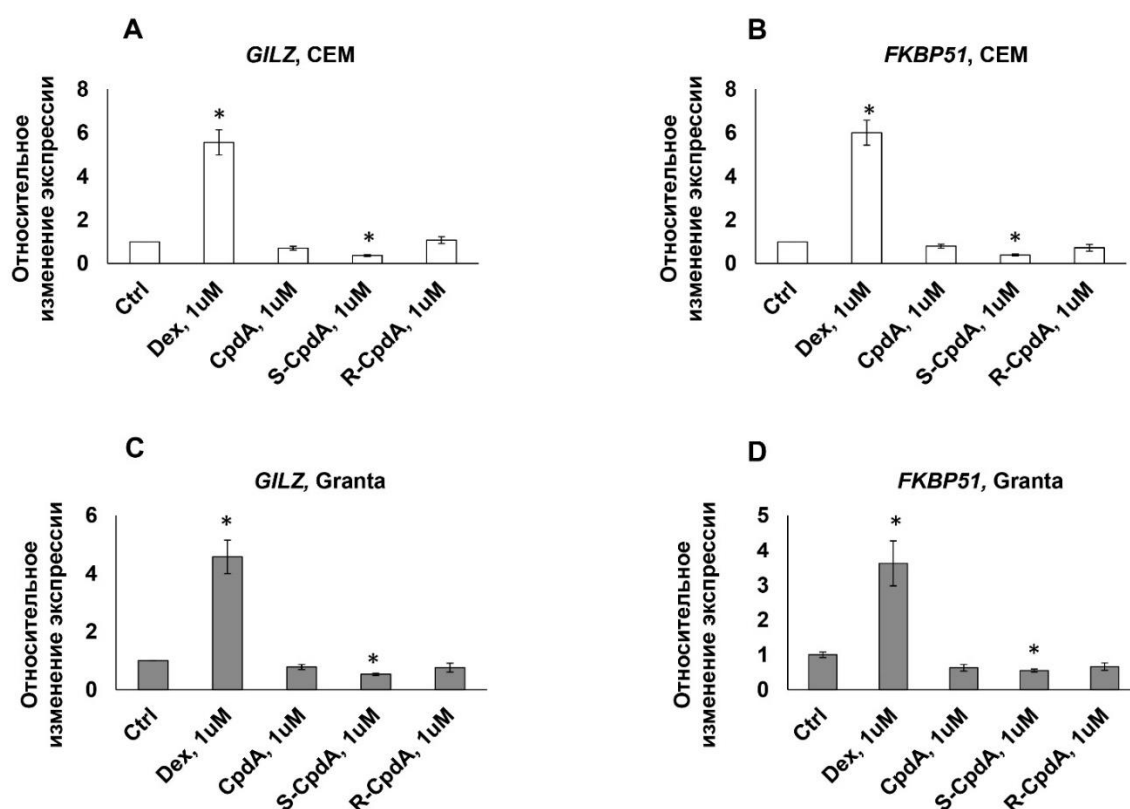


Рисунок 35 - Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-активации. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, S-CpdA, R-CpdA (все соединения в концентрации 1µM). Уровень экспрессии FKBP51 и GILZ определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена RPL27. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

Таким образом, энантиомеры CpdA по своему эффекту на экспрессию GR-зависимых генов *FKBP51* и *GILZ* заметно отличается от рацемической смеси CpdA. В частности, S-энантиомер проявил бóльшую способность к подавлению транс-активации и запуску транс-репрессии по сравнению с рацемической смесью.

Данные люциферазного анализа согласовались с результатами количественной ПЦР (Рисунок 36). Так, в случае обработки клеток CEM-GRE.Luc всеми исследуемыми соединениями было показано, что Dex в 2,3 раза увеличивает активность люциферазы, в то время как рацемическая смесь CpdA и его оптически чистые изомеры не вызывали такого эффекта. Более того, в случае R-CpdA было продемонстрировано статистически значимое снижение активности люциферазы в 1,4 раза. В случае клеток лимфомы Granta наблюдали схожий эффект с тем отличием, что тенденцию к снижению активности люциферазы проявляли как оба энантиомера, так и рацемическая смесь CpdA (Рисунок 36).

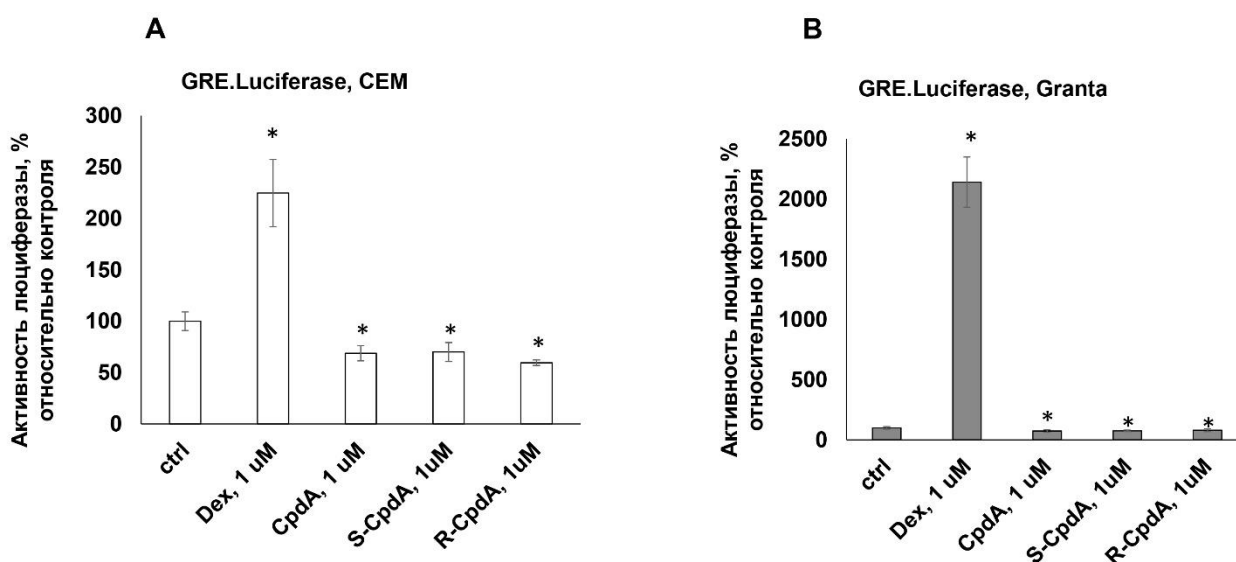


Рисунок 36 - Влияние энантиомеров CpdA на активность GR. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки CEM и Granta культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, S-CpdA, R-CpdA (все соединения в концентрации 1 мкМ). Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

Таким образом, была отработана методика синтеза оптических изомеров CpdA и исследованы их биологические свойства. Было показано, что оба энантиомера CpdA проявляют сходные GR-зависимые антипролиферативные и проапоптотические эффекты на клетки лейкоза и лимфомы, а также обладают способностью избирательно индуцировать транс-репрессию, как и исходная рацемическая смесь. Гипотеза о том, что энантиомеры CpdA обладают различными биологическими свойствами, подтверждена не была, однако отработанный метод синтеза может служить основой для получения оптически чистых SEGRA на основе молекулы CpdA в будущем.

3.2.2.4. Исследование мутагенной активности энантиомеров CpdA

Мутационный тест на *Salmonella Typhimurium* является классическим тестом бактериальной тест-системы по учету мутаций к прототрофности по гистидину при действии химических соединений или их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены основания или сдвига рамки считывания в геном бактериального организма. В таблицах 8 и 9 представлены данные полученные при испытаниях на штаммах *Salmonella Typhimurium TA98* (таблица 7) чувствительным к мутагенам, индуцирующим типа сдвига рамки считывания и штамма *TA100*

(таблица 8), чувствительным к мутагенам, индуцирующим мутации типа замены пар оснований. Как показывают результаты экспериментов, в контрольном варианте частота индуцируемых мутаций не превышала стандартного уровня, соответствующего генетическим особенностям каждого тестерного штамма. Варианты положительного контроля показали хорошую активность фракции S9: промутагены 2-АФ и БП индуцировали высокий уровень реверсий. Высокая специфичность мутагенного ответа была подтверждена испытаниями штамма TA98 с мутагеном ДДТДП (индуктор мутаций сдвига рамки считывания) и штамма TA100 с азидом натрия (индукция мутаций замены пар оснований). Изучение мутагенной активности энантиомеров CpдА показало, что в пределах чувствительности данного метода слабую мутагенную активность в высоких дозах наблюдали у R-энантиомера CpдА на штамме TA98, что согласовалось с данными, полученными нами ранее по мутагенной активности в высоких дозах рацемической смеси [104].

Таблица 7 - Результаты тестирования мутагенной активности новых синтезированных аналогов CpдА на индикаторном штамме TA98

Соединение	Доза на чашку	TA98					
		-S9		+S9			
		M ± m ^a	M _i /M ₀ ^b	MA ^c	M ± m	M _i /M ₀	MA
Контроль	0	16 ± 2,6	1,0	-	11,3 ± 5,5	1,0	-
Бенз(а)пирен	4,0 мкМ	-	-	-	33,0 ± 2,0	2,1	+
2-АФ	1,1 мкМ	-	-	-	405,3 ± 22,0	25,3	+
ДДТДП	6,7 мкМ	438,0 ± 15,9	27,4	+	438,0 ± 15,8	27,4	+
Дексаметазон	1 мМ	14,3 ± 1,5	0,9	-	18,7 ± 1,5	1,6	+
CpдА	1 мМ	32,0 ± 2,6	2,0	+	44,7 ± 13,5	3,9	+
	0,1 мМ	26,7 ± 5,0	1,7	+	43,7 ± 6,0	1,9	-
	10 мкМ	33,3 ± 5,0	2,1	+	47,0 ± 13,5	1,1	-
CpдА(R)	1 мМ	14,0 ± 3,6	0,9	-	19,0 ± 4,3	2,1	+
	0,1 мМ	14,3 ± 2,5	0,9	-	19,0 ± 3,0	1,7	-
	10 мкМ	13,7 ± 0,6	0,9	-	17,7 ± 4,5	1,6	-
CpдА(S)	1 мМ	11,0 ± 1,7	0,7	-	21,7 ± 3,1	1,9	-
	0,1 мМ	9,0 ± 2,0	0,6	-	16,0 ± 2,6	1,4	-
	10 мкМ	14,0 ± 3,6	0,9	-	15,7 ± 4,5	1,6	-

Таблица 8 - Результаты тестирования мутагенной активности новых синтезированных аналогов CpдA на индикаторном штамме TA100

Соединение	Доза на чашку	TA100					
		-S9			+S9		
		M ± m ^a	M _i /M _o ^b	MA ^c	M ± m	M _i /M _o	MA
Контроль	0	51,0 ± 13,7	1,0	-	61,6 ± 2,5	1,0	-
Бенз(а)пирен	4,0мкМ	-	-	-	250,0 ± 61,6	4,9	+
2-АФ	1,1мкМ	-	-	-	94,5 ± 6,4	6,9	+
Азид Na		505,0 ± 40,8	9,9	+	-	-	-
Дексаметазон	1мМ	27,7 ± 9,9	0,5	-	33,3 ± 5,0	1,0	-
CpдA	1 мМ	63,0 ± 1,7	1,2	+	60,7 ± 4,0	1,0	-
	0,1 мМ	44,3 ± 4,6	0,9	-	53,7 ± 5,1	0,9	-
	10 мкМ	46,0 ± 6,9	0,9	-	54,7 ± 9,0	0,9	-
CpдA(R)	1 мМ	59,3 ± 8,7	1,6	+	58,3 ± 5,8	0,9	-
	0,1 мМ	51,3 ± 11,4	1,0	-	54,7 ± 15,2	0,9	-
	10 мкМ	53,7 ± 8,0	1,1	-	64,7 ± 3,5	1,0	-
CpдA(S)	1 мМ	52,7 ± 5,7	1,0	-	67,3 ± 7,5	1,1	-
	0,1 мМ	51,7 ± 7,5	1,0	-	57,0 ± 7,0	0,9	-
	10 мкМ	53,7 ± 8,0	1,1	-	58,7 ± 5,5	0,9	-

Условные обозначения и сокращения: M_i/M_o - отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле; MA- мутагенная активность препарата (“+” - наличие, “-” отсутствие мутагенной активности)

3.2.3. Исследование противоопухолевой активности химических производных CpдA

Следующей задачей нашего исследования была разработка синтеза новых SEGRA на основе молекулы CpдA. Как было упомянуто выше, CpдA является нестабильным в водных растворах соединением, распадающимся с образованием фенилазиридина [495], относящегося по классификации МАИР к канцерогенам класса 2Б [689]. Аналоги CpдA с более стабильной структурой в литературе не описаны.

Разработка новых селективных агонистов GR на основании химической модификации CpдA путем введения в молекулу заместителей различного рода по нескольким положениям является актуальной задачей современной молекулярной биологии и онкологии. Помимо потенциального использования в химиотерапии, CpдA и его аналоги возможно использовать как инструмент в дальнейших исследованиях сигнального пути GR и взаимодействующих с ним компонентов других сигнальных путей опухолевых и нормальных клеток.

3.2.3.1. Разработка подходов к получению химических производных CpдA

В рамках данного исследования был синтезирован ряд ранее неизвестных химических производных CpдA. Для получения целевых соединений были разработаны два альтернативных подхода к их синтезу.

Первая синтетическая стратегия включает четырех стадийный метод исходя из коммерчески доступных 1-арилэтанолов. На первой стадии проведено региоселективное бромирование, дальнейшее нуклеофильное замещение на пиперидиновый остаток протекает в хлористом метиле в присутствии двукратного избытка пиперидина. Последующее восстановление боргидридом натрия приводит к аминоспирту. Целевое соединение было получено кипячением аминоспирта в токе сухого хлористого водорода в абсолютном диэтиловом эфире (методики подробно описаны в разделе «Материалы и методы»). С использованием данной стратегии были получены соединения CpдA 01-06 (Рисунок 37).

Второй синтетический протокол базируется на подходе, где ключевой стадией является синтез аминоспиртов по реакции азометинового илида с ароматическими альдегидами [670]. Азометиновый ирид получают *in situ* взаимодействием саркозина с параформальдегидом. Дальнейшее кипячение аминоспирта в токе сухого хлористого водорода в абсолютном диэтиловом эфире (методики подробно описаны в разделе «Материалы и методы»). С использованием данной стратегии были получены соединения CpдA 07-08 (Рисунок 37).

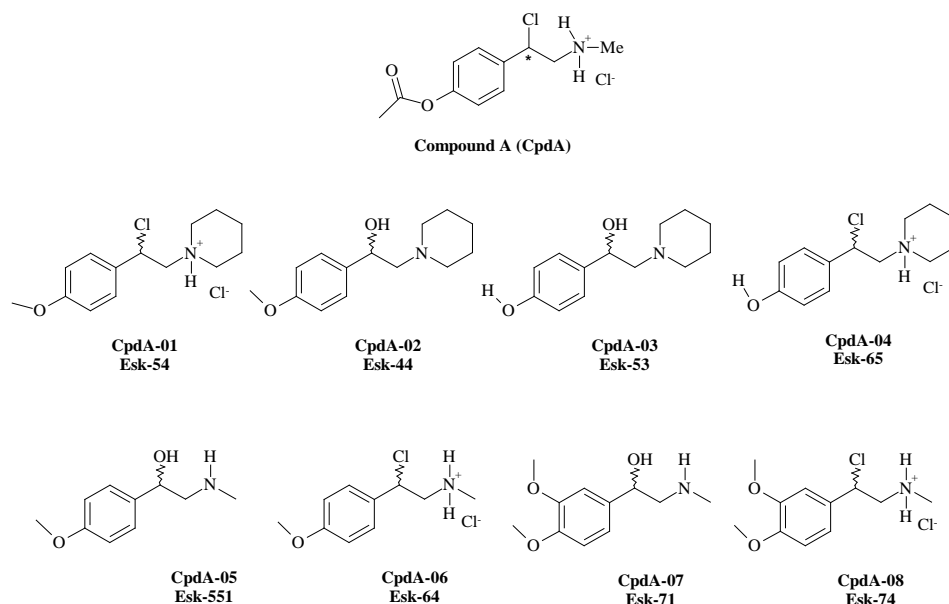


Рисунок 37 - Структуры полученных химических производных CpдA

Таким образом, нами были предложены два альтернативных подхода к синтезу аналогов CpдA, оптимизированы методы получения промежуточных и целевых соединений, и получены ранее неизвестные производные этого весьма важного класса биологически активных соединений. Высокие выходы промежуточных и целевых соединений позволяет синтезировать аминоспирты и аналоги CpдA получать в граммовых количествах.

3.2.3.2. Оценка противоопухолевого эффекта химических производных CpdA *in vitro*

Для изучения биологических эффектов новосинтезированных производных CpdA первоочередным был подбор оптимальных концентраций соединений. Нами были определены антипролиферативные эффекты полученных соединений в диапазоне концентраций от 1 нМ до 1мМ (данные не представлены). Рабочие концентрации аналогов CpdA, при которых наблюдается снижение числа жизнеспособных клеток на 40-50% по сравнению с контролем (IC50) после 24-часовой инкубации клеток с данными соединениями, составили 1 мкМ, что сопоставимо с рабочими, используемыми нами ранее, концентрациями дексаметазона и CpdA.

При обработке клеток исследуемыми соединениями в выбранных концентрациях наиболее сильный антипролиферативный эффект на клетки линии СЕМ и Granta был показан для соединений CpdA-03, 04, и CpdA-05. Так, при инкубации клеток Granta с CpdA-03 в концентрации 1 мкМ доля жизнеспособных клеток составила 56,3% после 24 ч инкубации. При инкубации с этим же соединением клеток СЕМ количество живых клеток составляло 65,3% от контроля. Количество жизнеспособных клеток при обработке клеток СЕМ и Granta соединениями CpdA-04 и CpdA-05 было примерно в том же диапазоне (Рисунок 38). Необходимо также отметить, что данные эксперименты проводились в параллели с определением цитотоксического эффекта на полученных нами ранее клетках СЕМ и Granta с подавленной экспрессией GR (Granta-shGR и СЕМ-shGR). В случаях соединений CpdA-01, -02, -07 и -08 цитотоксический эффект на клетках с нокдауном GR был сходен с эффектами на клетках с GR дикого типа. Однако в случае соединений CpdA-03-06 наблюдалось снижение цитотоксического эффекта при подавлении экспрессии рецептора, что косвенно свидетельствует о том, что полученные соединения являются лигандами GR. В частности, при действии CpdA-03 на клетки СЕМ наблюдали снижение количества жизнеспособных клеток на 34,7%, а при действии данного соединения на клетки СЕМ-shGR количество живых клеток снижалось на 8,1 (Рисунок 38). Аналогично в случае клеток линии Granta и Granta-shGR данные эффекты для CpdA-03 составили 43,7% и 8,5%, соответственно (Рисунок 38).

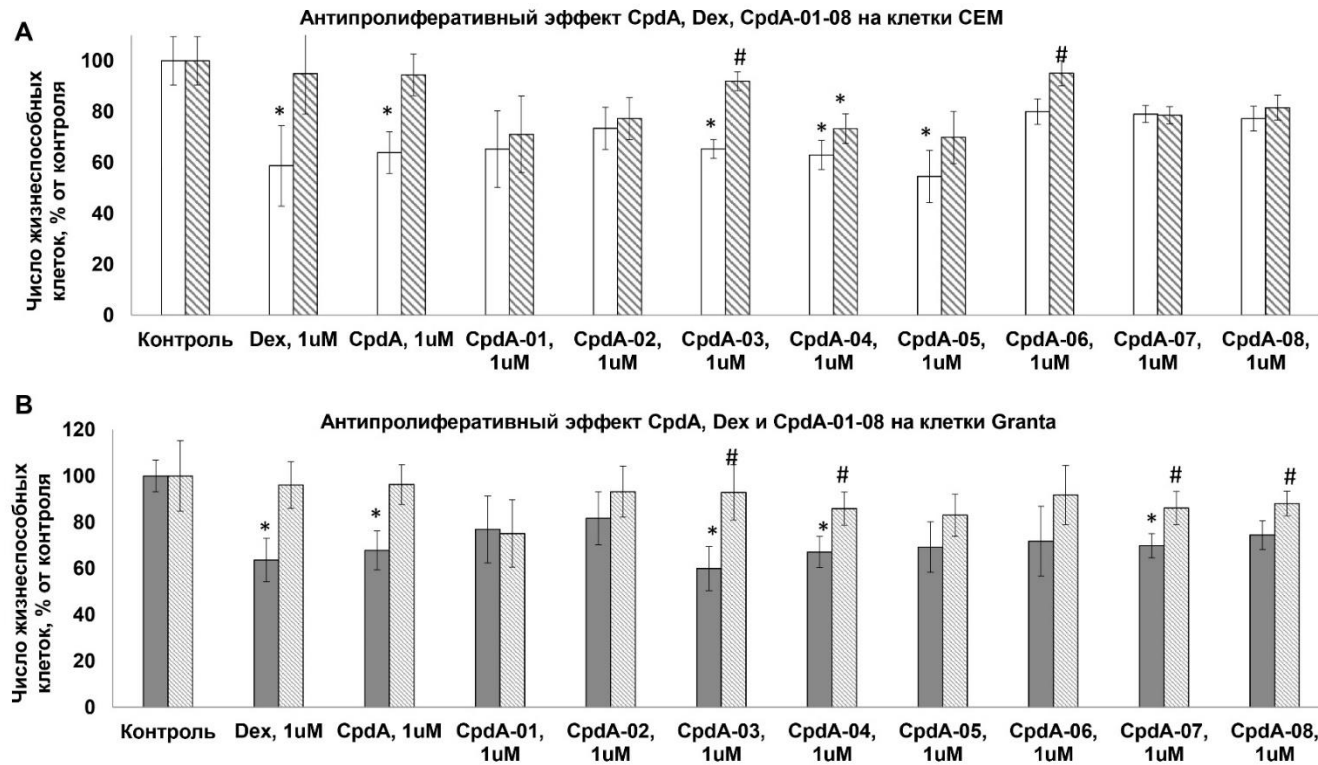


Рисунок 38 - Антипролиферативный эффект химических производных CpdA на клетки CEM, CEM-shGR (A), Granta, Granta-shGR (B). Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1мкМ). Подсчет количества живых клеток проводили с помощью автоматического счетчика клеток. На рисунке представлено количество живых клеток после обработки Dex, CpdA или или CpdA-01-08 в процентах от контроля, обработанного растворителем. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие между числом жизнеспособных клеток, трансдуцированных вектором shGR и контрольным вектором pGIPZ, $p < 0.05$

С помощью проточной цитофлуориметрии нами была изучена способность новосинтезированных соединений индуцировать апоптоз. После обработки клеток CpdA 01-08 в обеих клеточных линиях наблюдался запуск апоптоза, который был сопоставим с уровнем апоптоза в клетках после обработки дексаметазоном и CpdA: наиболее яркий апоптотический эффект проявляли соединения CpdA 03, 04, 05, 08 (Рисунок 39).

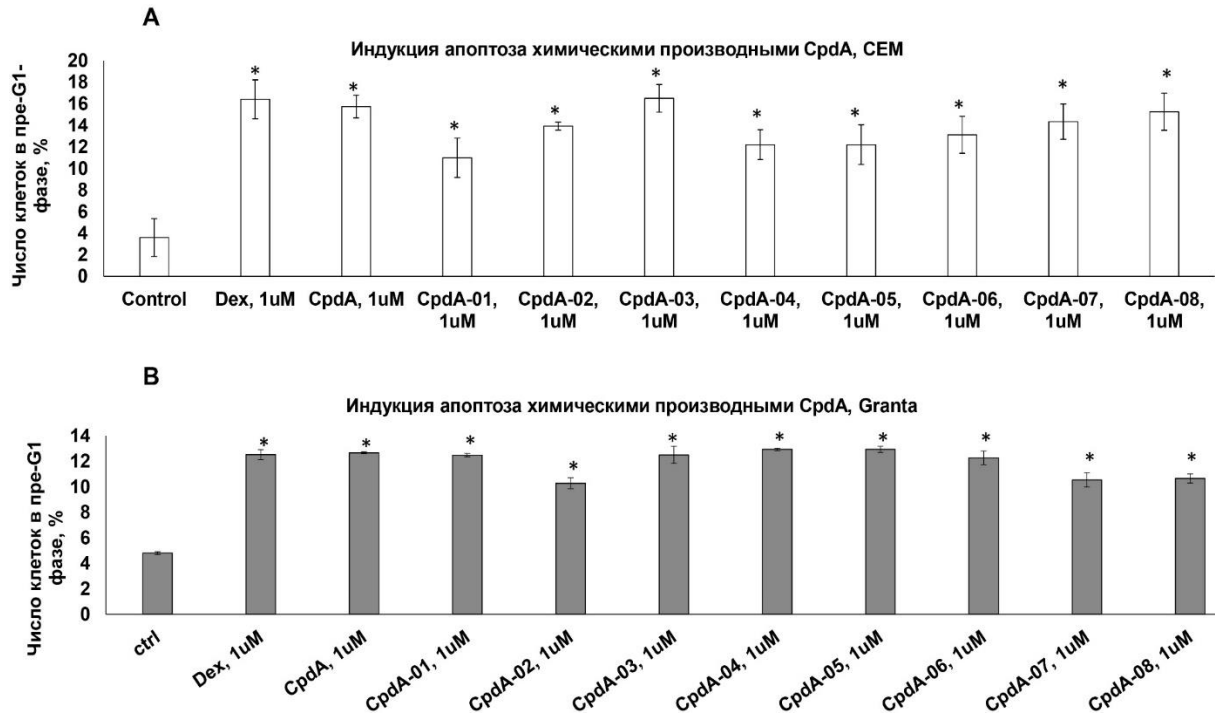


Рисунок 39 - Проапоптотический эффект химических производных CpdA на клетки CEM и Granta. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1 мкМ). Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по количеству клеток в пре-G1-фазе. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

3.2.3.3. Оценка влияния новосинтезированных химических производных CpдA на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора

Первоочередным необходимым условием для описания лигандных свойств полученных соединения являлось прямое доказательство физического взаимодействия химических производных CpдA с рецептором. Для анализа связывания производных CpдA с GR были выбраны наиболее цитотоксичные соединения, цитотоксический эффект которых определялся уровнем рецептора в клетках: CpдA-03-06. Соединение CpдA-01 было использовано как контрольное соединение со слабыми цитотоксическими свойствами и реализацией цитотоксического эффекта на GR-регулируемые сигнальные пути.

Химическое производное CpдA-03, аналог алкалоида синефрина, является более стабильным и инертным соединением, не способным образовывать производное азиридина из-за отсутствия протона при атоме азота. Выбор стратегии синтеза (введение циклического вторичного амина взамен первичного амина) был обусловлен двумя факторами: первый из них, как было отмечено выше, связан с необходимостью исключить возможности образования азиридина, который обладает мутагенным эффектом [480]. Вторая причина обусловлена тем, что CpдA-03, также как и CpдA, при гидролизе должен давать производное синефрина, обладающее собственным цитотоксическим эффектом. Химическое производное CpдA-04 также является аналогом синефрина, но более гидрофильным соединением, в то время как CpдA-05 более гидрофобно.

Менее активными соединениями в тестах на апоптоз и цитотоксичность являлись CpдA-01, CpдA-02, а также CpдA-06-08. Данные соединения характеризовались большим количеством заместителей при гидроксильной группе и аминогруппе, что может затруднять связывание с положительно заряженными аминокислотными остатками в активном центре GR (Asn⁵⁶⁴ и Arg⁶¹¹) [48] и что может объяснить их низкую цитотоксичность.

При исследовании связывания нами был использован метод определения аффинности потенциального лиганда к рецептору по изменению поляризации конкурентного флуоресцентно меченого лиганда. За концентрацию, при которой наблюдалось 50% ингибирование связывания конкурентного флуоресцентно-меченого лиганда Fluormone GS1 (IC₅₀), принимали ту концентрацию, при которой наблюдалось уменьшение поляризации комплекса GR с флуоресцентно-меченым лигандом Fluormone GS1 в 2 раза относительно максимума.

По результатам наших исследований было показано, что IC₅₀ для Dex, который использовали в качестве положительного контроля, составила 22 нМ, что совпадает с данными литературы [690]. IC₅₀ для исходного соединения CpдA составила 2,2 мкМ, что также совпадает с данными литературы [691]. IC₅₀ для CpдA-03 лежала в том же диапазоне и составила 1,8 мкМ, в отличие от CpдA-04, IC₅₀ которого была в 10 раз выше и составила 21,3 мкМ (Таблица 9). Для

CpdA-05, -06 и 01 не было показано существенное изменение поляризации флуоресценции при инкубации с GR и Fluoromone GS1, соответственно, расчетные значения IC50 для данных соединений были довольно высоки (Таблица 9).

Таблица 9 - Концентрации Dex, CpdA, CpdA-01-08, при которых наблюдали подавление связывания флуоресцентно меченого лиганда GR, Fluoromone GS1, на 50%

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

Исследование транс-активационного и транс-репрессорного потенциала исследуемых соединений проводили по отработанной схеме с использованием анализа экспрессии специфических GR- и NF-kB-зависимых генов и репортерного анализа с использованием клеток СЕМ и Granta, стабильно экспрессирующих люциферазу светлячка под контролем GR- и NF-kB-зависимых промоторов. При изучении изменений экспрессии генов *CCND1* и *CCND2*, являющихся маркерами транс-репрессии, при обработке исследуемыми соединениями CpdA-01-08, CpdA и Dex, было показано, что CpdA-03, -05, -07 и -08 оказывают наибольший ингибирующий эффект на экспрессию данных генов. В частности, экспрессия гена *CCND2* в клетках СЕМ снизилась на 46% в случае соединения CpdA-03, на 23% - при обработке CpdA-05, на 24% и на 44% при обработке клеток CpdA-07 и -08, соответственно. В клетках линии Granta, где в качестве маркеров транс-репрессии использовали гены *IL-6β* и *IL-1β*, их экспрессия падала при обработке CpdA-03 38% и 39%, аналогичные показатели для CpdA-04 составили 4,3% и 8,6% (Рисунки 40 и 41).

Эти данные подтверждали с помощью люциферазного репортерного анализа, где было показано, что снижение активности NF-kB происходит в случае CpdA-02 в 1,5 раза, CpdA-03 – в 2,5 раза, CpdA-05 – в 1,7 раза, в случае остальных соединений подавление активности люциферазы было статистически незначимым (Рисунок 42).

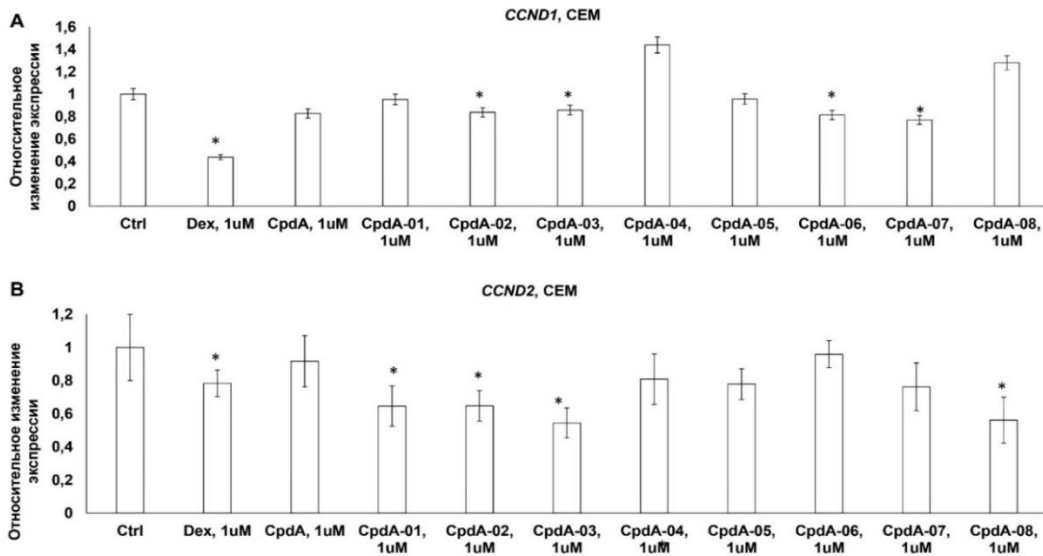


Рисунок 40 - Влияние химических производных CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-репрессии CCND1 (A) и CCND2 (B) в клетках CEM. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1мкМ). Уровень экспрессии генов CCND1 и CCND2 определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена RPL27. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

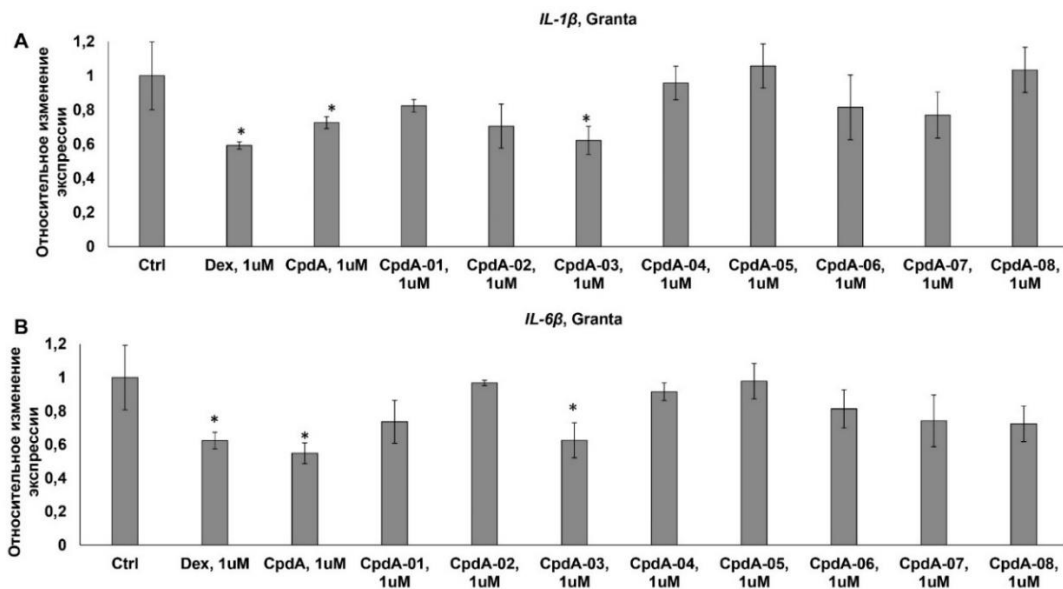


Рисунок 41 - Влияние химических производных CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-репрессии IL-6β (A) и IL-1β (B) в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1мкМ). Уровень экспрессии генов IL-6β и IL-1β определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена RPL27. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

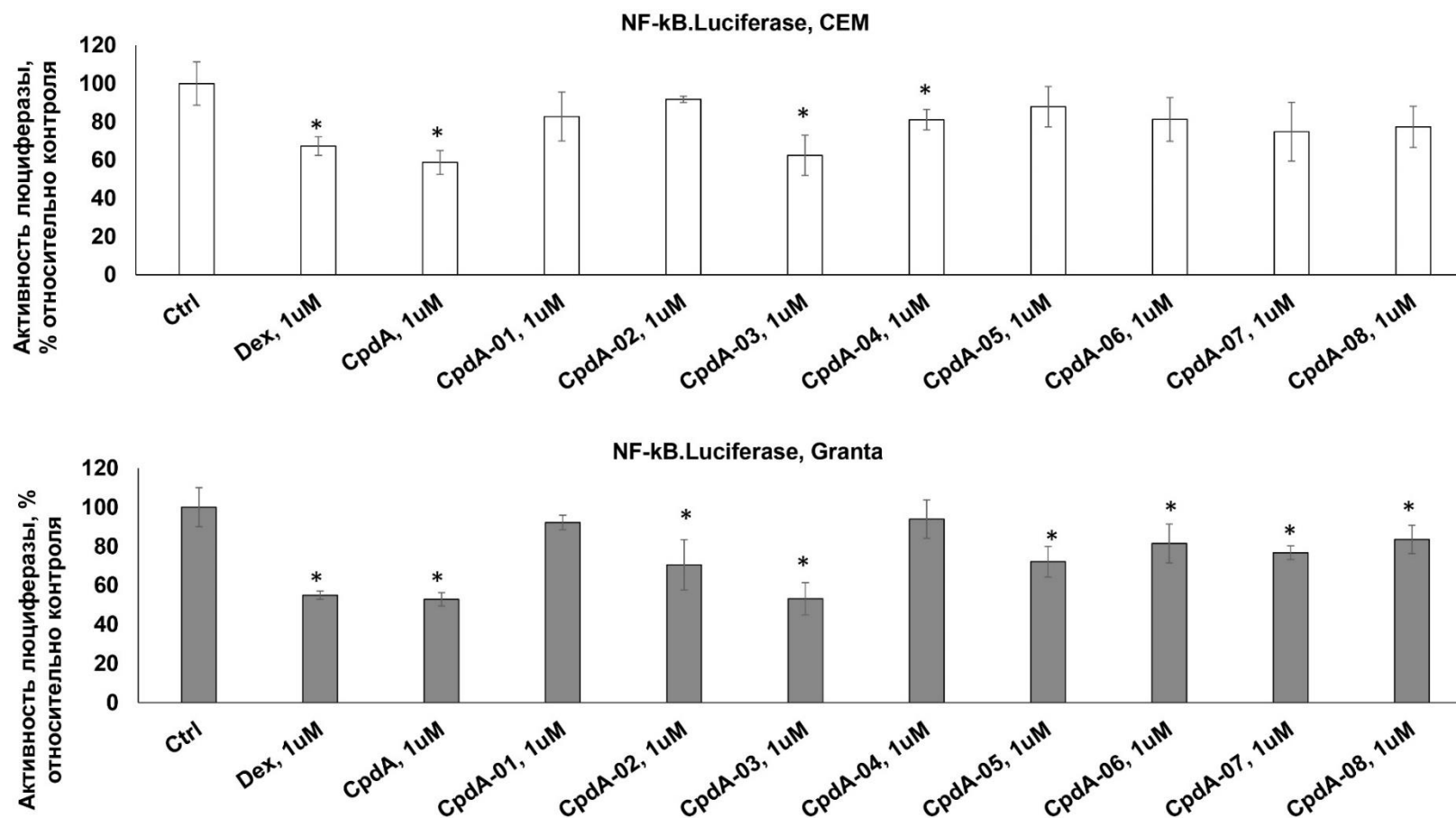


Рисунок 42 - Влияние химических производных CpdA на активность NF-kB. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-NF-kB клетки CEM (A) и Granta (B) культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1μM). Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

С помощью количественной ПЦР GR-зависимых генов *FKBP51* и *GILZ*, являющихся маркерами транс-активации, было продемонстрировано, что новые синтезированные аналоги СрдА преимущественно не вызывают увеличения экспрессии данных генов. Наиболее оптимальные результаты показали соединения СрдА-03 и СрдА-05, которые стабильно не увеличивали экспрессию данных генов в обеих клеточных линиях. Более того, в клетках линии Granta после обработки их СрдА-03 в концентрации 1 мкМ экспрессия гена *FKBP51* падала в 1,5 раза, экспрессия гена *GILZ* - в 1,3 раза относительно контроля. В качестве положительного контроля был использован Dex, который увеличивал экспрессию этих генов в 2-3 раза в клетках Granta и в 4-10 раз в клетках СЕМ (Рисунки 43-44).

По данным люциферазного репортерного анализа с использованием клеток СЕМ-GRE.Luc и Granta-GRE.Luc было показано увеличение активности люциферазы после обработки клеток Dex в 24,8 раза в случае клеток Granta и в 3,5 раза в случае клеток СЕМ (Рисунок 45). Незначительное увеличение активности люциферазы также было показано для соединения СрдА-02 в клетках Granta и СрдА-04 в клетках СЕМ, что может быть связано с его действием на активацию GR по альтернативным механизмам. Остальные химические производные СрдА либо не оказывали влияние на активность люциферазы, либо вызывали незначительное снижение на 10-20%.

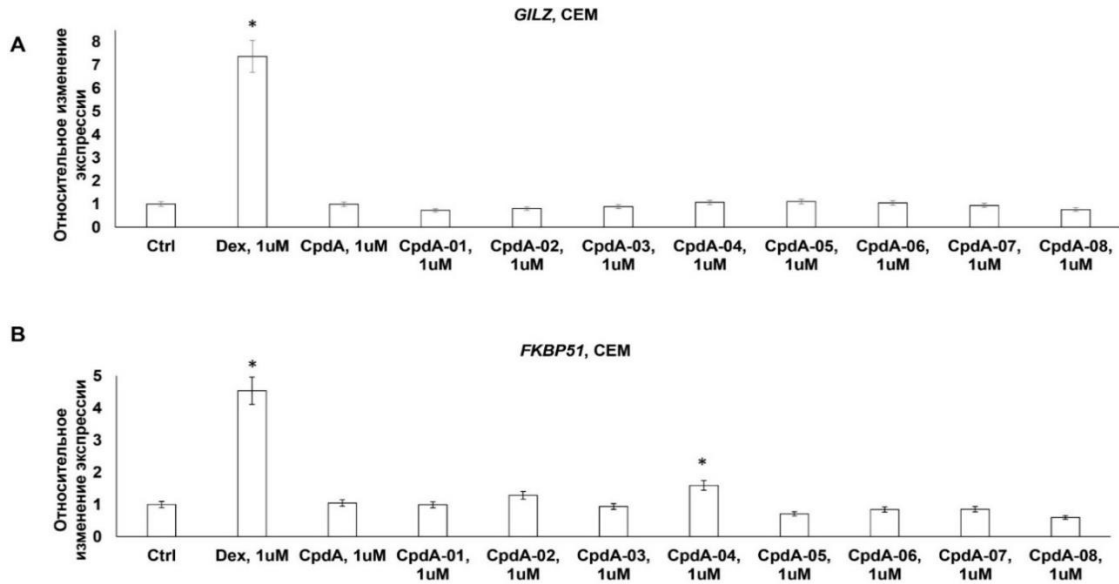


Рисунок 43 - Влияние химических производных CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-активации GILZ (A) и FKBP51 (B) в клетках CEM. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08. Уровень экспрессии генов FKBP51 и GILZ определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена RPL27. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

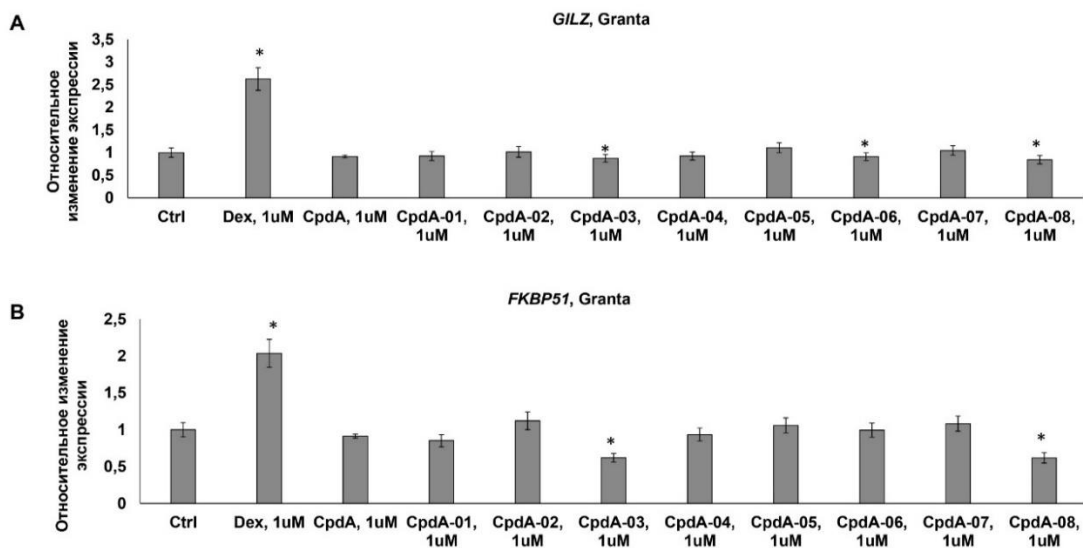


Рисунок 44 - Влияние химических производных CpdA на экспрессию генов-маркеров транс-активации GILZ (A) и FKBP51 (B) в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08. Уровень экспрессии генов FKBP51 и GILZ определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена RPL27. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

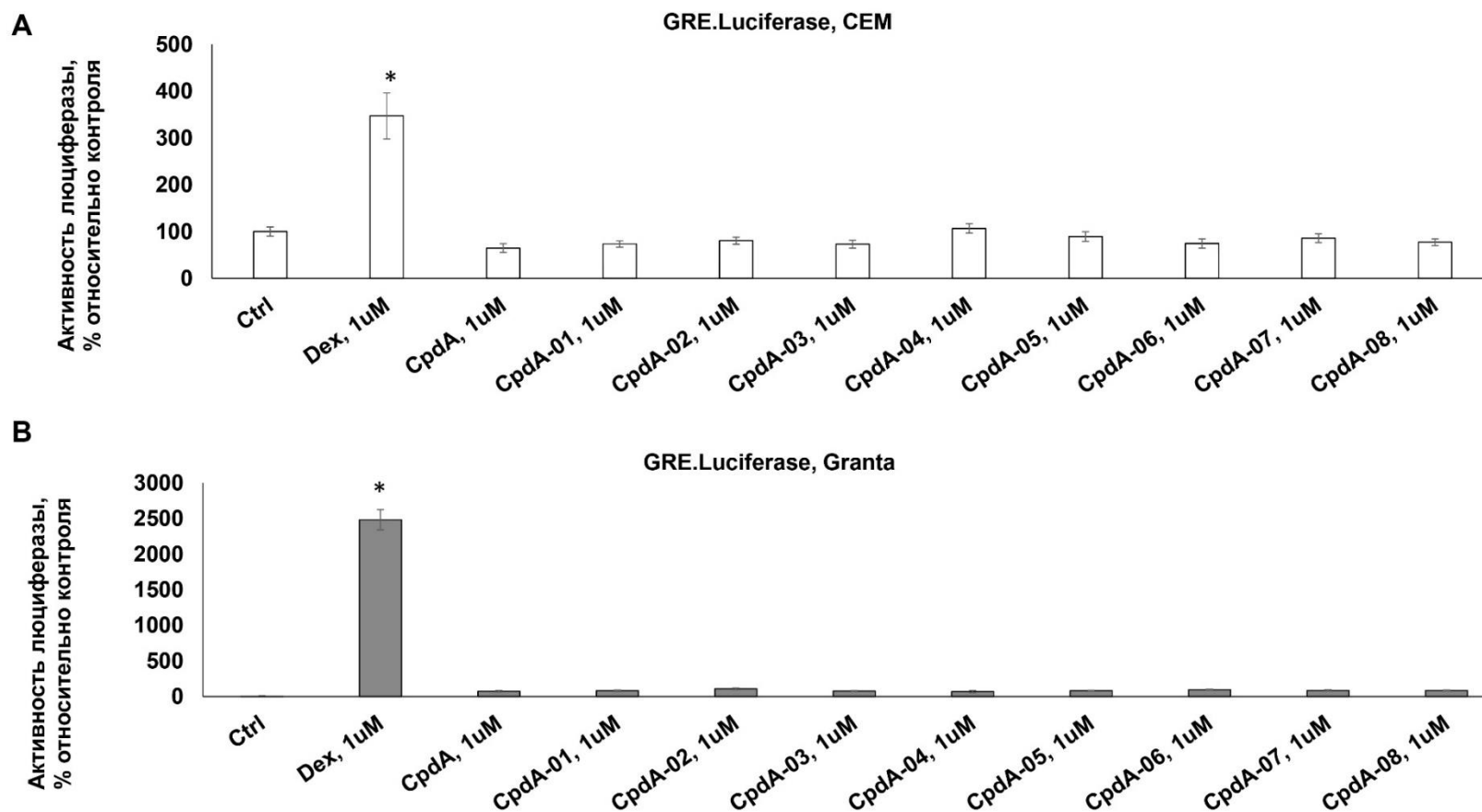


Рисунок 45 - Влияние химических производных CpdA на активность GR. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки CEM (**A**) и Granta (**B**) культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1мкМ). Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

3.2.3.4. Исследование мутагенной активности химических производных CpдA

Для исследования мутагенной активности химических производных CpдA был использован мутационный тест на *Salmonella Typhimurium*. По результатам эксперимента, представленных в таблицах 10-11, можно увидеть, что в контроле частота индуцируемых мутаций не превышала стандартного уровня. Варианты положительного контроля показали хорошую активность фракции S9: промутагены 2-АФ и БП индуцировали высокий уровень реверсий. Высокая специфичность мутагенного ответа была подтверждена испытаниями штамма TA98 с мутагеном ДДТДП и штамма TA100 с азидом натрия. Изучение мутагенной активности производных CpдA показало, что в пределах чувствительности данного метода исследуемые соединения не обладают мутагенной активностью.

Таблица 10 - Результаты тестирования мутагенной активности новых синтезированных аналогов CpдA на индикаторном штамме TA98

Соединение	Доза на чашку	TA98					
		-S9		+S9			
		M ± m ^a	M _i /M ₀ ^b	MA ^c	M ± m	M _i /M ₀	MA
Контроль	0	16 ± 2,6	1,0	-	11,3 ± 5,5	1,0	-
Бенз(а)пирен	4,0 мкМ	-	-	-	33,0 ± 2,0	2,1	+
2-АФ	1,1 мкМ	-	-	-	405,3 ± 22,0	25,3	+
ДДТДП	6,7 мкМ	438,0 ± 15,9	27,4	+	438,0 ± 15,8	27,4	+
Дексаметазон	1 мМ	14,3 ± 1,5	0,9	-	18,7 ± 1,5	1,6	+
CpдA	1 мМ	32,0 ± 2,6	2,0	+	44,7 ± 13,5	3,9	+
	0,1 мМ	26,7 ± 5,0	1,7	+	43,7 ± 6,0	1,9	-
	10 мкМ	33,3 ± 5,0	2,1	+	47,0 ± 13,5	1,1	-
CpдA- 01	1 мМ	15,7 ± 4,2	1,0	-	35,3 ± 3,8	1,1	-
	0,1 мМ	23,0 ± 1,0	1,4	+	31,0 ± 3,6	1,7	-
	10 мкМ	18,0 ± 2,0	1,1	-	35,0 ± 5,2	1,1	-
CpдA- 02	1 мМ	16,0 ± 5,6	1,0	-	28,3 ± 6,4	1,5	-
	0,1 мМ	21,7 ± 3,5	1,4	+	24,7 ± 0,6	1,2	-
	10 мкМ	17,7 ± 3,5	1,1	-	32,0 ± 3,6	1,8	-
CpдA- 03	1 мМ	19,3 ± 1,2	1,2	+	35,0 ± 9,1	1,1	-
	0,1 мМ	17,0 ± 4,4	1,1	-	43,0 ± 5,7	1,3	-
	10 мкМ	14,3 ± 3,5	0,9	-	35,0 ± 4,6	1,1	-
CpдA- 04	1 мМ	19,0 ± 5,3	1,2	+	33,0 ± 2,6	1,4	-
	0,1 мМ	19,3 ± 0,6	1,2	+	26,7 ± 2,3	1,4	-
	10 мкМ	18,3 ± 1,5	1,1	-	24,7 ± 11,0	1,2	-
CpдA- 05	1 мМ	12,7 ± 1,5	0,8	-	16,3 ± 3,2	1,4	-
	0,1 мМ	15,0 ± 2,0	0,9	-	14,7 ± 2,9	1,3	-
	10 мкМ	11,0 ± 3,6	0,8	-	14,7 ± 2,3	1,3	-
CpдA- 06	1 мМ	10,0 ± 2,6	0,6	-	15,3 ± 4,2	1,4	-
	0,1 мМ	10,0 ± 2,0	0,6	-	15,0 ± 3,5	1,3	-
	10 мкМ	10,3 ± 1,2	0,6	-	12,3 ± 5,0	1,1	-
CpдA- 07	1 мМ	11,3 ± 1,5	0,7	-	13,1 ± 1,0	1,4	-
	0,1 мМ	13,0 ± 1,7	0,8	-	14,7 ± 3,1	1,3	-
	10 мкМ	13,0 ± 6,2	0,8	-	11,0 ± 2,0	1,0	-
CpдA- 08	1 мМ	12,3 ± 2,5	0,8	-	18,7 ± 3,8	1,6	-
	0,1 мМ	9,3 ± 2,1	0,6	-	18,3 ± 3,8	1,6	-
	10 мкМ	14,4 ± 4,0	0,9	-	23,3 ± 4,2	1,1	-

Таблица 11 - Результаты тестирования мутагенной активности новых синтезированных аналогов CpдА на индикаторном штамме ТА100

Соединение	Доза на чашку	ТА100					
		-S9			+S9		
		$M \pm m^a$	M_i/M_o^b	МА ^c	$M \pm m$	M_i/M_o	МА
Контроль	0	51,0 ± 13,7	1,0	-	61,6 ± 2,5	1,0	-
Бенз(а)пирен	4,0 мкМ	-	-	-	250,0 ± 61,6	4,9	+
2-АФ	1,1 мкМ	-	-	-	94,5 ± 6,4	6,9	+
Азид Na		505,0 ± 40,8	9,9	+	-	-	-
Дексаметазон	1 мМ	27,7 ± 9,9	0,5	-	33,3 ± 5,0	1,0	-
CpдА	1 мМ	63,0 ± 1,7	1,2	+	60,7 ± 4,0	1,0	-
	0,1 мМ	44,3 ± 4,6	0,9	-	53,7 ± 5,1	0,9	-
	10 мкМ	46,0 ± 6,9	0,9	-	54,7 ± 9,0	0,9	-
CpдА- 01	1 мМ	36,3 ± 12,7	0,7	-	40,3 ± 6,4	0,7	-
	0,1 мМ	31,7 ± 2,1	0,6	-	34,3 ± 3,1	0,6	-
	10 мкМ	35,3 ± 8,5	0,7	-	30,3 ± 6,4	0,5	-
CpдА- 02	1 мМ	36,3 ± 14,4	0,7	-	56,3 ± 16,7	0,9	-
	0,1 мМ	41,0 ± 1,0	0,8	-	42,7 ± 9,1	0,7	-
	10 мкМ	42,3 ± 3,8	0,8	-	39,0 ± 10,5	0,6	-
CpдА- 03	1 мМ	41,0 ± 4,5	0,8	-	52,0 ± 3,6	0,8	-
	0,1 мМ	42,3 ± 3,8	0,8	-	52,7 ± 7,1	0,9	-
	10 мкМ	41,0 ± 4,5	0,8	-	56,0 ± 5,6	0,9	-
CpдА- 04	1 мМ	38,7 ± 9,5	0,8	-	42,0 ± 2,0	0,7	-
	0,1 мМ	42,3 ± 3,8	0,8	-	80,5 ± 23,3	1,3	-
	10 мкМ	44,7 ± 9,0	0,9	-	76,7 ± 21,4	1,2	-
CpдА- 05	1 мМ	42,0 ± 2,6	0,8	-	45,0 ± 7,9	0,7	-
	0,1 мМ	50,0 ± 4,4	1,0	-	51,0 ± 1,0	0,8	-
	10 мкМ	42,3 ± 4,9	0,8	-	46,0 ± 4,6	0,7	-
CpдА- 06	1 мМ	50,3 ± 4,7	1,0	-	59,7 ± 17,6	1,0	-
	0,1 мМ	47,6 ± 7,6	0,9	-	60,7 ± 9,3	1,0	-
	10 мкМ	40,0 ± 8,2	0,8	-	55,0 ± 12,2	0,9	-
CpдА- 07	1 мМ	43,7 ± 7,7	0,9	-	69,3 ± 3,1	1,1	-
	0,1 мМ	47,3 ± 8,4	0,9	-	56,7 ± 17,1	0,9	-
	10 мкМ	58,0 ± 14,0	1,1	-	52,0 ± 4,6	0,8	-
CpдА- 08	1 мМ	52,3 ± 5,5	1,0	-	60,7 ± 9,3	1,0	-
	0,1 мМ	44,3 ± 1,2	0,9	-	65,3 ± 9,1	1,1	-
	10 мкМ	48,3 ± 8,9	0,9	-	54,0 ± 15,4	0,9	-

Условные обозначения и сокращения: M_i/M_o - отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле; МА- мутагенная активность препарата (“+” - наличие, “-” отсутствие мутагенной активности).

Таким образом, в разделах 3.2.2 и 3.2.3 были описаны биологические свойства новосинтезированных энантиомеров и химических производных CpдA. Для удобства анализа полученные эффекты были сведены в таблице 12.

Из приведенной таблицы можно отметить, что наиболее выраженными свойствами SEGRA обладает соединение CpдA-03. В дальнейших исследованиях данного химического производного CpдA была определена его противоопухолевая активность *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы у мышей.

Таблица 12 - Биологические эффекты энантиомеров и химических производных CpdA

	CpdA-01	CpdA-02	CpdA-03	CpdA-04	CpdA-05	CpdA-06	CpdA-07	CpdA-08	S-CpdA	R-CpdA
Биологические эффекты энантиомеров и химических производных CpdA на клетках SEM										
Антипролиферативный эффект	+	-	+	+	++	-	-	-	+	+
Антипролиферативный эффект, shGR	-	-	++	+	+	-	-	-	+	+
Апоптотический эффект	+	++	++	++	+	+	+	++	++	++
Подавление запуска транс-активации	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
Индукция транс-репрессии	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+
Биологические эффекты энантиомеров и химических производных CpdA на клетках Granta										
Антипролиферативный эффект	-	-	++	+	+	+	+	+	+	+
Антипролиферативный эффект, shGR	-	-	++	+	+	+	+	+	+	+
Апоптотический эффект	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Подавление запуска транс-активации	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Индукция транс-репрессии	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
Эффекты в бесклеточной системе										
Связывание с GR	-	-	++	+	-	-	-	-	Н/О	Н/О
Эффект статистически значимо превосходит эффект CpdA			Статистически значимых различий не выявлено		Эффект статистически значимо снижен, чем эффект CpdA		Н/О	не определяли		

3.2.3.5. Оценка противоопухолевого эффекта наиболее активного химического производного СpdА, СpdА-03, *in vivo*

Для исследования противоопухолевого эффекта СpdА-03 *in vivo* была использована модель перевиваемой лимфомы Р388 у мышей. Данный тип опухоли впервые был индуцирован в 1955 г у овариэктомированных мышей линии DBA₂ путем смазывания кожи метилхолантреном и сохранен в депозитории Национального Института Рака США. Лимфома Р388 состоит из клеток двух типов. Одни клетки - крупные - имеют ядро, которое занимает значительную часть клетки, и хроматин, равномерно распределенный в виде мелкозернистой сети. Цитоплазма этих клеток отличается повышенной базофилией, и в ней иногда определяются множественные пиноцитозные пузырьки. Другой тип клеток представлен небольшими клетками типа малого лимфоцита с гиперхромными оптически плотными ядрами, окруженными очень узким ободком цитоплазмы. Митозы встречаются в обоих типах клеток. Данный тип опухоли можно перевивать как подкожно, так и внутрибрюшинно. В наших экспериментах мы использовали подкожную трансплантацию опухолевых клеток, при которой критерием оценки противоопухолевой активности может также служить объем подкожного опухолевого узла. Инъекции СpdА-03, СpdА и Dex были начаты на 11 сутки после перевивки опухолевых клеток, после формирования первых узелков. Сравнительный анализ данных по объему показал, что на 21 сутки после начала эксперимента (10 суток инъекций) отмечали статистически значимое торможение роста опухолевого узла на 57% у животных, получавших Dex, на 66% – у животных, получавших СpdА и в 78% – у животных, получавших СpdА-03 (Рисунок 46).

Торможение роста опухолевого узла на 21 сутки эксперимента

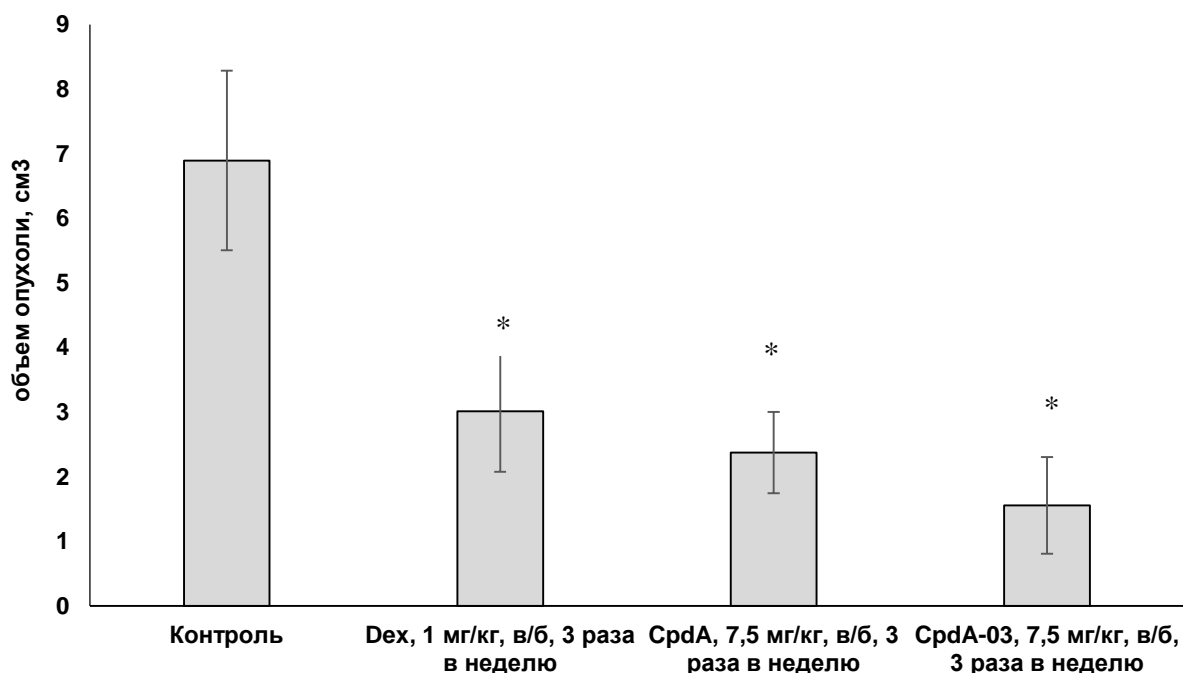


Рисунок 46 - Эффект дексаметазона, CpD A и CpD A-03 на объем аллогraftов лимфомы P388. Перевивку лимфомы мыши P388 производили путем введения асцитной жидкости подкожно мышам DBA/2 в количестве 1 млн клеток на мыш. После формирования опухолевых узелков начинали внутрибрюшинное введение растворов Dex, 1 мг/кг, CpD A, 7,5 мг/кг, CpD A-03, 7,5 мг/кг, на 1, 3, 5 дни недели. Критерием противоопухолевой активности исследуемых соединений являлась динамика торможения роста опухолевого узла. На рис. представлен средний объем аллогraftов на 21 день эксперимента. Данные представлены как $M \pm m$, * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$

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

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

При проведении исследований в области молекулярных механизмов действия GC, SEGRA и других лигандов глюкокортикоидного рецептора нами и другими исследователями был проведен анализ профилей экспрессии генов после воздействия данных лигандов на клетках лейкоза, лимфомы, рака предстательной железы, множественной миеломы и др. [1, 692]. Среди генов, чья экспрессия повышалась после воздействия GC, и которые по литературным данным были вовлечены в развитие побочных эффектов GC, были отмечены гены, кодирующие шаперон GR, FKBP51, и фосфатазу DUSP-1, повышенная экспрессия которой связана с развитием резистентности, TAT, PERCK и IGFBP1, повышенную экспрессию которых связывают с

развитием и прогрессией метаболических осложнений, а также REDD1, GILZ и Dickkopf-1, ассоциированные с атрофическими явлениями после применения GC: атрофии кожного покрова, мускулатуры, а также остеопороза. В частности, повышенную экспрессию гена *REDD1* отмечали при проведенном нами анализе профилей экспрессии генов в трансформированных лимфоцитах и клетках рака предстательной железы (№ профилей экспрессии генов в базе данных Gene Expression Omnibus (GEO) GSE71102 и GSE71099). Сходство профилей экспрессии генов было обнаружено в случае мышечной дистрофии при воздействии GC на мышечную ткань и при воздействии GC в комбинации с ингибитором протеасом бортезомибом на клетки множественной миеломы (Таблица 13). В во всех указанных случаях *REDD1* входил в 15% наиболее сильно индуцируемых генов при действии GC. Помимо этого, GEO содержит информацию о более 10 тыс. профилей экспрессии генов, в которых отмечают повышение экспрессии *REDD1* при обработке GC. *REDD1* является GR-зависимым геном, консервативным, индуцируемым стрессом ингибитором mTOR [553, 554, 693].

Таблица 13 - Профили экспрессии генов, загруженные в базу данных Gene Expression Omnibus (GEO), в которых *REDD1* входит в 15% наиболее сильно индуцируемых генов

№ профиля экспрессии генов в базе данных Gene Expression Omnibus (GEO)	Исследование
GDS3027	Изменения в скелетной мускулатуре крыс в ответ на применение GC
GDS2688	Мышечная дистрофия Дюшенна
GSE71102	Воздействие GC и CpдA на клетки рака предстательной железы LNCaP-GR
GSE71099	Воздействие GC и CpдA на клетки лимфомы Granta
GSE59151	Эффект подавления экспрессии <i>REDD1</i> у мышей способствует «диссоциации» терапевтических и побочных эффектов GC
GSE11866	Подавление сигнального пути mTOR при обработке клеток множественной миеломы бортезомибом посредством повышения экспрессии <i>REDD1</i>

Нами было показано, что мыши, нокаутные по *REDD1*, устойчивы к воздействию GC: в отличие от животных дикого типа, у мышей с нокаутом *REDD1* не наблюдали снижения толщины эпидермиса и количества кератиноцитов в его базальном слое. В нашем исследовании на коже здоровых добровольцев, наносивших на кожу клобетазола пропионат хронически в течение 14 дней ежедневно (Рисунок 47, добровольцы V1-V3) и однократно (Рисунок 47, добровольцы V4 и V5) наблюдали значительное повышение экспрессии *REDD1*. При хроническом нанесении GC это также сопровождалось снижением толщины кожного покрова (рис. 52).

Таким образом, нами и другими исследователями было показано, что экспрессия *REDD1* увеличивается в клетках лимфомы и лейкоза под действием GC. Оценка влияния ингибирования *REDD1* на фармакологический и молекулярный профиль действия GC представляется актуальной.

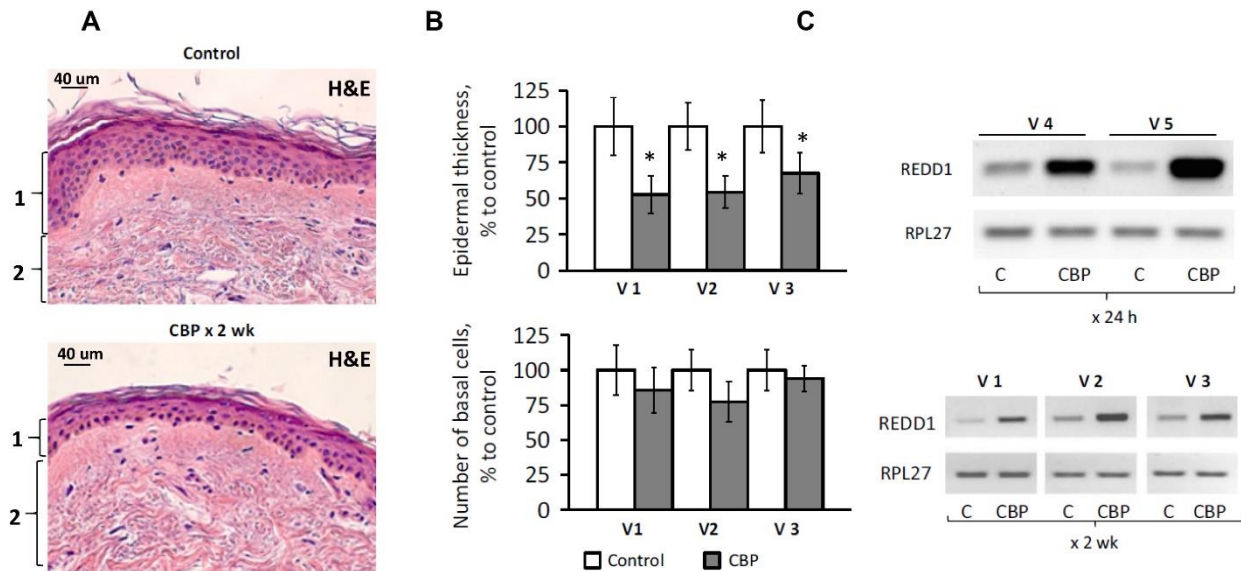


Рисунок 47 - Эффект местных накожных GC на толщину эпидермального слоя кожи и на экспрессию *REDD1*. А-С. Кожу здоровых добровольцев обрабатывали ежедневно в течение 14 суток (добровольцы V1-V3) или однократно (добровольцы V4 и V5) клобетазола пропионатом (мазь 0,05%). А. Характеристические гистологические срезы кожного покрова человека, контрольные и экспериментальные образцы. В. Морфометрический анализ толщины эпидермального слоя кожи и число кератиноцитов в базальном слое эпидермиса. Было проанализировано как минимум 30 независимых микрофотографий на каждую группу. С. Полуколичественный ПЦР-анализ экспрессии гена *REDD1*. В качестве контроля загрузки использовали количество ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. Условные обозначения: 1 – эпидермис, 2 – дерма

3.3.2. Биоинформатический скрининг баз данных для поиска потенциальных ингибиторов *REDD1* и предварительный скрининг биологических свойств *in vitro*

Поскольку фармакологические ингибиторы *REDD1* в литературе не описаны, в сотрудничестве с лабораторией Дж. Т. Дадли (госпиталь Маунт Синай, Нью Йорк, США) нами был проведен отбор препаратов с помощью баз данных «карта взаимодействий» (Connectivity Map, CMap) (<https://www.broadinstitute.org/cmap/>). Каждый препарат получал свой порядковый номер в системе в зависимости от степени изменения экспрессии гена *REDD1/DDIT4*. Учитывалось также количество тестов, в которых экспрессия *REDD1* была определена для конкретного препарата. Для препаратов, которые были протестированы несколько раз, было рассчитано среднее значение изменения экспрессии *REDD1*. Скрининг был проведен с использованием языка программирования R, версия 3.2.5 (<https://www.r-project.org/>)

Было отобрано 9 соединений с предсказанной способностью ингибировать *REDD1 in silico*: антипротозойное средство эметин (Eme), ингибитор протеинкиназы C CGP-60474, ингибиторы mTOR рапамицин (Rapa) и OSI-027, противопротозойный и противомикробный препарат метронидазол (Met), антигельминтное средство левамизол (Leva), ингибитор холинэстеразы физостигмин (Phys), противоопухолевые препараты доксорубицин (Dox) и митоксантрон (Mito) и др. (Таблица 14).

Для отобранных препаратов нами было предварительно оценено их влияние на экспрессию гена *REDD1* с помощью количественного ПЦР-анализа. Данные, представленные на рисунке 48А, свидетельствуют о том, что *REDD1* действительно является GC-индуцируемым геном: его экспрессия возрастала в клетках СЕМ после обработки Dex в 10,8 раз и в клетках Granta в 6 раз. Было показано, что не все препараты из предсказанных были способны ингибировать базальную и Dex-индуцированную экспрессию *REDD1*. В частности, препарат метронидазол, напротив, вызывал повышение синтеза мРНК *REDD1* в 8,6 раз в обработанных Dex и в 1,7 раз в необработанных клетках СЕМ. Для клеток Granta эти показатели составили 3,6 и 1,3 раза соответственно. Значительное снижение наблюдали для ингибиторов mTOR рапамицина, OSI-027, физостигмина и эметина: в частности, в случае эметина экспрессия *REDD1* в необработанных Dex клетках СЕМ снижалась в 2,2 раза относительно контроля, а GC-индуцированная экспрессия *REDD1* снижалась в 1,2 раза относительно контроля и в 12 раз относительно Dex-индуцированного уровня экспрессии данного гена. Рапамицин проявил наиболее высокую способность ингибировать экспрессию *REDD1*: уровень мРНК *REDD1* снижался в необработанных клетках СЕМ в 3,8 раза относительно контроля, а GC-индуцированная экспрессия *REDD1* падала в 1,3 раза относительно контроля, обработанного растворителем, и в 14 раз относительно Dex-индуцированного уровня экспрессии данного гена. Для клеток Granta были получены аналогичные результаты (Рисунок 48В). Для прочих

препаратов было продемонстрировано незначительное подавление экспрессии *REDD1*. 4 наиболее активных препарата – Rapa, Eme, Phys и OSI-027, были отобраны нами для дальнейших исследований.

Таблица 14 - Данные биоинформатического анализа по 9 перспективным ингибиторам REDD1

Препарат	Число экспериментов	Число клеточных линий	Клеточные линии	Класс препарата
Митоксантрон (Mito)	3	2	MCF7 PC3	Противоопухолевый препарат
Доксорубицин (Dox)	3	2	MCF7 PC3	Противоопухолевый препарат
Физостигмин (Phys)	2	1	PC3	Ингибитор холинэстеразы
Метронидазол (Met)	4	2	MCF7 PC3	Противопротозойный и противомикробный препарат
Левамизол (Leva)	3	1	MCF7	Антигельминтный препарат
Эметин (Eme)	4	3	HL60 MCF7 PC3	Антипротозойный препарат
GCP60474	4	3	HL60 MCF7 PC3	Ингибитор протеинкиназы C
OSI-027	5	3	HL60 MCF7 PC3	Ингибитор mTOR
Рапамицин (Rapa)	44	4	HL60 MCF7 PC3 ssMCF7	Иммуносупрессор, ингибитор mTOR

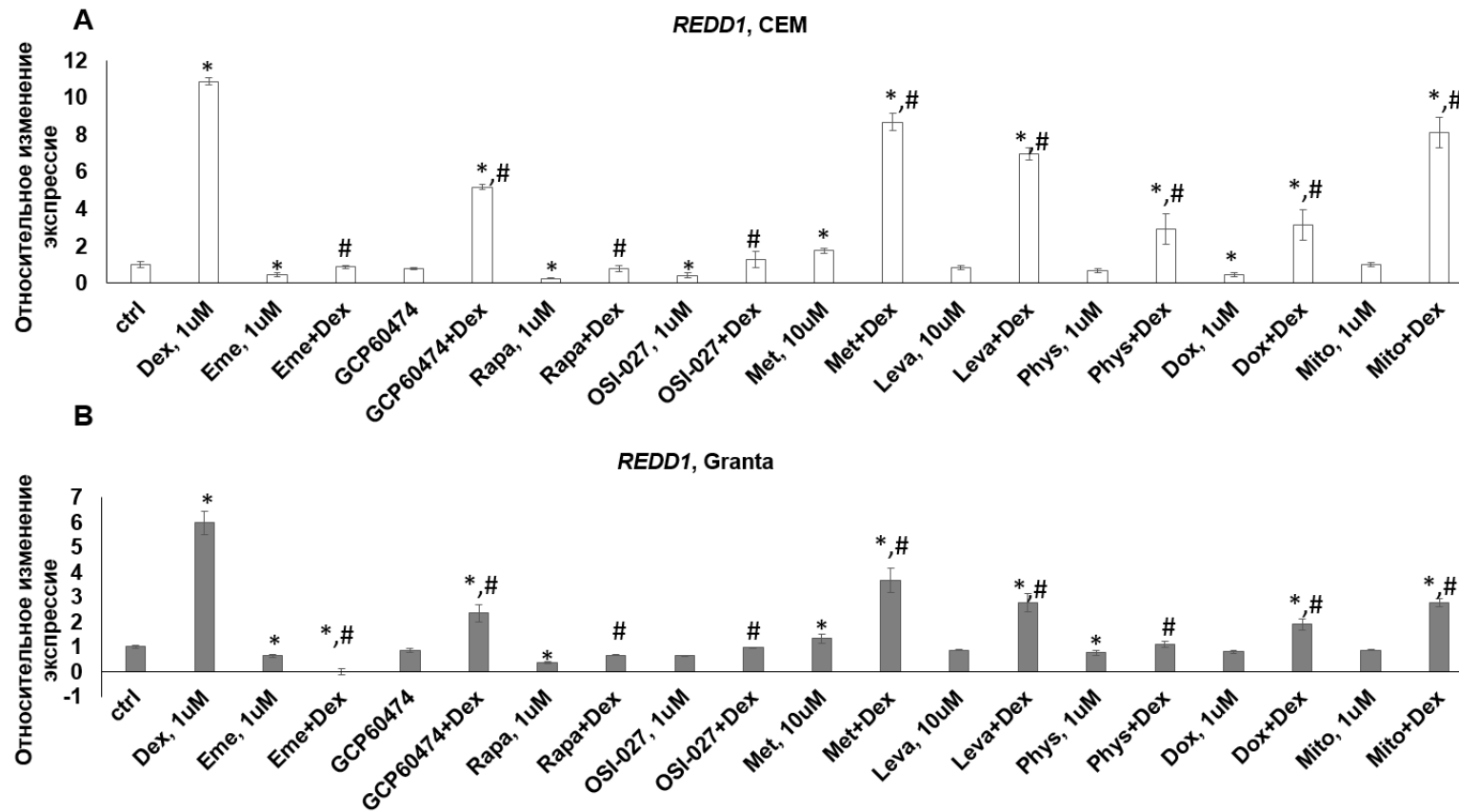


Рисунок 48 - Эффект потенциальных ингибиторов REDD1 на базальную и GC-индуцированную экспрессию REDD1 в клетках CEM (A) и Granta (B). Клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии растворителя или Dex, затем добавляли потенциальные ингибиторы REDD1 (все в концентрации 1мкМ) и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии *REDD1* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$

В дальнейших исследованиях было запланировано определение цитотоксического эффекта 4 отобранных препаратов на клетки лимфомы Granta и клетки лейкоза СЕМ индивидуально и в сочетании с GC, с отбором тех соединений, которые проявляют синергический антипролиферативный эффект при комбинировании их с Dex. Данный анализ был выполнен с помощью МТТ-теста на цитотоксичность, построения изоболограмм для каждой комбинации препаратов и расчета CI, как было описано выше в Главе 1 (Рисунки 49-50, Таблица 15), поскольку синергический эффект соединений при использовании их в комбинации с Dex в тех концентрациях, при которых наблюдается ингибирование экспрессии REDD1, важен для дальнейших исследований их противоопухолевого эффекта. В ходе работы было показано, что синергизмом действия на обеих клеточных линиях обладает рапамицин: расчетное значение CI для комбинации с Dex составило 0,763 на клетках СЕМ и 0,837 на клетках Granta (Рисунки 49-50, Таблица 15). Тенденцией к синергическому цитотоксическому эффекту также обладала комбинация Dex с OSI-027.

Таблица 15 - Комбинационный индекс (combination index, CI), характеризующий эффективность совместного действия Dex и наиболее активных ингибиторов REDD1

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

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

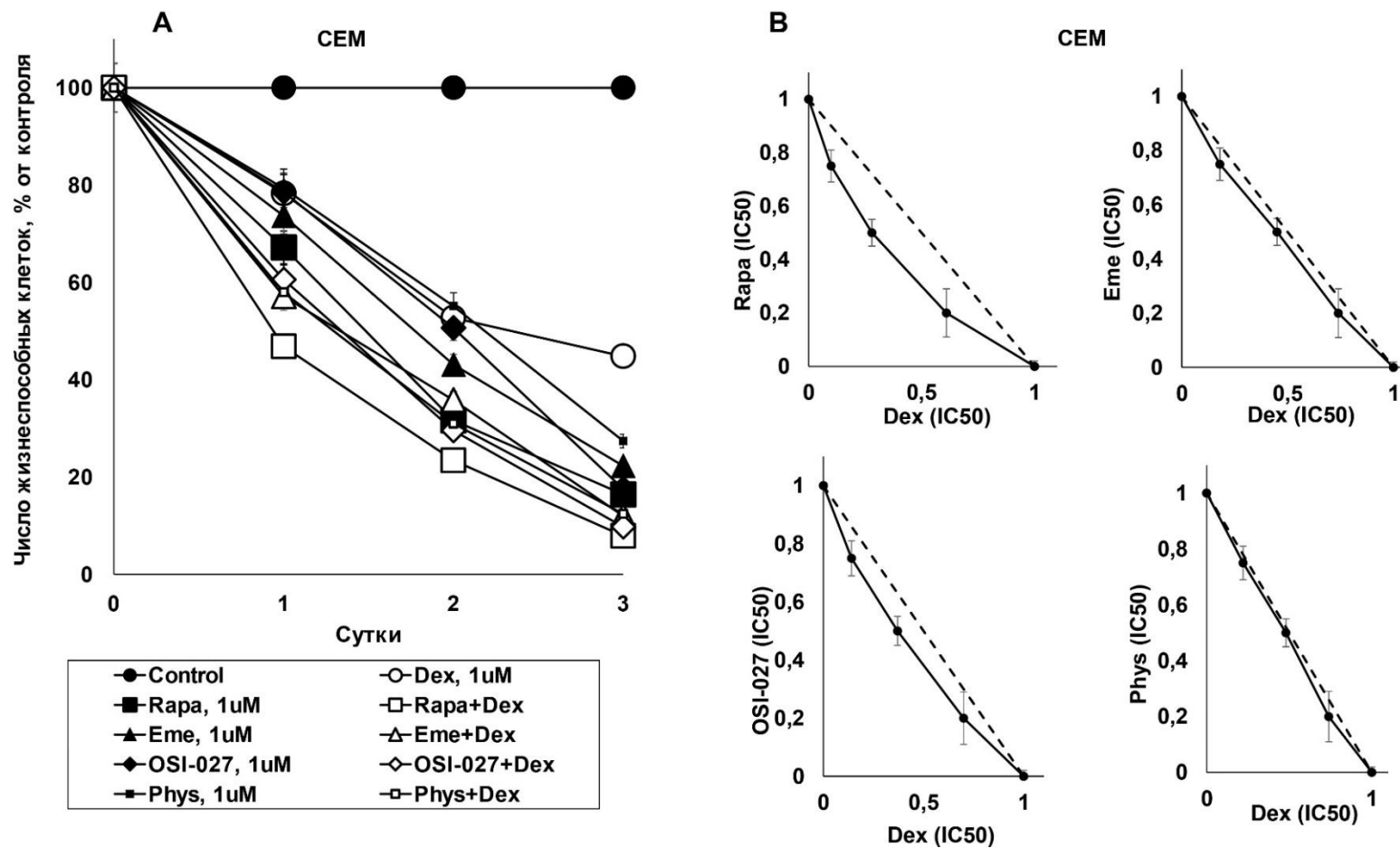


Рисунок 49 - Антипролиферативный эффект Dex, Rapa, OSI-027, Eme и Phys и их комбинаций на клетки CEM. **А.** Клетки обрабатывали растворителем, Dex, Rapa, OSI-027, Eme и Phys (все в концентрации 1мкМ). Подсчет клеток проводили каждые 24 ч. **В.** Изоболограммы строили для комбинаций Dex с Rapa, OSI-027, Eme и Phys. Концентрации исследуемых соединений, соответствующие IC50, принимали за 1,0 на осях абсцисс (CpdA) и ординат (Rapa, OSI-027, Eme или Phys)

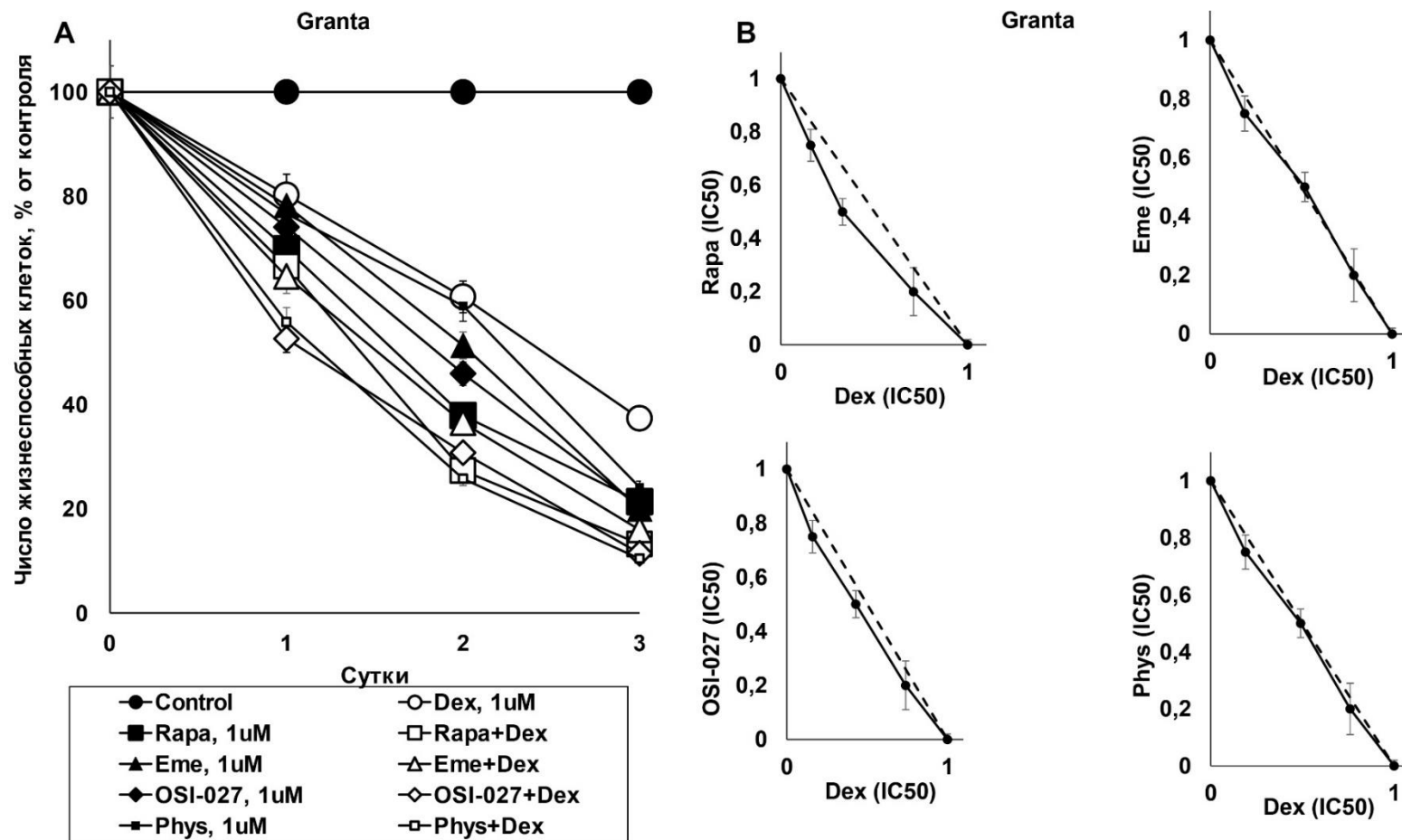


Рисунок 50 - Антипролиферативный эффект Dex, Rapa, OSI-027, Eme и Phys и их комбинаций на клетки Granta. А. Клетки обрабатывали растворителем, Dex, Rapa, OSI-027, Eme и Phys (все в концентрации 1мкМ). Подсчет клеток проводили каждые 24 ч. В. Изоболограммы строили для комбинаций Dex с Rapa, OSI-027, Eme и Phys. Концентрации исследуемых соединений, соответствующие IC50, принимали за 1,0 на осях абсцисс (CpdA) и ординат (Rapa, OSI-027, Eme или Phys)

3.3.3. Оценка влияния рапамицина на GR-зависимую экспрессию гена *REDD1*

По результатам предварительной оценки влияния отобранных соединений на экспрессию *REDD1* и по цитотоксическому эффекту на клетки лейкоза и лимфомы наиболее активным соединением оказался иммуносупрессор рапамицин. Более того, при скрининге *in silico* было показано, что данный препарат был протестирован в наибольшем количестве различных молекулярно-биологических тестов: для Rara их число составило 40, в то время как для остальных препаратов в базах данных существует информация только по 2-6 тестам. В связи с этим, Rara был выбран нами в качестве основного ингибитора *REDD1* для проведения дальнейших исследований. Были проведены предварительные эксперименты по определению оптимального режима обработки клеток. Так, рапамицин добавляли в культуральную среду одновременно с Dex в концентрации 1 мкМ, за 3 ч до обработки Dex и за 6 часов до обработки Dex (Рисунок 51). Было показано, что Dex индуцировал экспрессию гена *REDD1* после 24 ч обработки клеток всех исследуемых линий (Рисунок 51), однако наиболее выраженный эффект рапамицина по подавлению экспрессии *REDD1* наблюдали только при 6 ч предобработки: было продемонстрировано снижение базальной экспрессии *REDD1* в 6,5 раз по сравнению с контролем, и снижению Dex-индуцированной экспрессии *REDD1* в 4,6 раз по сравнению с контролем и в 17,6 раз по сравнению с мРНК клеток, обработанных только Dex. В связи с этим, для дальнейших исследований был выбран режим обработки клеток, включающий в себя 6-часовую предобработку рапамицином и дальнейшую инкубацию в течение 24 ч с Dex. Также нами были подобраны оптимальные концентрации рапамицина. На рисунке 51 рапамицин в концентрациях 0,1-1 мкМ ингибировал как базальный, так и индуцированный уровень экспрессии *REDD1* как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Наиболее выраженный ингибирующий эффект рапамицина на экспрессию *REDD1* наблюдали при использовании рапамицина в концентрации 1 мкМ.

Основную функциональную активность рапамицина подтверждали с помощью Вестерн-блот-анализа эфферентных мишеней пролиферативного комплекса mTOR, по снижению уровня фосфорилирования мишеней действия mTOR белка связывания 1 фактора инициации 4E эукариот (4E-BP1) и рибосомного белка S6 (rpS6) (Рисунок 51). Уровень фосфорилирования данных белков был значительно подавлен, что свидетельствует о снижении активности mTOR. Данные маркеры активности mTOR были выбраны вследствие простоты в детектировании базального уровня фосфорилирования во всех исследуемых клетках (Рисунок 51). Известно, что глюкокортикоиды также ингибируют активность mTOR [553, 554]. В наших исследованиях Dex и рапамицин проявляли кооперативный эффект в подавлении фосфорилирования rpS6 и 4EBP1 в клетках всех изучаемых линий (Рисунок 54). В литературе описано, что *REDD1* является физиологическим ингибитором mTOR, активирующимся в ответ на гипоксию и, подавляя

пролиферативную активность клетки, способствует тем самым ее выживанию. Таким образом, подавление экспрессии ингибитора mTOR REDD1 известным фармакологическим ингибитором mTOR рапамицином осуществляется за счет механизма отрицательной обратной связи.

В рамках подбора оптимального режима терапии для исследований *in vivo* нами также были проведены серии экспериментов по индукции экспрессии *REDD1* различными глюкокортикоидами. В эксперимент был включен преднизолон (Pred), который наряду с дексаметазоном широко используют в терапии злокачественных новообразований кроветворной системы, а также два глюкокортикоида, которые применяют местно, в виде мазей и кремов: флуцинолона ацетонид (FA) и клобетазола пропионат (CBP). Рабочие концентрации исследуемых глюкокортикоидов совпали с используемой в работе концентрацией Dex и составили 1 мкМ для каждого препарата. Рапа использовали в концентрации 25 нМ, 100 нМ и 1 мкМ и обрабатывали им клетки за 6 ч до добавления GC в культуральную среду. Как было показано в ходе экспериментов, дозовая зависимость эффектов Рапа на экспрессию *REDD1* сохраняется вне зависимости от типа GC, которым обрабатывали клетки (Рисунок 52).

Для того, чтобы определить, подавляет ли экспрессию *REDD1* только ингибитор комплекса 1 mTOR (mTORC1) или же ингибиторы обоих комплексов mTOR (mTORC1 и mTORC2) способны подавлять экспрессию *REDD1*, нами было изучено влияние на синтез гена/белка REDD1 фармакологического ингибитора обоих комплексов mTORC1 и mTORC2, OSI-027. Данный препарат является каталитическим ингибитором, который блокирует связывание АТФ с обоими комплексами [694]. Было продемонстрировано, что OSI-027 (1-5 мкМ, 6 ч предобработки) ингибирует как базальный, так и GC-индуцированный уровень экспрессии *REDD1* (Рисунок 53).

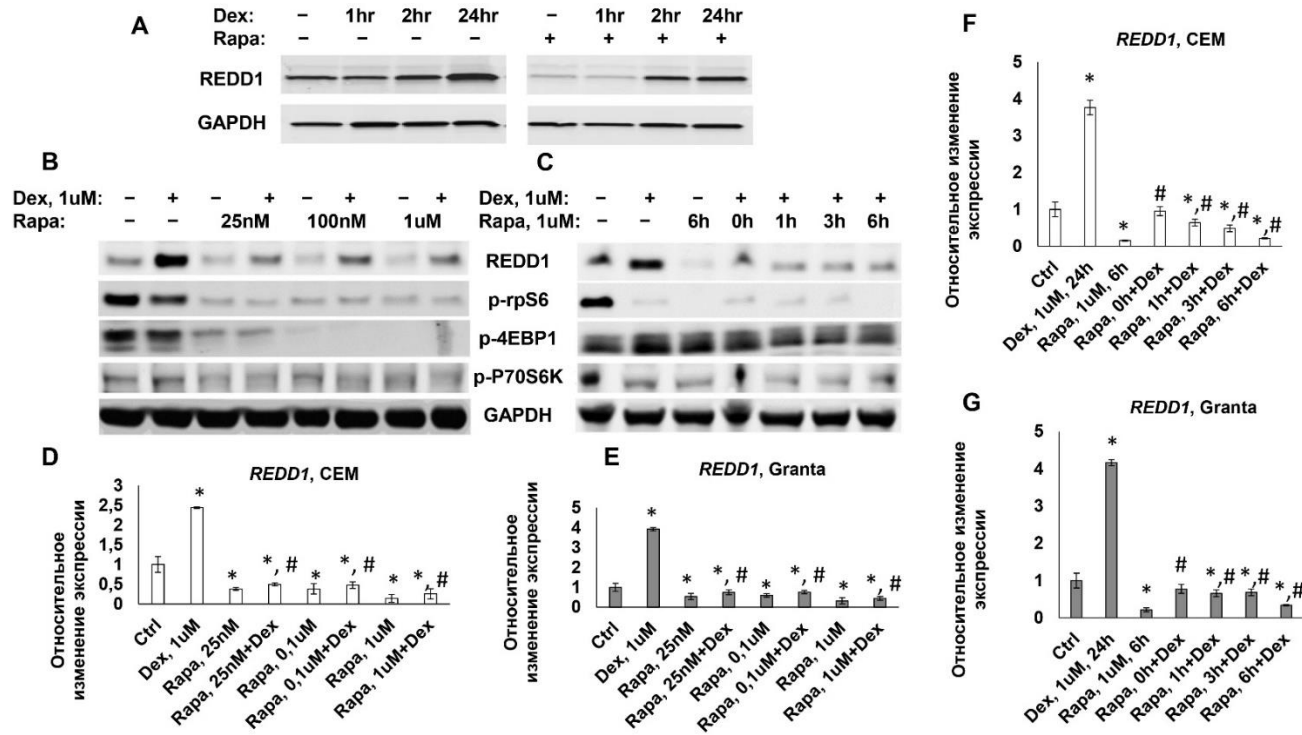


Рисунок 51 - Зависимость подавления экспрессии REDD1 от концентрации Rapa и от времени обработки. **A.** Клетки обрабатывали Rapa или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение указанного времени. **B, D, E.** Клетки обрабатывали Rapa в указанных концентрациях в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель, и инкубировали в течение 24 ч. **C, F, G.** Клетки обрабатывали Rapa в течение указанного времени, затем в среду добавляли Dex или растворитель, и инкубировали в течение 24 ч. Экспрессию REDD1 анализировали методом Вестерн блоттинга и количественной ПЦР, экспрессию p-rpS6, p-4EBP1 и p-p70S6K анализировали методом Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали антитела к GAPDH. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$

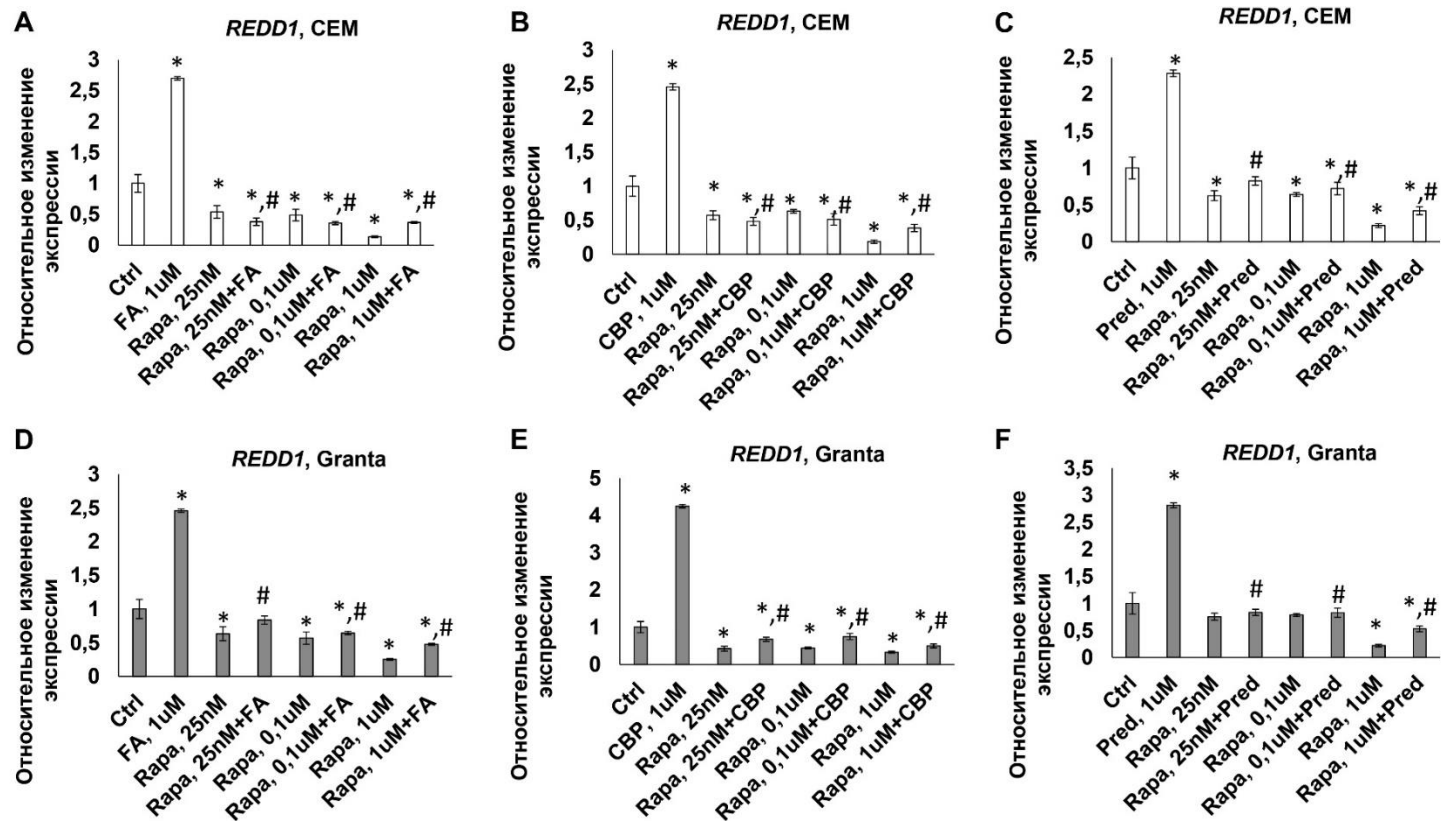


Рисунок 52 - Эффекты Rapa на экспрессию REDD1, индуцированную глюкокортикоидами флуоцинолона ацетонида (FA), клобетазола пропионата (CBP) и преднизолона (Pred) в клетках CEM (A, B, C) и Granta (D, E, F). Клетки обрабатывали Rapa или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли FA (A, D), CBP (B, E) или Pred (C, F) или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Экспрессию *REDD1* анализировали методом количественной ПЦР. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных FA, CBP, Pred, $p < 0.05$

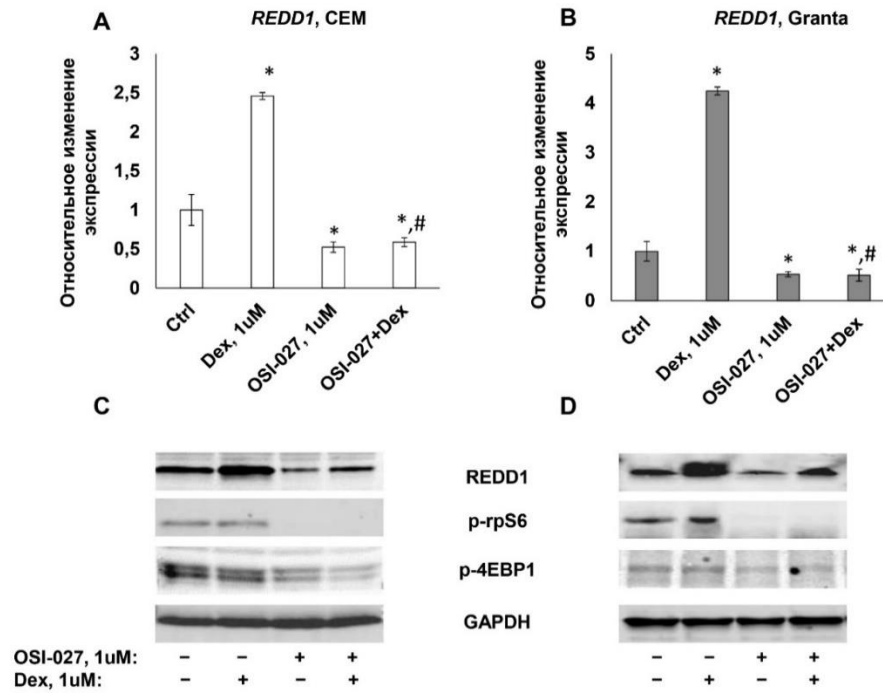


Рисунок 53 - Эффект OSI-027 на экспрессию REDD1 в клетках CEM (A, C) и Granta (B, D). Клетки обрабатывали OSI-027 (1 мкМ) в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Экспрессию REDD1 анализировали методом Вестерн блоттинга (C, D) и количественной ПЦР (A, B), экспрессию p-rpS6, p-4EBP1 и p-p70S6K анализировали методом Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали антитела к GAPDH. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$

3.3.4. Влияние ингибитора экспрессии REDD1 рапамицина на активацию GR

3.3.4.1. Действие рапамицина на ядерную транслокацию и фосфорилирование GR

Для того, чтобы понять механизм подавления запуска транс-активации, нами было проанализировано влияние рапамицина на основные ступени активации GR: фосфорилирование и ядерную транслокацию.

В обработанных глюкокортикоидами клетках Granta ядерная транслокация GR наблюдалась через 10 мин после обработки, причем GR оставался в ядре в течение 24 ч после обработки (Рисунок 54). В клетках CEM ядерная локализация GR наблюдалась после 30 мин обработки, и GR сохранял ядерную локализацию в течение 24 ч после обработки (Рисунок 54). Предобработка клеток рапамицином вызывала задержку ядерного перемещения GR и усиливала перемещение рецептора обратно в цитоплазму во всех исследуемых линиях клеток (Рисунок 54).

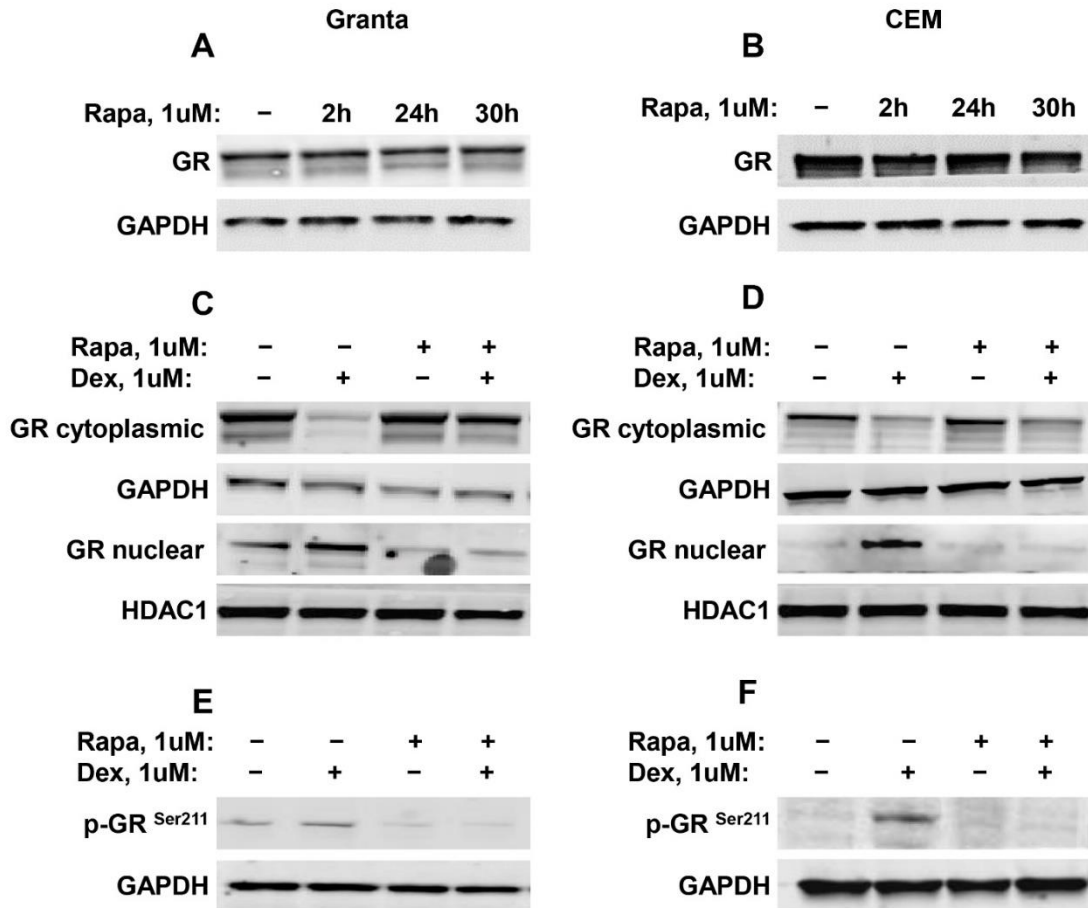


Рисунок 54 - Эффекты Рапа на фосфорилирование GR и его ядерную транслокацию в клетках Granta (A, C, E) и CEM (B, D, F). Клетки обрабатывали Рапа (1 мкМ) в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. A, B. Эффект Рапа на экспрессию GR в клетках Granta (A) и CEM (B). C- F. Эффект Рапа на ядерной транслокации и фосфорилирования GR в клетках Granta (C, E) и CEM (D, F). Экспрессию GR в тотальном клеточном лизате, цитоплазматической и ядерной фракциях, p-GR в тотальном клеточном лизате анализировали методом Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали антитела к GAPDH и HDAC1.

Фосфорилирование GR по остатку серина в 211 положении (Ser211) является критическим для индукции транс-активации GR [692, 695]. Фосфорилирование GR было значительно подавлено при обработке клеток рапамицином в лимфоидных клетках, хотя кинетика данного процесса различалась в зависимости от типа клеток (Рисунок 54). В то же время рапамицин даже после длительной инкубации с клетками в течение 30 ч не изменял общую экспрессию GR (Рисунок 54).

3.3.4.2. Оценка степени запуска механизмов транс-репрессии и транс-активации

REDD1 является GR-зависимым геном. В связи с этим, нами было изучено влияние рапамицина на запуск процесс транс-активации GR с помощью люциферазного репортерного анализа. Клетки исследуемых линий были трансдуцированы лентивирусным репортером, несущим ген люциферазы светлячка по контролю промотора, содержащего множественные сайты связывания GR (глюкокортикоид-респонсивные элементы, GRE). Нами было продемонстрировано, что рапамицин значительно снижает активность люциферазы при обработке клеток Dex в клетках всех исследуемых линий (Рисунок 55). Далее нами был проведен анализ влияния рапамицина на транс-реессию GR также с помощью люциферазного репортерного анализа. Клетки исследуемых линий были трансдуцированы лентивирусным репортером, несущим ген люциферазы светлячка под контролем промотора, содержащего множественные сайты связывания пролиферативного и провоспалительного фактора NF-κB. Было показано, что как Dex, так и рапамицин снижали активность NF-κB, более того, при использовании данных препаратов в комбинации наблюдался кооперативный эффект подавления активности NF-κB (Рисунок 56).

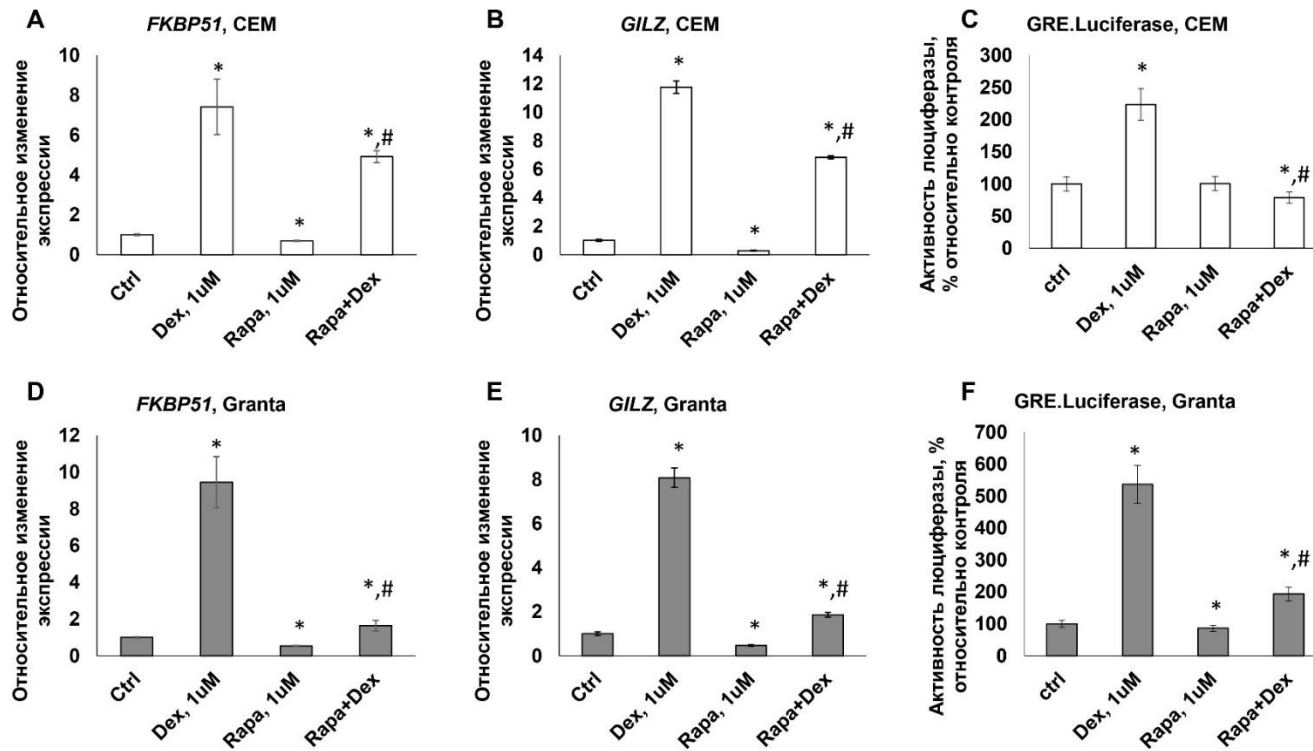


Рисунок 55 - Влияние Рапа на GC-индуцированную транс-активацию в клетках CEM (A, B, C) и Granta (D, E, F). A, B, D, E. Клетки обрабатывали Рапа или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии генов *FKBP51* и *GILZ* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. C, F. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки обрабатывали Рапа или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 8 ч. Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$

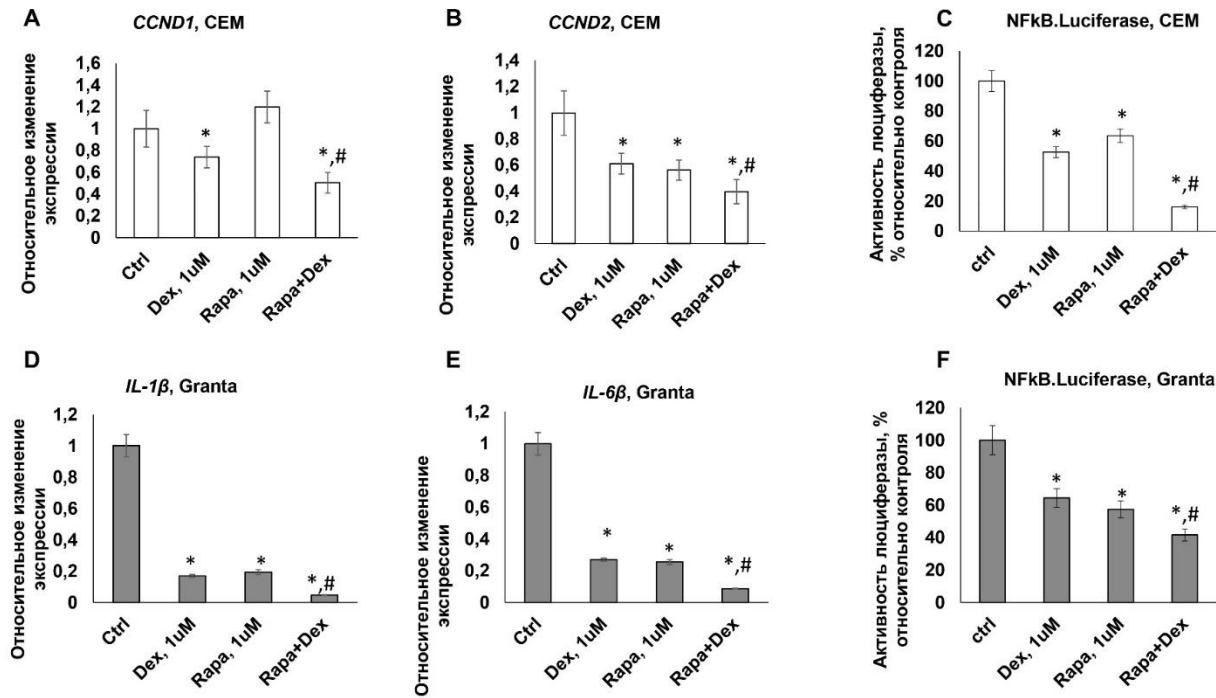


Рисунок 56 - Влияние Rapa на GC-индуцированную транс-репрессию в клетках CEM (A, B, C) и Granta (D, E, F). A, B, D, E. Клетки обрабатывали Rapa или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 24 ч. Уровень экспрессии генов *CCND1*, *CCND2*, *IL-1 β* , *IL-6 β* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта гена *RPL27*. C, F. После трансдукции лентивирусного вектора rGF1-NF-kB клетки обрабатывали Rapa или растворителем в течение 6 ч, затем в среду добавляли Dex или растворитель и инкубировали в течение 8 ч. Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$

3.3.5. Исследование влияния рапамицина на эффекты глюкокортикоидов *in vivo*

3.3.5.1. Оценка противоопухолевого эффекта глюкокортикоидов в комбинации с рапамицином

Также необходимо было оценить взаимное влияние рапамицина и Dex на противоопухолевые эффекты друг друга в модели *in vivo*. Бестимусным мышам подкожно перевивали клетки Granta в количестве 10 миллионов клеток на мышь и начинали лечение по достижении опухолевым узлом размера 50 мм³. Препараты вводили в следующих дозировках: Dex (1 мг/кг), контроль (физиологический раствор), рапамицин (5 мг/кг) вводили внутривентриально, на 1, 3 и 5 дни недели. Рапамицин вводили за 6 ч до введения Dex. На 30 день лечения было показано, что объем опухоли в группе животных, получавших дексаметазон, уменьшился в 2 раза, в группе животных, получавших рапамицин – в 4 раза, а в группе животных, получавших комбинацию рапамицина с Dex – в 5 раз. Таким образом, рапамицин и Dex не ослабляют эффекты друг друга на рост и жизнеспособность клеток опухоли. Более того, при их совместном применении наблюдается кооперативный противоопухолевый эффект (Рисунок 57).

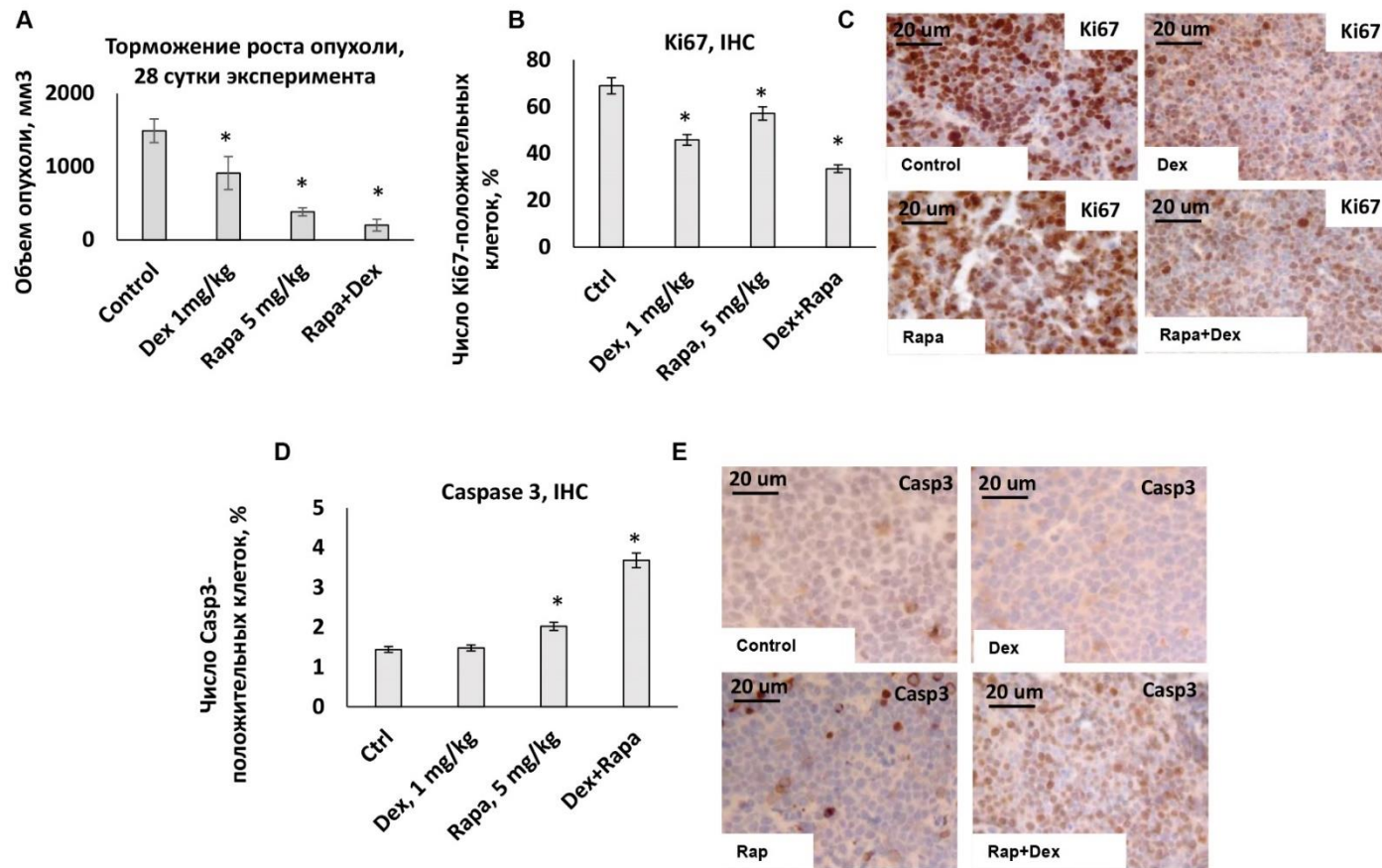


Рисунок 57 - Эффективность терапевтического действия рапамицина и Dex на объем ксенографтов лимфомы. А. Средний объем ксенографтов на 30 день эксперимента. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=10$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. В, С, D. Количественный анализ плотности клеток в опухоли (В), Ki67- (С) и Casp3- (D) положительных клеток проводили с использованием гистологических образцов, окрашенных гематоксилином-эозином или специфическими антителами к TUNEL и Casp3. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. Е, F. Характеристическое иммуногистохимическое окрашивание Ki67 (Е) и Casp3 (F).

3.3.5.2. Влияние рапамицина на GC-индуцированную атрофию кожного покрова

Далее мы оценили влияние рапамицина на индукцию REDD1 глюкокортикоидами *in vivo* в мышцах-гибридах F1 C57Bl x 129. Глюкокортикоид флуоцинолона ацетонид (FA, используется при наружном применении) значительно повышал уровень экспрессии REDD1 в эпидермисе. Предобработка рапамицином подавляла индукцию REDD1 как на уровне белка, так и на уровне мРНК (Рисунок 58). Хроническое наружное применение GC (в течение 2 недель каждые 72 ч) вызывало значительную атрофию кожного покрова (Рисунок 58). Рапамицин предотвращал атрофию эпидермиса: у мышей, кожу которых обрабатывали только FA, толщина эпидермиса уменьшилась на 62% в сравнении с менее чем 30% у животных, кожу которых обрабатывали комбинацией FA с рапамицином (Рисунок 58). В то же время было продемонстрировано, что рапамицин не предотвращает GC-индуцированную атрофию подкожной жировой клетчатки (Рисунок 58), что вероятней всего связано с ограниченным проникновением рапамицина в глубокие слои кожи.

Эффект рапамицина на действие GC был оценен с помощью двух моделей *in vivo*: модель острого воспаления, вызванного кротоновым маслом, на ушах, и хронический контактный дерматит, вызванный 12-*O*-тетрадеcanoилацетатом форболовой кислоты (TPA). Как и ожидалось, кротоновое масло вызывало воспаление ушной раковины, которое приводило к развитию отека и увеличению объема и массы. Глюкокортикоид FA полностью предотвращал развитие острого воспаления (Рисунок 59). При использовании второй модели TPA вызывал как значительную воспалительную реакцию, так и гиперплазию эпидермиса. FA значительно уменьшал и степень гиперплазии, о которой судили по толщине эпидермиса, и степень развития воспаления, оцениваемой морфологически, а также с помощью количественного ПЦР-анализа экспрессии провоспалительных и про-пролиферативных генов IL-1 β , IL-22, S100 кальций связывающие белки 8 и 9; MMP3, p65/RelA и p50. Предобработка рапамицином не повлияла на противовоспалительный эффект глюкокортикоидов в обеих моделях (Рисунки 58-59).

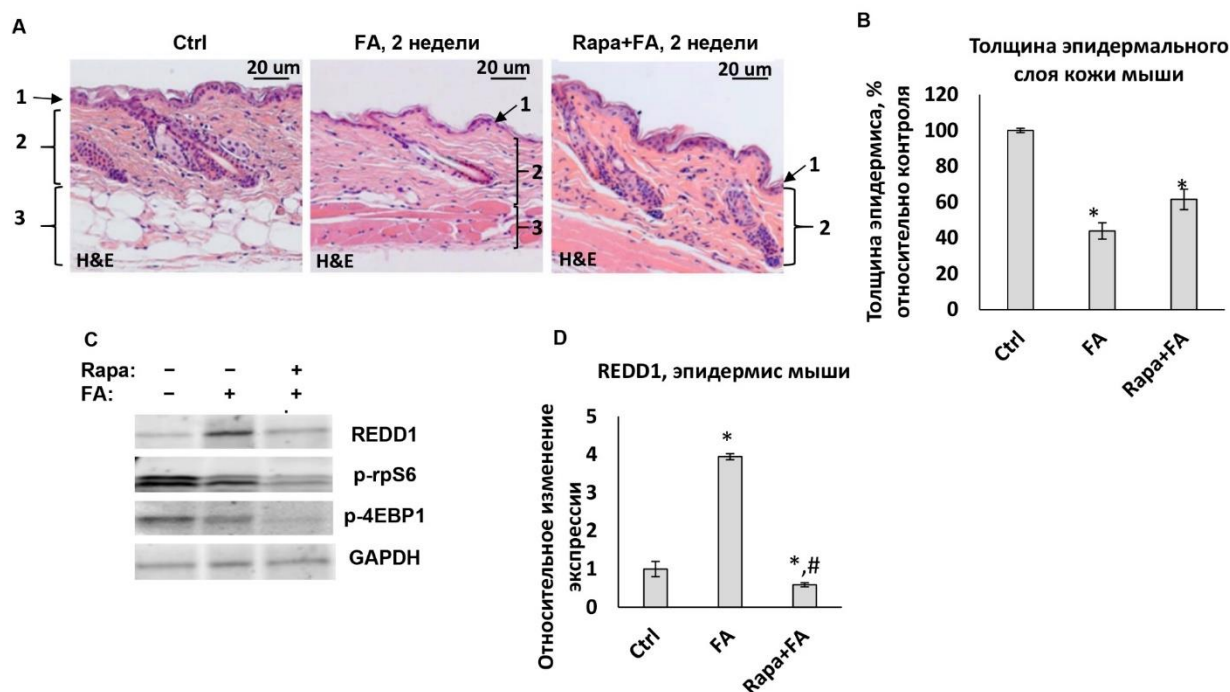


Рисунок 58 - Влияние Rapam на стероид-индуцированную атрофию кожного покрова. Кожный покров животных обрабатывали растворителем или FA (2 мкг) +/- Rapam (0.5 мг) в течение 2 недель каждые 72 ч. А. Окрашивание гематоксилином-эозином. В. Толщина кожного покрова, изменения по отношению к контролю. Данные представлены как $M \pm m$ ($n=30$), * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0.05$. С, D. Экспрессию REDD1 анализировали с помощью Вестерн блоттинга и количественной ПЦР. Ген/белок Rpl27 использовали в качестве контроля загрузки. Тотальную мРНК и белковую фракцию выделяли из эпидермиса. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных FA, $p < 0.05$. Условные обозначения: 1 – эпидермис, 2 – дерма, 3 – подкожная жировая клетчатка

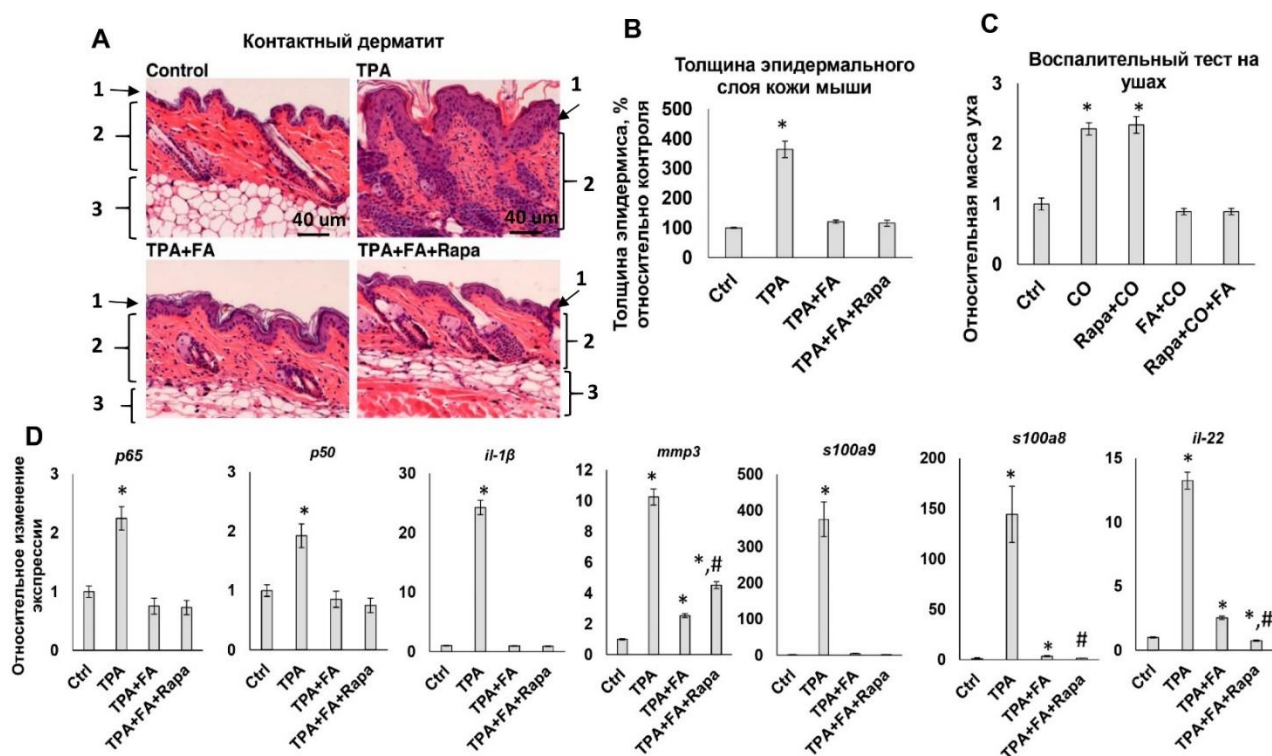


Рисунок 59 - Влияние Рапа на противовоспалительные свойства глюкокортикоидов. А, В, D. Контактный дерматит. Животных обрабатывали Рапа (0.5 мг), через 6 ч обрабатывали ТРА (4 мкг/мышь)+/-ФА (1 мкг/мышь) каждые 72 ч в течение 2 недель. Образцы кожного покрова собирали через 24 ч после последней обработки. Из эпидермиса извлекали тотальную мРНК. А. Окрашивание гематоксилином-эозином. В. Толщина кожного покрова. С. Тест на воспаление на ушах. Воспаление индуцировали с помощью кротонового масла (СО) после обработки растворителем, рапамицином или ФА+/-рапамицин. Далее с помощью панчей для биопсии из каждого уха отбирали образцы 4 мм диаметром. Масса образцов служила критерием развития воспаления. D. Эффект Рапа на экспрессию провоспалительных генов. Тотальную РНК выделяли из эпидермиса. Результаты количественного ПЦР-анализа нормализовали на уровень экспрессии гена *Rpl27*. Данные представлены как $M \pm SD$ (n=3), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных ФА, $p < 0.05$. Условные обозначения: ТРА - 12-0-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат, СО – кротоновое масло, 1 – эпидермис; 2 – дерма; 3 – подкожная жировая клетчатка

Способность рапамицина модулировать функциональную активность GR была также подтверждена с помощью анализа профилей экспрессии генов на ДНК-микрочипах. Нами были сравнены профили экспрессии генов в клетках HaCaT, обработанных растворителем, глюкокортикоидом FA, рапамицином или рапамицином в комбинации с FA. Нами были идентифицированы 130 дифференциально регулируемых генов, на которые воздействовал FA: экспрессия 78 из них повышалась, а 52 – снижалась. При анализе данных ДНК-микрочипирования мы наблюдали изменения в большом количестве GC-регулируемых сигнальных путей и биологических процессов: воспаление, синтез стероидных гормонов, клеточная адгезия, эпителиально-мезенхимальный переход, гены, вовлеченные в развитие, дифференцировку и апоптоз [696–698]. Анализ отдельных категорий генов показал, что существуют тесные взаимодействия между сигнальными путями GR и TGF- α , Ras, и Notch, основными сигнальными путями, ответственными за дифференцировку и пролиферацию клеток.

Приблизительно 90% генов, регулируемых FA, также изменяли свою экспрессию после комбинированной обработки клеток FA с рапамицином. Однако необходимо отметить, что после комбинированной обработки клеток степень изменения генов, регулируемых FA, менялась сильнее, чем при индивидуальной обработке, в случае генов, экспрессия которых подавляется. В то же время рапамицин снижал запуск транс-активации. Эти эффекты были подтверждены с помощью количественного ПЦР-анализа (Рисунок 60).

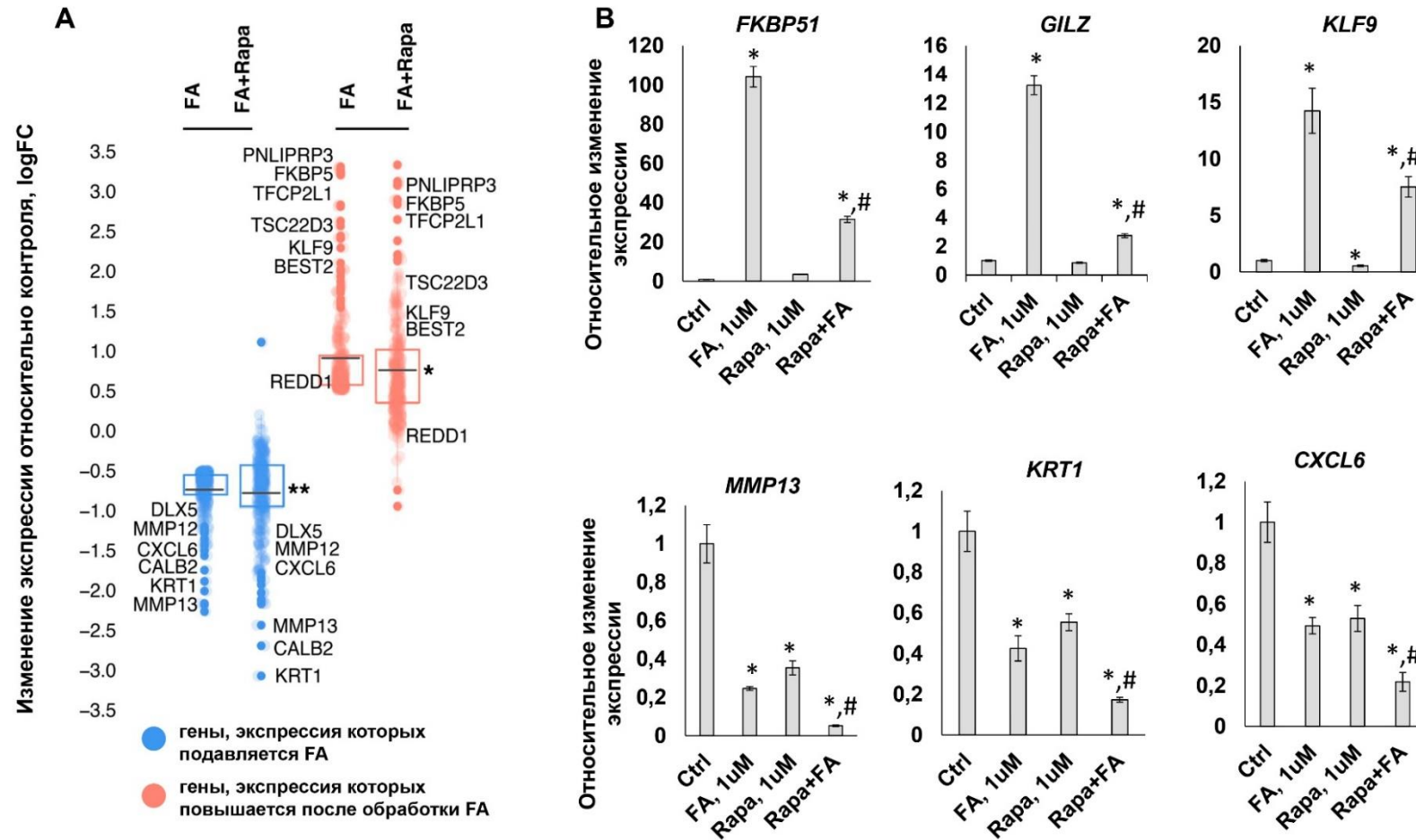


Рисунок 60 - Анализ изменений профилей экспрессии GR-зависимых генов при обработке иммортализованных кератиноцитов человека линии HaCaT Rapa и FA. А. Клетки HaCaT обрабатывали растворителем, Rapa, FA и их комбинацией. Затем из клеток выделяли тотальную мРНК и использовали для анализа на ДНК-микрочипах HT-12 Illumina. В. Валидация с помощью количественной ПЦР. Данные представлены как $M \pm SD$ ($n=3$), * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных FA, $p < 0.05$

3.3.5.3. Оценка влияния рапамицина на GC-индуцированную атрофию кожного покрова и костной ткани при системном применении

Глюкокортикоиды вызывают атрофию во многих органах и тканях, как при системном, так и при местном применении [692]. Ранее нами и другими исследовательскими коллективами было продемонстрировано, что REDD1 играет ключевую роль в развитии GC-индуцированной атрофии [553, 699] при местном применении. В наших исследованиях было показано атрофическое действие Dex на слои эпидермиса и дермы при системном применении (Рисунок 61). При добавлении в протокол обработки животных рапамицина наблюдали существенное снижение степени атрофии кожного покрова как на уровне дермы, так и на уровне эпидермиса. При изучении влияния рапамицина на GC-индуцированный остеопороз у мышей не было продемонстрировано значимой разницы между толщиной бедренных костей у контрольной группы животных и экспериментальной группы, получавшей дексаметазон. Однако при исследовании молекулярных маркеров остеопороза было выявлено существенное различие. В частности, повышенное соотношение RANKL/OPG, ассоциированное со способностью поддерживать формирование и активацию остеокластов, наблюдали в образцах от животных получавших дексаметазон. Рапамицин способствовал снижению этого показателя до контрольного уровня.

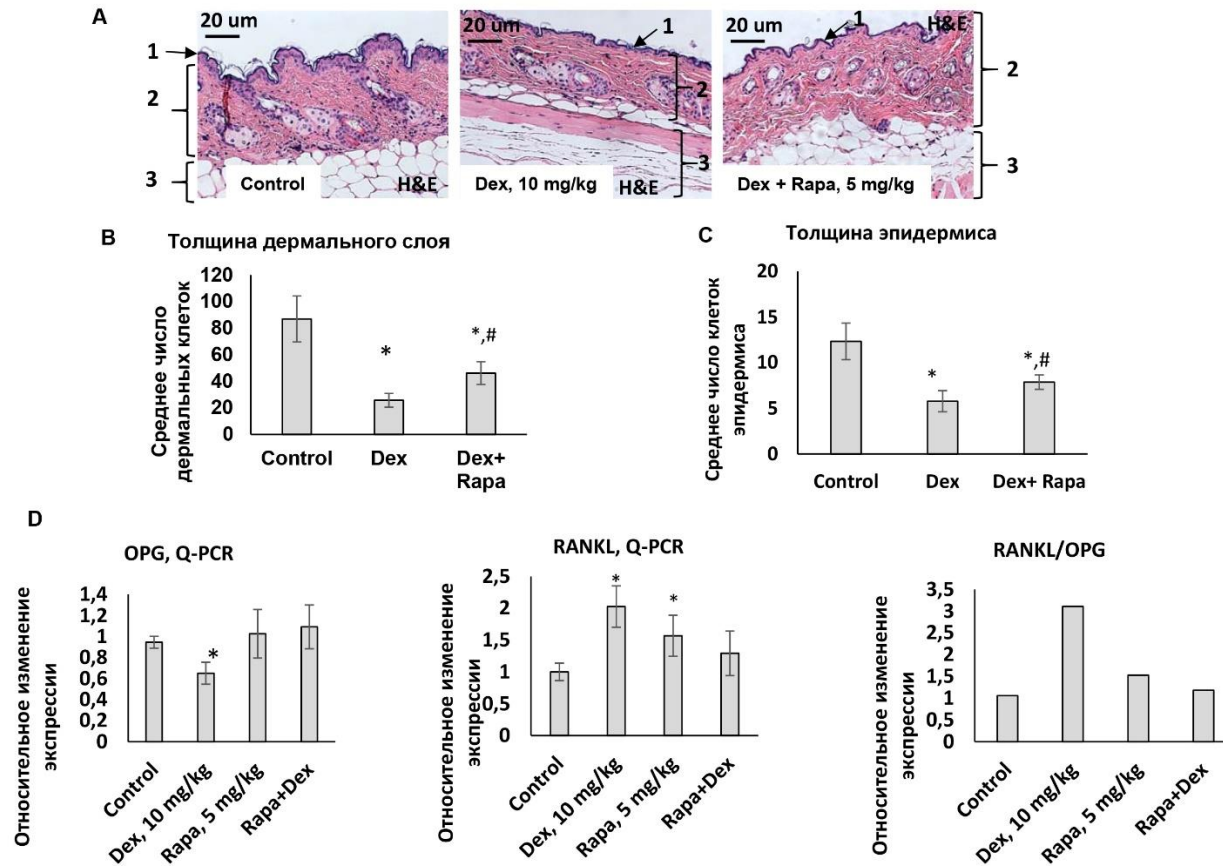


Рисунок 61 – Влияние рапамицина на GC-индуцированную атрофию кожного покрова и костной ткани А, В. Гистологическое исследование образцов кожного покрова (А) и количественный анализ толщины дермального (В) и эпидермального (С) слоев. D-F. ПЦР анализ экспрессии генов RANKL (D) и OPG (E), и их соотношение (F). Данные представлены как $M \pm SD$, * - статистически значимое отличие от контроля, # - статистически значимое отличие от образцов, обработанных Dex, $p < 0.05$. Условные обозначения: 1 – эпидермис, 2 – дерма, 3 – подкожная жировая клетчатка

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Повышение противоопухолевых эффектов сигнального пути GR посредством использования SEGRA

4.1.1. Противоопухолевые свойства CpdA

Разработка новых селективных агонистов GR, SEGRA, сохраняющих терапевтический потенциал GC, но обладающих меньшим риском развития побочных эффектов, остается перспективным направлением в течение длительного времени. В основе молекулярного механизма действия SEGRA лежит тот факт, что данные соединения не способны вызывать димеризацию GR и связанную с ней транс-активацию, но индуцируют транс-репрессию в полном объеме [508, 700]. CpdA представляет собой подобный пример SEGRA, при связывании с которым рецептор остается в мономерном состоянии. Более того, связанный с CpdA GR способен привлекать ко-репрессорные молекулы, в частности NCoR и SMRT, способные подавлять GR-зависимую активацию транскрипции [48, 499, 701].

В первую очередь все новые лиганды GR класса SEGRA перспективны для терапии аутоиммунных заболеваний, а также патологических состояний, связанных с хроническим воспалением [476, 702]. В представленной работе описаны противоопухолевые свойства CpdA, о которых впервые было заявлено в публикациях нашей исследовательской группы [1, 703]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что CpdA обладает свойствами SEGRA, а также проявляет значительный GR-зависимый противоопухолевый эффект *in vitro*, сравнимый с эффектом Dex. Необходимо также отметить, что клеточные линии лейкоза и лимфомы, используемые в данной работе в качестве модельной системы, обладают чувствительностью к CpdA, сходной с чувствительностью первичных трансформированных лимфоцитов, выделенных из крови пациентов клинических институтов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» с гематологическими новообразованиями (Рисунки 12-13, [1]).

При сравнении интегрального эффекта CpdA и Dex на профиль экспрессии генов в клетках Granta с помощью ДНК-микрочипов было показано, что гены, экспрессия которых повышается, различаются в случае клеток, обработанных Dex и CpdA. Так, только 7% генов, экспрессия которых повысилась после обработки клеток Dex, были идентичны генам с повышенной экспрессией после обработки клеток CpdA. В то же время CpdA подавлял экспрессию 31% генов, подавляемых также Dex, что говорит о сходстве в запуске механизма транс-репрессии в обеих экспериментальных группах образцов. Полученные данные согласовались с результатами сравнения профилей экспрессии генов после обработки Dex и CpdA клеток рака предстательной железы с экзогенным GR LNCaP-GR [692], где CpdA подавлял экспрессию 61% генов, экспрессия которых снижалась также при обработке Dex, и клеток аденокарциномы легких A549, где данный

показатель для CpдA составил 32% [503]. Таким образом, была продемонстрирована способность CpдA глобально изменять профили экспрессии генов с преобладанием генов-маркеров транс-репрессии.

В наших последующих исследованиях было показано, что в экспериментах *in vivo* на ксенографтах лимфомы Granta у бестимусных мышей CpдA снижал на 70% объем опухолей при использовании в дозе 5 мг/кг, что значительно ниже, чем дозы данного соединения, применяемые для терапии животных при моделировании противовоспалительного действия лигандов GR. [500, 520]. Полученные данные согласовались с результатами оценки противоопухолевой активности CpдA на клетках рака предстательной железы *in vitro* и ксенографтной модели *in vivo*, а также с результатами наших исследований по противоопухолевому действию CpдA *in vitro* на модели РМЖ [48, 538, 692, 704].

Необходимо отметить, что, несмотря на эффективность GC в химиотерапии лейкозов и лимфом, они редко используют при лечении в качестве монотерапии. Так, стандартные схемы лечения включают в себя, помимо дексаметазона или преднизолона, винкристин, доксорубин, циклофосфамид и др [705–708]. Из более современных препаратов распространенными агентами для включения в схему лечения гематологических новообразований в сочетании с GC являются ингибиторы убиквитин-протеасомной системы (УПС): первый в данной линейке препаратов ингибитор протеасом бортезомиб (BZ), одобренный к применению в США и Европе в 2003, а с 2009 г. применяющийся в РФ [539, 540]; карфилзомиб (CFZ), более специфичный ингибитор УПС, одобренный в США в 2012 г и в Европе в 2015 г, однако обладающий более высоким риском развития кардиотоксичности, по сравнению с BZ [709]; иксазомиб (IXZ), обладающий более коротким периодом полужизни и более высокой способностью проникать в органы и ткани, и одобренный для лечения множественной миеломы в США в 2016 г [709]; и MLN4924, ингибирующий убиквитин лигазу E3, в настоящее время проходящий I-II фазы клинических исследований [710–712]. Узкобороздочные лиганды являются перспективными агентами для использования в противоопухолевой терапии за счет отсутствия мутагенной активности и реализации цитотоксического действия посредством эпигенетических эффектов [713–717]. По совместному применению GC с узкобороздочными лигандами, включенные в представленное исследование, в химиотерапии лейкозов и лимфом, данных нет. В ряде публикаций описан гепатопротекторный эффект дексаметазона при терапии трабектедином (Trab), который применяют для лечения мягкотканых сарком [718–720]. Описана потенциальная противоопухолевая активность диминазена (Dim) или беренила, нетропсина (Net) и пентамидина (Pent), реализуемая за счет ингибирования топоизомераз [652, 721–723].

Одной из задач представленного исследования был отбор наиболее эффективных комбинаций препаратов описанных выше классов с CpдA. Эффективность действия комбинации

соединений на клетки отражал тип их совместного действия: синергизм, аддитивность или антагонизм. В представленном исследовании было показано, что синергизмом действия обладает комбинация BZ+CpdA, а также Trab+CpdA, но в меньшей степени. Бортезомиб, как более изученный препарат, был включен в наши дальнейшие исследования, где была показана его способность усиливать свойства CpdA как SEGRA в отношении более высокого уровня индукции транс-репрессии и подавления транс-активации, что совпадало с данными предыдущих исследований на модели рака предстательной железы [1, 48, 538]. Эти данные объясняли эффектом накопления GR при совместном применении CpdA и BZ, стабилизации рецептора и, как следствие, его повышенной активности [1, 16, 500, 506, 507]. Более того, нами было показано, что синергизм совместного действия CpdA и BZ наблюдается и в исследованиях *in vivo* на ксенографтах лимфомы у бестимусных мышей.

Таким образом, CpdA представляет собой первый модулятор GR, который не вызывает димеризации рецептора, и имеет специфический фармакологический профиль: сохраняя противовоспалительный и противоопухолевый потенциал GC, он обладает сниженной способностью вызывать побочные эффекты и резистентность к своему действию. При совместном применении ингибитора протеасом бортезомиба и CpdA был продемонстрирован синергизм противоопухолевого действия *in vitro* и *in vivo* в сочетании с усилением специфических свойств CpdA на фоне применения BZ, что свидетельствует о практической значимости данного исследования и актуализирует изучение эффектов SEGRA в сочетании противоопухолевыми препаратами

4.1.2. Подходы к разработке новых SEGRA

Подходы к получению новых SEGRA подробно описаны в разделе 2 «Обзор литературы». В основе любого подхода к их получению лежит либо модификация уже применяющихся препаратов, либо разработка синтеза новых соединений. В данной работе были протестированы три способа модифицировать/получить новые SEGRA: 1) получение CpdA в составе наночастиц золота, содержащих липопротеины высокой плотности (HDL NP); 2) разделение и/или синтез оптических изомеров CpdA; 3) синтез химических производных CpdA.

Выбор HDL NP для включения в их состав CpdA был основан на том, что HDL NP имеют высокое сродство к стероидам и обеспечивают доставку холестерина в стероидогенные органы, где производится синтез стероидных гормонов [683–685]. Нами было высказано предположение, что загрузка CpdA в HDL NP будет способствовать его таргетной доставке в органы синтеза глюкокортикоидов и созданию более высокой конкуренции с эндогенными GC за связывание с GR. Более того, липопротеины высокой плотности, как и высокомолекулярные белки сыворотки, будут способствовать стабилизации молекулы CpdA, а также собственные противоопухолевые

свойства HDL NP будут дополняться противоопухолевыми свойствами CpдA, что приведет к синергизму их совместного действия [495]. Однако, несмотря на то, что удалось получить HDL NP, загруженные CpдA, загрузка данного соединения оказалась недостаточной, либо стабильность полученных наночастиц HDL NP-CpдA была невысокой, о чем судили по идентичности кривых выживаемости клеток Granta и СЕМ после их обработки HDL NP и HDL NP-CpдA. Недостаточную загрузку, в свою очередь, можно объяснить может быть связано с отсутствием сродства CpдA к липопротеинам высокой плотности. Была предпринята попытка стабилизации и усилению противоопухолевых свойств CpдA с помощью его загрузки в HDL NP, однако данный способ был признан неэффективным и требующим дальнейшей оптимизации, что не входило в задачи исследования.

Важным свойством молекулы CpдA является ее хиральность: то есть данное соединение представляет собой рацемическую смесь двух оптических изомеров. Хотя энантиомеры обладают одинаковыми физико-химическими свойствами, они могут по-разному взаимодействовать с рецепторами организма, что нередко может обуславливать наличие существенных различий в их фармакодинамических и фармакокинетических свойствах. Примером этого может служить препарат Талидомид, (R)-энантиомер которого обладает седативным действием на организм человека, а (S)-энантиомер препятствует нормальному процессу транскрипции ДНК, необходимому для деления клеток и развития зародыша [724], что в 50-60 гг прошлого века привело к рождению детей с врождёнными физическими дефектами у женщин, принимавших Талидомид во время беременности. В общем случае, необходимо отметить, что применение чистых энантиомеров может приводить к уменьшению вариабельности метаболизма препарата в организме больного и возможности снижения у пациента терапевтически эффективной дозы препарата [725]. В настоящее время хиральные препараты могут быть допущены к продаже только в виде чистых энантиомеров, поэтому производителям приходится существенно модифицировать многие технологические процессы, а также разрабатывать новые эффективные методы их разделения. В связи с этим, синтез чистых энантиомеров CpдA и исследование их противоопухолевой активности в сравнении с рацемической смесью является актуальным.

Нашей основной гипотезой было предположение о том, что энантиомеры CpдA будут обладать различными биологическими свойствами, что приблизит данный препарат к доклиническим испытаниям: будет отобрано одно оптически чистое соединение с более выраженной противоопухолевой активностью *in vitro*. Однако в результате исследования было показано, что свойства энантиомеров CpдA отличаются незначительно [726]. В частности, при оценке экспрессии генов-маркеров транс-репрессии в клетках СЕМ более выраженным ингибирующим эффектом на экспрессию генов *CCND1* и *CCND2* обладал R-энантиомер CpдA, в

то время как для клеток Granta и генов *IL-1 β* и *IL-6 β* более сильный эффект наблюдали для S-CpdA. Однако различия в экспрессии генов при обработке R- или S-CpdA не были статистически значимыми. Гипотеза о том, что энантиомеры CpdA обладают различными биологическими свойствами, подтверждена не была, однако отработанный метод синтеза может служить основой для получения оптических чистых SEGRA на основе молекулы CpdA в будущем.

Однако также было показано, что CpdA является нестабильной молекулой, распадающейся в водном растворе до производного азиридина [495], относящегося по классификации МАИР к канцерогенам класса 2Б [689]. Аналоги CpdA с более стабильной структурой в литературе не описаны. Были описаны синтез и исследование биологических свойств SEGRA нестроидной структуры применительно к заболеваниям, связанным с развитием воспаления. Наиболее активно изучаемым SEGRA в настоящее время является мапракорат – препарат для терапии конъюнктивитов и аллергических заболеваний с проявлениями на глазах [471, 475, 727], однако его противоопухолевую активность не оценивали. Таким образом, синтез новых SEGRA остается актуальной задачей в настоящее время. Синтез исследуемых в данной работе химических производных CpdA был разработан таким образом, чтобы увеличить стабильность молекулы, сохранив при этом два участка пониженной электронной плотности, отвечающих за связывание с аминокислотными остатками GR Asn564 и Arg611. При исследовании эффектов синтезированных химических производных CpdA на жизнеспособность клеток СЕМ и Granta было продемонстрировано, что у части соединений (CpdA-03, -04, -05) данные эффекты зависят от уровня GR в клетке, следовательно, их действие реализуется посредством связывания с рецептором [728]. При количественном определении параметров связывания полученных производных CpdA с рецептором были получены данные о том, что концентрация CpdA-03, при которой наблюдается 50%-ное ингибирование связывания флуоресцентного лиганда GR (IC₅₀), составила 0,18 мкМ, что близко к расчетному (0,21 мкМ) и опубликованному (0,064-0,08 мкМ) значению IC₅₀ для CpdA [691]. Остальные тесты по определению уровня антипролиферативной и проапоптотической активности, а также по степени запуска транс-репрессии и транс-активации, продемонстрировали высокой противоопухолевой потенциал CpdA-03, в связи с чем он был нами отобран для тестирования в экспериментах *in vivo*. В данных экспериментах было показано, что его противоопухолевая активность сопоставима с исходным соединением.

Таким образом, в данном разделе работы нами были предложены независимые варианты модификации известных SEGRA и получения новых соединений этого класса. В результате использования одного из этих подходов был разработан перспективный аналог молекулы CpdA, который обладал такими же характеристиками по влиянию на функции GR, однако отличался от исходного соединения значительно большей стабильностью в водных растворах, отсутствием в

продуктах его расщепления/метаболизма токсичных и мутагенных соединений. Это свидетельствует не только о практической значимости проведенного исследования, но и свидетельствует о результативности разработанного нами оригинального подхода к синтезу аналогов SpdA, обладающих сродством к глюкокортикоидному рецептору.

4.2. Модулирование функциональной активности глюкокортикоидного рецептора посредством ингибирования REDD1

4.2.1. Ингибирование REDD1 как подход к снижению побочных эффектов глюкокортикоидов

В ходе изучения побочных и терапевтических эффектов GC нами и другими исследователями было показано, что *REDD1* является GC-регулируемым геном в кератиноцитах, миоцитах, нормальных и трансформированных лимфоцитах, тимоцитах, клетках рака шейки матки, рака молочной железы, рака толстой кишки, глиобластомы, множественной миеломы, эмбриональных клеток эпителия почки и др [553, 699, 729–731]. Активацию *REDD1*, сопровождаемую подавлением активности mTOR и индукцией аутофагии в эпителии мышцы наблюдали через 4-8 ч после обработки стероидами, однако в конце эксперимента на 14 сутки обработки уровень экспрессии *REDD1* и активности mTOR возвращались к прежним значениям [553], что совпадало с развитием резистентности к GC [67, 505]. В исследовании длительного кожного нанесения GC на мышах, дефицитных по гену *REDD1* (*REDD1-KO*), было продемонстрировано, что, в отличие от животных дикого типа, хроническое применение GC у мышей с *REDD1-KO* не вызывает развитие атрофии кожного покрова. Аналогичные данные были получены на трехмерных клеточных культурах кератиноцитов человека, где нокаут гена *REDD1* препятствовал развитию гипоплазии [557, 732]. В то же время, при тестировании влияния *REDD1* на терапевтический эффект GC, было показано, что уровень экспрессии данного гена не влияет на их противовоспалительные свойства: индуцированное внешним раздражителем воспаление снижалось при применении GC как у животных с *REDD1-KO*, так и у животных, несущих *REDD1* дикого типа [553].

О подавлении активности сигнального пути GR посредством mTOR было известно ранее [554], однако эффекты *REDD1* и других физиологических ингибиторов mTOR на GR изучены не были. С помощью биоинформатического анализа было показано, что профили экспрессии генов в эпидермисе мышей *REDD1-KO* и *REDD1* дикого типа значительно отличаются после обработки GC. В частности, было показано, что подавление экспрессии *REDD1* затрагивает процессы, ассоциированные с транс-активацией, в то время как эффектов на развитие GC-индуцируемой транс-репрессии не наблюдали [553]. Транс-активацию запускает связывание гомодимера GR с палиндромными GRE в промоторах и энхансерах GC-зависимых генов. Транс-репрессия

реализуется независимо от димеризации рецептора за счет прямого взаимодействия с факторами транскрипции, включающими в себя провоспалительные и пролиферативные факторы NF- κ B и AP-1. Другим механизмом запуска транс-репрессии является взаимодействие мономеров GR с негативными GRE [18, 509]. Соотношение активности процессов транс-активации и транс-репрессии зависит также от белков-коактиваторов (SRC-1, SRC2) и корепрессоров (NCoR, SMRT) [18]. Как было показано, фосфорилирование и ядерная транслокация GR не зависят от уровня экспрессии *REDD1* [553], что свидетельствует о роли *REDD1* в процессах димеризации рецептора и его связывании с ДНК, либо о его взаимодействии с белками-корегуляторами. Для реализации противовоспалительного и противоопухолевого эффекта GC транс-репрессия является основным механизмом, несмотря на то, что также, в зависимости от условий, требуется индукция транскрипции специфических генов [18, 67, 462, 469]. Побочные эффекты GR обусловлены транс-активацией [18, 469]. SEGRA, подходы к разработке которых описаны в предыдущих разделах «Результатов исследования» и «Обсуждения результатов», являются одним из способов дифференциальной регуляции активности GR с селективным запуском только механизма транс-репрессии. Как было показано, подавление экспрессии *REDD1* также является способом модулирования функциональной активности GR, что дает возможность предложить фармакологические ингибиторы *REDD1* или siРНК к данному гену в качестве вспомогательных компонентов терапии, в основе которой лежат GC.

4.2.2. Влияние рапамицина на терапевтические и побочные эффекты глюкокортикоидов

Поиск потенциальных ингибиторов *REDD1* был проведен среди уже зарегистрированных и используемых в клинической практике препаратов, реализуя идею перепрофилирования, получающую в настоящее время все большее распространение [733]. Был использован биоинформатический скрининг базы данных «карта взаимодействий» (Connectivity Map, CMap), разработанных исследовательской группой проф. Дадли (госпиталь Маунт-Синай, Нью-Йорк, США) [635, 734]. При биоинформатическом скрининге и проведению молекулярно-биологических тестов по влиянию потенциальных ингибиторов *REDD1* на его экспрессию *in vitro* в качестве наиболее перспективного кандидата был отобран иммуносупрессор, ингибитор сигнального пути mTOR рапамицин.

Способность рапамицина подавлять экспрессию *REDD1*, физиологического ингибитора mTOR, предполагает регуляцию данных процессов по механизму отрицательной обратной связи. Данная гипотеза была подтверждена результатами исследований влияния генетического подавления активности mTORC1 с помощью короткой шпилечной РНК к одному из компонентов данного комплекса, гену Raptor (shRaptor) [654]. *REDD1* представляет собой короткоживущий белок, деградация которого находится под контролем УПС [735, 736]. Как было показано, mTOR,

в числе прочих, регулирует также и протеасомную деградацию REDD1, а ингибиторы mTOR снижают время полужизни REDD1 [737]. По данным наших исследований было продемонстрировано, что обработка клеток лимфомы Granta и лейкоза СЕМ ингибитором mTORC1 рапамицином и ингибитором mTOR двойной направленности (mTORC1 и mTORC2) приводит к подавлению как базальной, так и GC-индуцированной экспрессии REDD1 на уровне белка и на уровне мРНК. Полученные данные согласуются с подавлением экспрессии REDD1 в кератиноцитах *in vivo* у мышей при обработке кожного покрова животных рапамицином в сочетании с глюкокортикоидами. Данные результаты свидетельствуют о важной роли механизма отрицательной обратной связи между mTOR и REDD1 в модулировании взаимной регуляции между катаболическими эффектами, реализуемыми при активации сигнального пути GR и анаболическими эффектами, реализуемыми при активации сигнального пути mTOR.

При дальнейших исследованиях влияния рапамицина на функциональную активность GR нами было продемонстрировано, что рапамицин значительно изменяет направление активации GR, способствуя только запуску GR-зависимой транс-репрессии. Все полученные в ходе работы результаты свидетельствуют о том, что в присутствии рапамицина глюкокортикоиды функционируют как SEGRA, сохраняя свой терапевтический эффект при значительном снижении степени развития побочных эффектов [506, 692].

Ядерная транслокация GR и запуск механизма транс-активации напрямую связаны с фосфорилированием рецептора [452, 692], опосредованным взаимодействием с MAPK, CDK, GSK-3 β [695, 738]. В данной работе было показано, что рапамицин подавляет фосфорилирование GR по положению Ser211 и угнетает перемещение GR в ядро. Воздействие рапамицина на фосфорилирование рецептора можно объяснить его эффектами на киназы сигнального пути mTOR за счет взаимодействия данного сигнального пути с другими, в частности, p38, GSK-3 β и др. [739–741]. Различные механизмы отрицательной регуляции генов также включают в себя взаимодействие GR с другими транскрипционными факторами, что подавляет их активность [48]. Результаты наших исследований свидетельствуют о по крайней мере частичном вовлечении фактора транскрипции NF- κ B в механизм усиления GR-опосредованной транс-репрессии. Однако детальный механизм взаимодействия между рапамицином и глюкокортикоидами в процессе транс-репрессии необходимо исследовать более подробно.

Противоопухолевый эффект рапамицина, как и GC, подробно описан в литературе. Так, нами и другими исследовательскими группами была продемонстрирована противоопухолевая активность Vара на ряде моделей в доклинических исследованиях [742–744]; эффективность рапамицина в клинических исследованиях не превышала противоопухолевых эффектов препаратов сравнения [745–750]. В целом, использование рапамицина в качестве монотерапии злокачественных новообразований было признано неэффективным [751], что, однако, позволило

высказать предположение о возможной эффективности данного препарата в комбинированной химиотерапии. В частности, была исследована противоопухолевая активность рапамицина в комбинации с цитостатическими препаратами *in vitro* и *in vivo* на моделях острого лимфобластного лейкоза у детей [653]. Функционирование сигнального пути mTOR является одним из основных условий сохранения жизнеспособности клеток злокачественных новообразований кроветворной системы [752, 753]. Более того, активацию mTOR рассматривали как одним из механизмов развития резистентности к GC [754]. Был описан синергический эффект Dex в комбинации с Rapa на широком спектре моделей новообразований лимфатической системы *in vivo* и *in vitro*. Было продемонстрировано, что Rapa усиливает цитотоксичность Dex *in vitro* и противоопухолевый эффект *in vivo* на моделях ксенографтов некоторых новообразований кроветворной системы [755]. Результаты о синергическом цитотоксическом эффекте Rapa и Dex, сопровождающемся развитием апоптоза, полученные в представленной работе, совпадают с результатами данной исследовательской группы. Более того, нами было оценено длительное системное воздействие высоких доз GC на кожную и костную ткань, поскольку одними из основных побочных эффектов GC в клинической практике являются остеопороз, асептический остеонекроз, истечение кожи и образование язв [654, 692, 756]. В наших исследованиях было показано, что REDD1 играет основную роль в развитии атрофии кожной ткани, а применение рапамицина в качестве его ингибитора позволяет, сохраняя терапевтическую активность GC, снизить их побочное атрофогенное действие. При изучении влияния рапамицина на GC-индуцированный остеопороз у мышей не было продемонстрировано значимой разницы между толщиной бедренных костей у контрольной группы животных и экспериментальной группы, получавшей дексаметазон. Однако при исследовании молекулярных маркеров остеопороза было выявлено существенное различие. Так, RANKL - растворимый лиганд RANK, играющий ключевую роль в молекулярной регуляции ремоделирования костной ткани продуцируется остеобластами и активирующими T-лимфоцитами. Он активирует специфический рецептор RANK, который расположен на остеокластах и дендритных клетках. RANKL является основным стимулирующим фактором в образовании зрелых остеокластов [757]. Поэтому увеличение экспрессии RANKL приводит к резорбции костной ткани и, следовательно, к потере костной массы. Остеопротегрин (OPG), также известный как остеокластингибирующий фактор, является ключевым звеном ингибирования дифференциации и активации остеокластов и потому имеет большое значение в процессе резорбции костной ткани. OPG представляет собой гликопротеин, относящийся к семейству рецепторов фактора некроза опухоли. OPG ингибирует связывание RANK и RANK-лиганда, тем самым ингибируя мобилизацию, пролиферацию и активацию остеокластов. Характер ремоделирования костной ткани во многом определяется балансом между продукцией RANKL и OPG. Повышенное соотношение RANKL/OPG ассоциируется со

способностью поддерживать формирование и активацию остеокластов. Повышенное соотношение RANKL/OPG, полученное в наших экспериментах после длительного введения животным Dex, согласовалось с данными литературы [757]. Рапамицин способствовал снижению этого показателя до контрольного уровня.

Таким образом, данные проведенного исследования свидетельствуют о том, что ингибиторы REDD1 представляют собой перспективный класс препаратов для более эффективной и безопасной химиотерапии гематологических новообразований с использованием GC, а использованный нами биоинформатический подход к перепрофилированию на примере рапамицина является эффективным и подходит для дальнейшего поиска препаратов для перепрофилирования при условии известной специфической молекулярной мишени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были охарактеризованы биологические эффекты нового селективного агониста GR, SpdA, и продемонстрировано синергическое противоопухолевое действие SpdA в сочетании с протеасомным ингибитором бортезомибом *in vitro* и *in vivo*. Были разработаны стратегии получения новых SEGRA на основе синтеза химических производных SpdA, его энантиомеров или оптимизации его доставки за счет загрузки в наночастицы. При исследовании биологических свойств полученных соединений, было показано, что энантиомеры SpdA не проявляют различные эффекты в биологических системах. Противоопухолевый эффект оптических изомеров SpdA *in vitro*, а также их влияние на механизмы транс-репрессии и транс-активации были сопоставимы с эффектами GC и исходным рацематом. При исследовании биологических свойств 8 химических производных SpdA для аналога синефрина SpdA-03 было показано, что он обладает аффинностью к GR, сопоставимой с аффинностью SpdA. Эффекты на жизнеспособность клеток, индукцию апоптоза, транс-активацию и транс-реессию были схожи с эффектами GC и SpdA. Другие соединения были эффективны в отношении GR-зависимого антипролиферативного эффекта, однако не обладали всем спектром активности Dex, SpdA и SpdA-03. Противоопухолевая активность SpdA-03 была показана *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей, что позволяет рекомендовать его к доклиническим исследованиям как препарат для терапии гемобластозов. Также был отработан подход к снижению степени развития побочных эффектов GC с помощью ингибирования «генов побочных эффектов». В качестве гена интереса был выбран ген *REDD1*, опосредующий атрофические эффекты GC. Поиск ингибиторов экспрессии *REDD1* был осуществлен биоинформатическими методами. Было идентифицировано 9 ингибиторов *REDD1*, среди которых наиболее активным оказался иммуносупрессор рапамицин. Было показано, что рапамицин подавляет базальную и GC-индуцированную экспрессию *REDD1* в клетках лейкоза и лимфомы. Более того, рапамицин модулирует функциональную активность GR: подавлял транслокацию GR в ядро, снижал степень его фосфорилирования, а также запуск транс-активации, в то время как транс-репрессия была не затронута или даже более выражена, чем при обработке клеток GC индивидуально. При обработке клеток рапамицином и GC наблюдали синергический противоопухолевый эффект *in vitro* и *in vivo*, а также было показано, что рапамицин препятствует истончению кожного покрова у мышей после длительной обработки GC. Таким образом, на примере рапамицина были получены данные, свидетельствующие о перспективности исследования эффектов ингибиторов экспрессии *REDD1* на терапевтические и побочные эффекты GC. Результаты проведенного исследования позволяют сделать выводы, изложенные ниже.

ВЫВОДЫ

1. Селективный агонист глюкокортикоидного рецептора CpдA проявляет противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* на моделях лейкозов и лимфом.
2. Совместное применение CpдA и цитостатических препаратов, узкобороздочных лигандов и ингибиторов У, вызывает кооперативные противоопухолевые эффекты *in vitro* на клетках геобластозов. При сочетании ингибитора протеасом бортезомиба с CpдA наблюдали синергический противоопухолевый эффект *in vitro* и *in vivo*.
3. R- и S-энантиомеры хирального соединения CpдA, являются селективными агонистами GR, действующими преимущественно по механизму активации транс-репрессии, причем их противоопухолевые эффекты *in vitro*, а также влияние на запуск транс-репрессии и транс-активации сопоставимы с действием рацемической смеси.
4. Среди производных CpдA соединение CpдA-03 обладает наиболее высокой аффинностью к глюкокортикоидному рецептору, сопоставимой с аффинностью исходного соединения, и проявляет наиболее выраженное противоопухолевое действие на моделях гемобластозов *in vitro* и *in vivo*.
5. Противоопухолевый и проапоптотический эффекты ряда новосинтезированных химических производных CpдA преимущественно опосредованы активацией глюкокортикоидного рецептора по механизму транс-репрессии.
6. 9 зарегистрированных лекарственных препаратов, отобранных в качестве потенциальных ингибиторов экспрессии *REDD1* с помощью биоинформатического скрининга, подавляют как базальную, так и GC-индуцированную экспрессию *REDD1*, из которых наиболее активным является рапамицин.
7. Рапамицин влияет на функциональную активность GR, снижая GC-индуцированное фосфорилирование GR по остатку Ser211 и GC-зависимую транслокацию GR в ядро, а также подавляя запуск GC-индуцированной транс-активации; при этом степень запуска транс-репрессии либо не изменяется, либо усиливается.
8. Рапамицин в комбинации с дексаметазоном обладает синергическим противоопухолевым эффектом *in vitro* и *in vivo*, а также снижает степень атрофии кожного покрова и костной ткани, развивающуюся при длительном применении GC *in vivo*.
9. Модулирование функций GR при развитии гемобластозов позволяет провести диссоциацию терапевтических и побочных эффектов на основе селективной активации механизма транс-репрессии путем использования препаратов класса SEGRA или на основе избирательного ингибирования транс-активации путем подавления экспрессии его эфферентных генов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 4E-BP1 – белок 1, связывающий фактор инициации 4E у эукариот
- ABVD – адриамицин, блеомицин, винбластин и дакарбазин
- ACTH – адренкортикотропный гормон
- AhR – рецептор ароматических углеводородов (aryl hydrocarbon receptor)
- AIA – антиген-индуцированный артрит (antigen-induced arthritis)
- ALK – тирозинкиназа анапластической лимфомы
- AMACR – альфа-металацилКоА-рацемеза (alpha-methylacylCoA-racemase)
- AMP – аденозиннуклеотидмонофосфат
- AP-1 – активаторный белок 1
- AR – андрогеновый рецептор
- Arg – аргиназа (arginase)
- ARMCX3 – белок 3, содержащий повтор Armadillo и связанный с X-хромосомой (Armadillo Repeat Containing X-Linked 3)
- ASNS – аспарагинсинтетаза (asparagine synthetase)
- ATF4 – фактор активации транскрипции 4 (activating transcription factor 4)
- BCRP/ABCG2 – белки резистентности, характерные для РМЖ (breast cancer resistant proteins)
- BER – эксцизионная репарация оснований (base excision repair)
- BZ – бортезомиб
- cAMP – циклический AMP (cyclic AMP)
- CBG – кортикостероид-связывающий глобулин
- CBP – клобетазол пропионат
- CCLE – база данных Cancer Cell Line Encyclopedia
- CCND1 – циклин D1
- CCND2 – циклин D2
- CdK – циклин-зависимая киназа (cyclin-dependent kinase)
- C/EBP α – ССАТ/энхансер-связывающий белок α (ССАТ/enhancer-binding protein α)
- CFZ – карфилзомиб
- CHK – чекпойнт-киназа
- CI – комбинационный индекс (combination index)
- CIA – коллаген-индуцированный артрит (collagen-induced arthritis)
- cIAP – клеточные ингибиторы апоптоза
- CKI – казеиновая киназа I
- CMV – цитомегаловирус

CO – кротоновое масло

COX-2 – циклооксигеназа 2

SpdA – 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид

CREB – респонсивные элементы для связывания циклического АМР (cyclic AMP response element binding protein)

CRH – кортикотропин-рилизинг-гормон, кортиколиберин (corticotropin-releasing hormone)

CXCL6 – лиганд 6 хемокина с С-Х-С мотивами (С-Х-С Motif Chemokine Ligand 6)

CYP – цитохром Р450

CYP11B1 – цитохром Р450-зависимой 11 β -гидроксилаза

Дех – дексаметазон

ДНТ – дигидротестостерон

DKK1 – Dickkopf1

Доx – доксорубицин

DUSP1 – белковая фосфатаза 1 двойной специфичности (dual specificity protein phosphatase 1, МКР-1)

ЕАЕ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (experimental autoimmune encephalomyelitis)

ЕАН – экспериментальный аутоиммунный неврит (experimental autoimmune neuritis)

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

EGFR – эпидермальный фактор роста (Epidermal growth factor)

Еме – эметин

ER – эстрогеновый рецептор

ERR α – эстроген-зависимый рецептор α (estrogen-related receptor α)

FA – флуоцинолона ацетонид

FDA – управление по контролю за продуктами и лекарствами США (Food and drug administration)

FH – фумараза/фумаратгидратаза (Fumarate hydratase)

FKBP51 – белок 51, связывающий FK506 (FK506 binding protein)

FLIP – потеря флуоресценции в результате лазерного отбеливания (Fluorescence loss in photobleaching)

FRAP – восстановление флуоресценции после фотоотбеливания (Fluorescence recovery after photobleaching)

FRET – флуоресцентный индуктивно-резонансный перенос энергии (Fluorescence resonance energy transfer)

G6P – глюкоз-6-фосфатаза (Glucose-6-phosphatase)

GABP – белки, связывающие ГА-участки (GA-binding protein)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
GC – глюкокортикоид
GFP – зеленый флуоресцентный белок
GGT – γ -глутамилтрансфераза (γ -Glutamyltransferase)
GILZ – глюкокортикоид-индуцируемая «лейциновая молния» (Glucocorticoid-induced leucine zipper)
GITR – GC-индуцируемый рецептор фактора некроза опухоли (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor, TNFRSF18)
GITRL – GITR-специфичный лиганд
GLS – глутаминаза (Glutaminase)
GR – глюкокортикоидный рецептор
GRE – глюкокортикоид-респонсивные элементы (Glucocorticoid-responsive element)
GSH – глутатион (Glutathione)
GST – глутатион-S-трансфераза (Glutathione S-transferase)
GTEx – база данных Genotype-Tissue Expression
HCS – гидрокортизон
HDAC – гистоновая деацетилаза
HDL NP – наночастиц из липопротеинов высокой плотности (High density lipoprotein nanoparticles)
HH – сигнальный путь Hedgehog
HIF1 α – фактор, индуцируемого гипоксией 1 α (Hypoxia induced factor 1 α)
HPA – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis)
11b-HSD – 11b-гидроксистероид дегидрогеназа (11b-hydroxysteroid dehydrogenase)
HSP – белки теплового шока (Heat shock protein)
HTS – метод высокопроизводительного скрининга
IFN – интерферон
IGF – инсулин-подобный фактор роста (Insulin-like growth factor)
IGFBP1 – белок 1, связывающий инсулиноподобный фактор роста (Insulin-like growth factor binding protein 1)
IL – интерлейкин
iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота (Inducible nitric oxide synthase)
IXZ – иксазомиб
KLF9 – Kruppel-подобный фактор 9 (Kruppel like factor 9)
KRT1 – кератин
Leva – левамизол

LPS – липополисахарид
 MDR – множественная лекарственная устойчивость (Multidrug resistance)
 MDSC – супрессоры миелоидного происхождения (Myeloid-derived suppressor cells)
 Met – метронидазол
 mGR – мембрано-связанный GR
 MHC – главный комплекс гистосовместимости (Major histocompatibility complex)
 Mito – митоксантрон
 MM – множественная миелома
 MMP – матриксные металлопротеиназы
 MMR – репарация мисмэтчей (Mismatch repair)
 MRP1/ ABCB1 – белок 1, связанный с множественной устойчивостью (Multidrug resistance associated protein-1)
 MTS – (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолиум
 MTT – 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ел)-2,5-дифенилтетразолиум бромид
 NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-Н
 NER – эксцизионная репарация нуклеотидов (Nucleotide excision repair)
 NGF – фактор роста нервов (Nerve growth factor receptor)
 Net – нетропсин
 NF-κB – ядерный фактор каппа В
 NFE2L1 – ядерный фактор 1, подобный эритроидному 2 (Nuclear factor, erythroid 2 like 1)
 nGRE – негативные глюкокортикоид-респонсивные элементы
 NGS – полногеномное секвенирование нового поколения (Next generation sequencing)
 НК-клетки – клетки-натуральные киллеры
 NURSA – атлас сигнальных путей ядерных рецепторов (Nuclear receptor signaling atlas)
 PARP – полимераза поли(АДФ-рибозы)
 PBS – фосфорно-солевой буфер
 PDGF – тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived growth factor)
 Pent – пентамидин
 PEPCK – фосфоенолпируват карбоксикиназа (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)
 P-gp/ABCB1 – Р-гликопротеин
 PHGDH – фосфоглицератдегидрогеназы (Phosphoglycerate dehydrogenase)
 Phys – физостигмин
 PI – йодистый пропидий
 PKM2 – пируваткиназа M2 (Pyruvate kinase M2)

PNMT – фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза (Phenylethanolamine N-methyltransferase)

PPP – пентозо-фосфатный путь (Pentose phosphate pathway)

Pred – преднизолон

PSA – простатический специфический антиген

PTCH – трансмембранный рецептор Patched

Rapa – рапамицин

REDD1 – белок 1, регулируемый при развитии и повреждении ДНК (Regulated in development and DNA damage response 1)

ROS – активные формы кислорода (Reactive oxygen species)

Rpl27 – рибосомальный белок L27

RpS6 – рибосомный белок S6

SDH – сукцинатдегидрогеназа (Succinate dehydrogenase)

SDS – натрий додецилсульфат

SEGRA – селективный агонист глюкокортикоидного рецептора

SGK1 – сывороточная глюкокортикоид-индуцируемая киназа 1 (Serum glucocorticoid-induced kinase 1)

shGR – короткая шпилечная РНК (short hairpin) к гену GR

SMO – трансмембранный рецептор Smoothened

SREBP – белки, связывающиеся со стерол-регуляторными элементами (Sterol regulatory element binding proteins)

STAT – белки из семейства передачи сигнала и активации транскрипции (Signal transducer and activator of transcription)

TAM – макрофаги, ассоциированные с опухолью (Tumor-associated macrophages)

TAN – нейтрофилы, ассоциированные с опухолью (Tumor-associated neutrophils)

TAT – тирозин-аминотрансфераза (Tyrosine amino-transferase)

TGF β – трансформирующий фактор роста β (Transforming growth factor β)

Th – Т-хелперы

TNF α – фактор некроза опухоли α

Top1 – топоизомераза 1

TPA – 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат

Trab – трабектедин

Treg – Т-супрессоры

TSC – комплекс туберозного склероза (Tuberous sclerosis complex)

Tsp-1 – тромбоспондин-1

uGR – не связанный с лигандом GR (unliganded GR)

VEGF – фактор роста сосудов (Vascular-endothelial growth factor)
Vinc – винкристин
VPA – депакин или вальпроевая кислота (Valproic acid)
ZO – белки плотных контактов Zonula Occludens
мРНК – матричная РНК
ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО – диметилсульфоксид
ДМФА – диметилформамид
ДТТ – дитиотрейтол
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
ИГ – инфантильная гемангиома
МАИР – международное агентство по изучению рака
МКРЛ – мелкоклеточный рак легких
НМКРЛ – немелкоклеточный рак легких
НПВС – нестероидные противовоспалительные средства
ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ – острый миелолейкоз
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЭГ – полиэтиленгликоль
РЛ – рак легких
РМЖ – рак молочной железы
РШМ – рак шейки матки
РЯ – рак яичников
ТСХ – тонкослойная хроматография
УБЛ – узкобороздочные лиганды
УПС – убиквитин-протеасомная система
ХЛЛ – хронический лимфолейкоз
ХМЛ – хронический миелолейкоз
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
ЦНС – центральная нервная система
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lesovaya, E. Combination of a selective activator of the glucocorticoid receptor Compound A with a proteasome inhibitor as a novel strategy for chemotherapy of hematologic malignancies. / E. Lesovaya, A. Yemelyanov, K. Kirsanov, A. Popa, G. Belitsky, M. Yakubovskaya, L.I. Gordon, S.T. Rosen, I. Budunova. // *Cell cycle*. – 2013. – V. 12 – N 1 – P.133–44.
2. Miller, W.L. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. / W.L. Miller, R.J. Auchus. // *Endocrine reviews* – 2011. – V. 32 – N 1 – P.81–151.
3. Webster, J.I. Neuroendocrine regulation of immunity. / J.I. Webster, L. Tonelli, E.M. Sternberg. // *Annual review of immunology* – 2002. – V. 20 – P.125–63.
4. John, C.D. Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. / C.D. John, J.C. Buckingham. // *Current opinion in pharmacology* – 2003. – V. 3 – N 1 – P.78–84.
5. Breuner, C.W. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. / C.W. Breuner, M. Orchinik. // *The Journal of endocrinology* – 2002. – V. 175 – N 1 – P.99–112.
6. Cooper, M.S. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation. / M.S. Cooper, P.M. Stewart. // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* – 2009. – V. 94 – N 12 – P.4645–54.
7. Stegk, J.P. Expression profiles of human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases type 1 and type 2 in inflammatory bowel diseases. / J.P. Stegk, B. Ebert, H.-J. Martin, E. Maser. // *Molecular and cellular endocrinology* – 2009. – V. 301 – N 1–2 – P.104–8.
8. Gross, K.L. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. / K.L. Gross, N.Z. Lu, J.A. Cidlowski. // *Molecular and cellular endocrinology* – 2009. – V. 300 – N 1–2 – P.7–16.
9. Kumar, R. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. / R. Kumar, E.B. Thompson. // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* – 2005. – V. 94 – N 5 – P.383–94.
10. Cain, D.W. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. / D.W. Cain, J.A. Cidlowski. // *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* – 2015. – V. 29 – N 4 – P.545–56.
11. Jenkins, B.D. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. / B.D. Jenkins, C.B. Pullen, B.D. Darimont. // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* – 2001. – V. 12 – N 3 – P.122–6.
12. Uhlenhaut, N.H. Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cistromes. / N.H. Uhlenhaut, G.D. Barish, R.T. Yu, M. Downes, M. Karunasiri, C. Liddle, P. Schwalie, N. Hübner, R.M. Evans. // *Molecular cell* – 2013. – V. 49 – N 1

– P.158–71.

13. Granner, D.K. Regulatory Actions of Glucocorticoid Hormones: From Organisms to Mechanisms. / D.K. Granner, J.-C. Wang, K.R. Yamamoto. // *Advances in experimental medicine and biology* – 2015. – V. 872 – P.3–31.

14. So, A.Y.-L. Conservation analysis predicts in vivo occupancy of glucocorticoid receptor-binding sequences at glucocorticoid-induced genes. / A. Y.-L. So, S.B. Cooper, B.J. Feldman, M. Manuchehri, K.R. Yamamoto. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2008. – V. 105 – N 15 – P.5745–9.

15. Diamond, M.I. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. / M.I. Diamond, J.N. Miner, S.K. Yoshinaga, K.R. Yamamoto. // *Science*. – 1990. – V. 249 – N 4974 – P.1266–72.

16. Bosscher, K. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. / K. de Bosscher, W. Vanden Berghe, G. Haegeman. // *Endocrine reviews* – 2003. – V. 24 – N 4 – P.488–522.

17. Starick, S.R. ChIP-exo signal associated with DNA-binding motifs provides insight into the genomic binding of the glucocorticoid receptor and cooperating transcription factors. / S.R. Starick, J. Ibn-Salem, M. Jurk, C. Hernandez, M.I. Love, H.-R. Chung, M. Vingron, M. Thomas-Chollier, S.H. Meijnsing. // *Genome research* – 2015. – V. 25 – N 6 – P.825–35.

18. Ratman, D. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. / D. Ratman, W. Vanden Berghe, L. Dejager, C. Libert, J. Tavernier, I.M. Beck, K. de Bosscher. // *Molecular and cellular endocrinology* – 2013. – V. 380 – N 1–2 – P.41–54.

19. Surjit, M. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. / M. Surjit, K.P. Ganti, A. Mukherji, T. Ye, G. Hua, D. Metzger, M. Li, P. Chambon. // *Cell* – 2011. – V. 145 – N 2 – P.224–41.

20. Bartholome, B. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. / B. Bartholome, C.M. Spies, T. Gaber, S. Schuchmann, T. Berki, D. Kunkel, M. Bienert, A. Radbruch, G.-R. Burmester, R. Lauster, A. Scheffold, F. Buttgerit. // *FASEB journal*. – 2004. – V. 18 – N 1 – P.70–80.

21. Buttgerit, F. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. / F. Buttgerit, A. Scheffold. // *Steroids* – 2002. – V. 67 – N 6 – P.529–34.

22. Brink, M. The unliganded glucocorticoid receptor is localized in the nucleus, not in the cytoplasm. / M. Brink, B.M. Humbel, E.R. Kloet, R. Driel. // *Endocrinology* – 1992. – V. 130 – N 6 – P.3575–81.

23. John, S. Chromatin accessibility pre-determines glucocorticoid receptor binding patterns. /

S. John, P.J. Sabo, R.E. Thurman, M.-H. Sung, S.C. Biddie, T.A. Johnson, G.L. Hager, J.A. Stamatoyannopoulos // *Nature genetics* – 2011. – V. 43 – N 3 – P.264–8.

24. Yamamoto, K.R. Building transcriptional regulatory complexes: signals and surfaces. / K.R. Yamamoto, B.D. Darimont, R.L. Wagner, J.A. Iñiguez-Lluhí. // *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* – 1998. – V. 63 – P.587–98.

25. Stahn, C. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. / C. Stahn, F. Buttgerit. // *Nature clinical practice. Rheumatology* – 2008. – V. 4 – N 10 – P.525–33.

26. Jiang, C.-L. The novel strategy of glucocorticoid drug development via targeting nongenomic mechanisms. / C.-L. Jiang, L. Liu, Z. Li, F. Buttgerit. // *Steroids* – 2015. – V. 102 – P.27–31.

27. Sionov, R.V. Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis. / R.V. Sionov, O. Cohen, S. Kfir, Y. Zilberman, E. Yefenof. // *The Journal of experimental medicine* – 2006. – V. 203 – N 1 – P.189–201.

28. Boldizar, F. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. / F. Boldizar, G. Talaber, M. Szabo, D. Bartis, L. Palinkas, P. Nemeth, T. Berki. // *Immunobiology* – 2010. – V. 215 – N 7 – P.521–6.

29. Thomas-Chollier, M. A naturally occurring insertion of a single amino acid rewires transcriptional regulation by glucocorticoid receptor isoforms. / M. Thomas-Chollier, L.C. Watson, S.B. Cooper, M.A. Pufall, J.S. Liu, K. Borzym, M. Vingron, K.R. Yamamoto, S.H. Meijnsing. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2013. – V. 110 – N 44 – P.17826–31.

30. Ritter, H.D. The unliganded glucocorticoid receptor positively regulates the tumor suppressor gene BRCA1 through GABP beta. / H.D. Ritter, L. Antonova, C.R. Mueller. // *Molecular cancer research : MCR* – 2012. – V. 10 – N 4 – P.558–69.

31. Liberman, A.C. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. / A.C. Liberman, J. Druker, M.J. Perone, E. Arzt. // *Cytokine & growth factor reviews* – V. 18 – N 1–2 – P.45–56.

32. Pufall, M.A. Glucocorticoids and Cancer. / M.A. Pufall. // *Advances in experimental medicine and biology* – 2015. – V. 872 – P.315–33.

33. DeVita, V.T. A history of cancer chemotherapy. / V.T. DeVita, E. Chu. // *Cancer research* – 2008. – V. 68 – N 21 – P.8643–53.

34. Smolej, L. The role of high-dose corticosteroids in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. / L. Smolej. // *Expert opinion on investigational drugs* – 2012. – V. 21 – N 7 – P.1009–17.

35. Pavlasova, G. Ibrutinib inhibits CD20 upregulation on CLL B cells mediated by the CXCR4/SDF-1 axis. / G. Pavlasova, M. Borsky, V. Seda, K. Cerna, J. Osickova, M. Doubek, J. Mayer, R. Calogero, M. Trbusek, S. Pospisilova, M.S. Davids, T.J. Kipps, J.R. Brown, M. Mraz. // *Blood* –

2016. – V. 128 – N 12 – P.1609–13.

36. Rajkumar, S.V. Multiple myeloma. / S.V. Rajkumar. // *Current problems in cancer* – V. 33 – N 1 – P.7–64.

37. Rajkumar, S.V. A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. / S.V. Rajkumar, T.E. Witzig. // *Cancer treatment reviews* – 2000. – V. 26 – N 5 – P.351–62.

38. Munshi, N.C. New strategies in the treatment of multiple myeloma. / N.C. Munshi, K.C. Anderson. // *Clinical cancer research*. – 2013. – V. 19 – N 13 – P.3337–44.

39. Grugan, K.D. Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma. / K.D. Grugan, C. Ma, S. Singhal, N.L. Krett, S.T. Rosen. // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* – 2008. – V. 110 – N 3–5 – P.244–54.

40. Raab, M.S. Multiple myeloma. / M.S. Raab, K. Podar, I. Breitkreutz, P.G. Richardson, K.C. Anderson. // *Lancet (London, England)* – 2009. – V. 374 – N 9686 – P.324–39.

41. Chu, C.-C. The cellular mechanisms of the antiemetic action of dexamethasone and related glucocorticoids against vomiting. / C.-C. Chu, C.-H. Hsing, J.-P. Shieh, C.-C. Chien, C.-M. Ho, J.-J. Wang. // *European journal of pharmacology* – 2014. – V. 722 – P.48–54.

42. Zhong, D.T. Etoposide, vincristine, doxorubicin and dexamethasone (EVAD) combination chemotherapy as second-line treatment for advanced AIDS-related Kaposi's sarcoma. / D.T. Zhong, C.M. Shi, Q. Chen, J.Z. Huang, J.G. Liang, D. Lin. // *Journal of cancer research and clinical oncology* – 2012. – V. 138 – N 3 – P.425–30.

43. Herr, I. Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases. / I. Herr, J. Pfitzenmaier. // *The Lancet. Oncology* – 2006. – V. 7 – N 5 – P.425–30.

44. Belova, L. Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age. / L. Belova, B. Delgado, M. Kocherginsky, A. Melhem, O.I. Olopade, S.D. Conzen. // *Breast cancer research and treatment* – 2009. – V. 116 – N 3 – P.441–7.

45. Volden, P.A. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression. / P.A. Volden, S.D. Conzen. // *Brain, behavior, and immunity* – 2013. – V. 30 Suppl – P.S26-31.

46. Kassi, E. Glucocorticoid receptor signaling and prostate cancer. / E. Kassi, P. Moutsatsou. // *Cancer letters* – 2011. – V. 302 – N 1 – P.1–10.

47. Yemelyanov, A. Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate. / A. Yemelyanov, J. Czwarnog, D. Chebotaev, A. Karseladze, E. Kulevitch, X. Yang, I. Budunova. // *Oncogene* – 2007. – V. 26 – N 13 – P.1885–96.

48. Yemelyanov, A. Novel steroid receptor phyto-modulator compound a inhibits growth and

survival of prostate cancer cells. / A. Yemelyanov, J. Czwarnog, L. Gera, S. Joshi, R.T. Chatterton, I. Budunova. // *Cancer research* – 2008. – V. 68 – N 12 – P.4763–73.

49. Cavarretta, I.T. The antiapoptotic effect of IL-6 autocrine loop in a cellular model of advanced prostate cancer is mediated by Mcl-1. / I.T. Cavarretta, H. Neuwirt, G. Untergasser, P.L. Moser, M.H. Zaki, H. Steiner, H. Rumpold, D. Fuchs, A. Hobisch, J.A. Nemeth, Z. Culig. // *Oncogene* – 2007. – V. 26 – N 20 – P.2822–32.

50. Yano, A. Glucocorticoids suppress tumor lymphangiogenesis of prostate cancer cells. / A. Yano, Y. Fujii, A. Iwai, S. Kawakami, Y. Kageyama, K. Kihara. // *Clinical cancer research*. – 2006. – V. 12 – N 20 Pt 1 – P.6012–7.

51. Nishimura, K. Potential mechanism for the effects of dexamethasone on growth of androgen-independent prostate cancer. / K. Nishimura K., N. Nonomura, E. Satoh, Y. Harada, M. Nakayama, T. Tokizane, T. Fukui, Y. Ono, H. Inoue, M. Shin, Y. Tsujimoto, H. Takayama, K. Aozasa, A. Okuyama. // *Journal of the National Cancer Institute* – 2001. – V. 93 – N 22 – P.1739–46.

52. Agarwal, N. New agents for prostate cancer. / N. Agarwal, G. Lorenzo, G. Sonpavde, J. Bellmunt. // *Annals of oncology* – 2014. – V. 25 – N 9 – P.1700–9.

53. Donepudi, M.S. Breast cancer statistics and markers. / M.S. Donepudi, K. Kondapalli, S.J. Amos, P. Venkanteshan. // *Journal of cancer research and therapeutics* – V. 10 – N 3 – P.506–11.

54. Vilasco, M. Glucocorticoid receptor and breast cancer. / M. Vilasco, L. Communal, N. Mourra, A. Courtin, P. Forgez, A. Gompel. // *Breast cancer research and treatment* – 2011. – V. 130 – N 1 – P.1–10.

55. Rutz, H.P. Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. / H.P. Rutz, I. Herr. // *Cancer biology & therapy* – 2004. – V. 3 – N 8 – P.715–8.

56. Yamashita, H. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. / H. Yamashita, Y. Yando, M. Nishio, Z. Zhang, M. Hamaguchi, K. Mita, S. Kobayashi, Y. Fujii, H. Iwase. // *Breast cancer (Tokyo, Japan)* – 2006. – V. 13 – N 1 – P.74–83.

57. Fakih, M. Glucocorticoids and treatment of prostate cancer: a preclinical and clinical review. / M. Fakih, C.S. Johnson, D.L. Trump. // *Urology* – 2002. – V. 60 – N 4 – P.553–61.

58. Rutz, H.P. Effects of corticosteroid use on treatment of solid tumours. / H.P. Rutz. // *Lancet* – 2002. – V. 360 – N 9349 – P.1969–70.

59. Rasmuson, S. Increased glucocorticoid production and altered cortisol metabolism in women with mild to moderate Alzheimer's disease. / S. Rasmuson, R. Andrew, B. Näsman, J.R. Seckl, B.R. Walker, T. Olsson. // *Biological psychiatry* – 2001. – V. 49 – N 6 – P.547–52.

60. Moran, T.J. The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. / T.J. Moran, S. Gray, C.A. Mikosz, S.D. Conzen. // *Cancer research* – 2000. – V. 60 –

N 4 – P.867–72.

61. Jing, D. Opposing regulation of BIM and BCL2 controls glucocorticoid-induced apoptosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia cells. / D. Jing, V.A. Bhadri, D. Beck, J.A.I. Thoms, N.A. Yakob, J.W.H. Wong, K. Knezevic, J.E. Pimanda, R.B. Lock. // *Blood* – 2015. – V. 125 – N 2 – P.273–83.

62. Moutsatsou, P. Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. / P. Moutsatsou, E. Kassi, A.G. Papavassiliou. // *Trends in molecular medicine* – 2012. – V. 18 – N 6 – P.348–59.

63. King, K.L. Cell cycle regulation and apoptosis. / K.L. King, J.A. Cidlowski. // *Annual review of physiology* – 1998. – V. 60 – P.601–17.

64. Crabtree, G.R. Glucocorticoid receptors and in vitro responses to glucocorticoid in acute nonlymphocytic leukemia. / G.R. Crabtree, C.D. Bloomfield, K.A. Smith, R.W. McKenna, B.A. Peterson, L. Hildebrandt, A. Munck. // *Cancer research* – 1981. – V. 41 – N 11 Pt 2 – P.4853–6.

65. Cidlowski, J.A. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. / J.A. Cidlowski, K.L. King, R.B. Evans-Storms, J.W. Montague, C.D. Bortner, F.M. Hughes. // *Recent progress in hormone research* – 1996. – V. 51 – P.457- 90; discussion 490–1.

66. Rogatsky, I. Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. / I. Rogatsky, A.B. Hittelman, D. Pearce, M.J. Garabedian. // *Molecular and cellular biology* – 1999. – V. 19 – N 7 – P.5036–49.

67. Chebotaev, D. The mechanisms of tumor suppressor effect of glucocorticoid receptor in skin. / D. Chebotaev, A. Yemelyanov, I. Budunova. // *Molecular carcinogenesis* – 2007. – V. 46 – N 8 – P.732–40.

68. Thulasi, R. Suppression of c-myc is a critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. / R. Thulasi, D.V. Harbour, E.B. Thompson. // *The Journal of biological chemistry* – 1993. – V. 268 – N 24 – P.18306–12.

69. Lauro, D. Role of Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase (SGK)-1 in Senescence: A Novel Molecular Target Against Age-Related Diseases. / D. Lauro, D. Pastore, B. Capuani, F. Pacifici, R. Palmirotta, P. Abete, M. Roselli, A. Bellia, M. Federici, N. Daniele, P. Sbraccia, F. Guadagni, R. Lauro, D. Della-Morte. // *Current medicinal chemistry* – 2015. – V. 22 – N 33 – P.3765–88.

70. Thompson, E.B. Glucocorticoid antagonist RU 486 reverses agonist-induced apoptosis and c-myc repression in human leukemic CEM-C7 cells. / E.B. Thompson, R. Thulasi, M.F. Saeed, B.H. Johnson. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 1995. – V. 761 – P.261–75.

71. Копнин, Молекулярные механизмы канцерогенеза // Энциклопедия клинической онкологии / гл. ред. М. И. Давыдова. - М., 2004. - С. 34-59.

72. Kim, S. Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. / S. Kim, B.S. Jeon, C. Heo, P.S. Im, T.-B. Ahn, J.-H. Seo, H.-S.

Kim, C.H. Park, S.H. Choi, S.-H. Cho, W.J. Lee, Y.-H. Suh. // *FASEB journal* – 2004. – V. 18 – N 13 – P.1615–7.

73. Amaral, J.D. Role of nuclear steroid receptors in apoptosis. / J.D. Amaral, S. Solá, C.J. Steer, C.M.P. Rodrigues. // *Current medicinal chemistry* – 2009. – V. 16 – N 29 – P.3886–902.

74. Distelhorst, C.W. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. / C.W. Distelhorst. // *Cell death and differentiation* – 2002. – V. 9 – N 1 – P.6–19.

75. Walker, P.R. Relationship between apoptosis and the cell cycle in lymphocytes: roles of protein kinase C, tyrosine phosphorylation, and AP1. / P.R. Walker, J. Kwast-Welfeld, H. Gourdeau, J. Leblanc, W. Neugebauer, M. Sikorska. // *Experimental cell research* – 1993. – V. 207 – N 1 – P.142–51.

76. Ramdas, J. Glucocorticoid-induced apoptosis and regulation of NF-kappaB activity in human leukemic T cells. / J. Ramdas, J.M. Harmon. // *Endocrinology* – 1998. – V. 139 – N 9 – P.3813–21.

77. Reichardt, H.M. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. / H.M. Reichardt, K.H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel, G. Schütz. // *Cell* – 1998. – V. 93 – N 4 – P.531–41.

78. Sasson, R. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. / R. Sasson, K. Tajima, A. Amsterdam. // *Endocrinology* – 2001. – V. 142 – N 2 – P.802–11.

79. Miller, A.L. p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. / A.L. Miller, M.S. Webb, A.J. Copik, Y. Wang, B.H. Johnson, R. Kumar, E.B. Thompson. // *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* – 2005. – V. 19 – N 6 – P.1569–83.

80. Jang, J.H. RU486, a glucocorticoid receptor antagonist, induces apoptosis in U937 human lymphoma cells through reduction in mitochondrial membrane potential and activation of p38 MAPK. / J.H. Jang, S.M. Woo, H.J. Um, E.J. Park, K.-J. Min, T.-J. Lee, S.H. Kim, Y.H. Choi, T.K. Kwon. // *Oncology reports* – 2013. – V. 30 – N 1 – P.506–12.

81. Lu, J. p38-MAP kinase activation followed by BIM induction is essential for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. / J. Lu, B. Quearry, H. Harada. // *FEBS letters* – 2006. – V. 580 – N 14 – P.3539–44.

82. Karabélyos, C. Elevated hepatic glucocorticoid receptor expression during liver regeneration in rats. / C. Karabélyos, O. Dobozy, C. Szalai, K. Klenjánszki, K. Varjú, A. Hadházi, A. Kiss, A.K. Fülöp, B. Madarász, A. Falus. // *Pathology oncology research : POR* – 1999. – V. 5 – N 2 – P.107–9.

83. Sengupta, S. Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors. / S. Sengupta, B. Wasylyk.

// *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2004. – V. 1024 – P.54–71.

84. Mikosz, C.A. Glucocorticoid receptor-mediated protection from apoptosis is associated with induction of the serine/threonine survival kinase gene, *sgk-1*. / C.A. Mikosz, D.R. Brickley, M.S. Sharkey, T.W. Moran, S.D. Conzen. // *The Journal of biological chemistry* – 2001. – V. 276 – N 20 – P.16649–54.

85. Pastore, D. SGK-1 protects kidney cells against apoptosis induced by ceramide and TNF- α . / D. Pastore, D. Della-Morte, A. Coppola, B. Capuani, M.F. Lombardo, F. Pacifici, F. Ferrelli, R. Arriga, C. Mammi, M. Federici, A. Bellia, N. Daniele, M. Tesauro, G. Donadel, D. Noto, P. Sbraccia, G. Sconocchia, D. Lauro. // *Cell death & disease* – 2015. – V. 6 – P.e1890.

86. Ferrelli, F. Serum glucocorticoid inducible kinase (SGK)-1 protects endothelial cells against oxidative stress and apoptosis induced by hyperglycaemia. / F. Ferrelli, D. Pastore, B. Capuani, M.F. Lombardo, M. Blot-Chabaud, A. Coppola, K. Basello, A. Galli, G. Donadel, M. Romano, S. Caratelli, F. Pacifici, R. Arriga, N. Daniele, P. Sbraccia, G. Sconocchia, A. Bellia, M. Tesauro, M. Federici, D. Della-Morte, D. Lauro. // *Acta diabetologica* – 2015. – V. 52 – N 1 – P.55–64.

87. Crochemore, C. Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. / C. Crochemore C., T.M. Michaelidis, D. Fischer, J.-P. Loeffler, O.F.X. Almeida. // *FASEB journal* – 2002. – V. 16 – N 8 – P.761–70.

88. D'Adamio, F. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. / F. D'Adamio, O. Zollo, R. Moraca, E. Ayroldi, S. Bruscoli, A. Bartoli, L. Cannarile, G. Migliorati, C. Riccardi. // *Immunity* – 1997. – V. 7 – N 6 – P.803–12.

89. Ashwell, J.D. Glucocorticoids in T cell development and function*. / J.D. Ashwell, F.W. Lu, M.S. Vacchio. // *Annual review of immunology* – 2000. – V. 18 – P.309–45.

90. Baumann, S. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. / S. Baumann, A. Dostert, N. Novac, A. Bauer, W. Schmid, S.C. Fas, A. Krueger, T. Heinzl., S. Kirchhoff, G. Schütz, P.H. Krammer. // *Blood* – 2005. – V. 106 – N 2 – P.617–25.

91. Mann, C.L. Delineation of the signaling pathways involved in glucocorticoid-induced and spontaneous apoptosis of rat thymocytes. / C.L. Mann, F.M. Hughes, J.A. Cidlowski. // *Endocrinology* – 2000. – V. 141 – N 2 – P.528–38.

92. Herr, I. Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids. / I. Herr, N. Gassler, H. Friess, M.W. Buehler. // *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* – 2007. – V. 12 – N 2 – P.271–91.

93. Herr, I. Glucocorticoid-mediated apoptosis resistance of solid tumors. / I. Herr, M.W. Buehler, J. Mattern. // *Results and problems in cell differentiation* – 2009. – V. 49 – P.191–218.

94. Tissing, W.J.E. Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. / W.J.E. Tissing, J.P.P. Meijerink, M.L. Boer, R. Pieters. // *Leukemia* – 2003. – V. 17 – N 1 – P.17–25.
95. Sprick, M.R. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. / M.R. Sprick, E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M.A. Weigand, H. Walczak. // *The EMBO journal* – 2002. – V. 21 – N 17 – P.4520–30.
96. Tuckermann, J.P. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. / J.P. Tuckermann, A. Kleiman, K.G. McPherson, H.M. Reichardt. // *Critical reviews in clinical laboratory sciences* – 2005. – V. 42 – N 1 – P.71–104.
97. Frankfurt O. Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. / O. Frankfurt, S.T. Rosen. // *Current opinion in oncology* – 2004. – V. 16 – N 6 – P.553–63.
98. Herr, I. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. / I. Herr, E. Ucur, K. Herzer, S. Okouoyo, R. Ridder, P.H. Krammer, M. von Knebel Doeberitz, K.-M. Debatin. // *Cancer research* – 2003. – V. 63 – N 12 – P.3112–20.
99. Bailly-Maitre, B. Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. / B. Bailly-Maitre, S. de Sousa, K. Boulukos, J. Gugenheim, R. Rahmani. // *Cell death and differentiation* – 2001. – V. 8 – N 3 – P.279–88.
100. Messmer, U.K. Glucocorticoids potently block tumour necrosis factor-alpha- and lipopolysaccharide-induced apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells upstream of caspase 3 activation. / U.K. Messmer, G. Winkel, V.A. Briner, J. Pfeilschifter. // *British journal of pharmacology* – 1999. – V. 127 – N 7 – P.1633–40.
101. Crum, R. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. / R. Crum, S. Szabo, J. Folkman // *Science (New York, N.Y.)* – 1985. – V. 230 – N 4732 – P.1375–8.
102. Tokida, Y. Production of two variant laminin forms by endothelial cells and shift of their relative levels by angiostatic steroids. / Y. Tokida, Y. Aratani Y., A. Morita, Y. Kitagawa // *The Journal of biological chemistry* – 1990. – V. 265 – N 30 – P.18123–9.
103. Ingber, D.E. A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. / D.E. Ingber J.A. Madri, J. Folkman // *Endocrinology* – 1986. – V. 119 – N 4 – P.1768–75.
104. Stokes, C.L. Inhibition of microvascular endothelial cell migration by beta-cyclodextrin tetradecasulfate and hydrocortisone. / C.L. Stokes, P.B. Weisz, S.K. Williams, D.A. Lauffenburger // *Microvascular research* – 1990. – V. 40 – N 2 – P.279–84.
105. Alfaro, C. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. / C. Alfaro , M.F.

Sanmamed , M.E. Rodríguez-Ruiz, A. Teijeira, C. Oñate, A. González , M. Ponz , K.A. Schalper, J.L. Pérez-Gracia, I. Melero // *Cancer treatment reviews* – 2017. – V. 60 – P.24–31.

106. Murayi, R. Glucocorticoids in the management of peritumoral brain edema: a review of molecular mechanisms. / R. Murayi, P. Chittiboina // *Child's nervous system* – 2016. – V. 32 – N 12 – P.2293–2302.

107. Czarnecka, A.M. Hormone signaling pathways as treatment targets in renal cell cancer (Review). / A.M. Czarnecka, M. Niedzwiedzka, C. Porta, C. Szczylik // *International journal of oncology* – 2016. – V. 48 – N 6 – P.2221–35.

108. Li, X. Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. / X. Li , L. Jin, Q. Cui, G.-J. Wang, G. Balian // *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* – 2005. – V. 16 – N 1 – P.101–8.

109. Vujosevic, S. Imaging retinal inflammatory biomarkers after intravitreal steroid and anti-VEGF treatment in diabetic macular oedema. / S. Vujosevic, T. Torresin, S. Bini, E. Convento, E. Pilotto, R. Parrozzani, E. Midena // *Acta ophthalmologica* – 2017. – V. 95 – N 5 – P.464–471.

110. Scheinman, R.I. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. / R.I. Scheinman, A. Gualberto, C.M. Jewell, J.A. Cidlowski, A.S. Baldwin // *Molecular and cellular biology* – 1995. – V. 15 – N 2 – P.943–53.

111. Kerachian, M.A. Glucocorticoids in osteonecrosis of the femoral head: a new understanding of the mechanisms of action. / M.A. Kerachian, C. Séguin, E.J. Harvey // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* – 2009. – V. 114 – N 3–5 – P.121–8.

112. Kwon, K.J. Regulation of tissue plasminogen activator/plasminogen activator inhibitor-1 by hydrocortisone in rat primary astrocytes. / K.J. Kwon, K.S. Cho, S.H. Lee, J.N. Kim, S.H. Joo, J.H. Ryu, L.J. Ignarro, S.-H. Han, C.Y. Shin // *Journal of neuroscience research* – 2011. – V. 89 – N 7 – P.1059–69.

113. Wolff, J.E. Dexamethasone reduces vascular density and plasminogen activator activity in 9L rat brain tumors. / J.E. Wolff, C. Guerin, J. Lathera, J. Bressler, R.R. Indurti, H. Brem., G.W. Goldstein // *Brain research* – 1993. – V. 604 – N 1–2 – P.79–85.

114. Chen, W. Expression of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in ameloblastoma. / W. Chen, K. Ouyang, H. Li, Z. Huang, J. Li, J. Wang // *The Journal of craniofacial surgery* – 2009. – V. 20 – N 1 – P.171- 5; discussion 176-7.

115. Kumagai, Y. Coexpression of COX-2 and iNOS in Angiogenesis of Superficial Esophageal Squamous Cell Carcinoma. / Y. Kumagai, J. Sobajima, M. Higashi, T. Ishiguro , M. Fukuchi, K. Ishibashi, E. Mochiki, K. Yakabi, T. Kawano, J. Tamaru, H. Ishida // *International surgery* – 2015. – V. 100 – N 4 – P.733–43.

116. Kurumbail, R.G. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. / R.G. Kurumbail, A.M. Stevens, J.K. Gierse, J.J. McDonald, R.A. Stegeman, J.Y. Pak, D. Gildehaus, J.M. Miyashiro, T.D. Penning, K. Seibert, P.C. Isakson, W.C. Stallings // *Nature* – V. 384 – N 6610 – P.644–8.
117. Vannini, F. The dual role of iNOS in cancer. / F. Vannini, K. Kashfi, N. Nath // *Redox biology* – 2015. – V. 6 – P.334–43.
118. Lee, H. Modulation of IFN-gamma production by TNF-alpha in macrophages from the tumor environment: significance as an angiogenic switch. / H. Lee, S. Baek, S.-J. Soe, S.-N.Pyo // *International immunopharmacology* – 2006. – V. 6 – N 1 – P.71–8.
119. Kodelja, V. Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages. / V. Kodelja, C. Müller, S. Tenorio, C. Schebesch, C.E. Orfanos, S. Goerdts // *Immunobiology* – 1997. – V. 197 – N 5 – P.478–93.
120. Keith, B.D. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. / B.D. Keith // *BMC cancer* – 2008. – V. 8 – P.84.
121. Gorman, A.M. Dexamethasone pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. / A.M. Gorman, U.A. Hirt, S. Orrenius, S. Ceccatelli // *Neuroscience* – 2000. – V. 96 – N 2 – P.417–25.
122. Sui, M. Glucocorticoids interfere with therapeutic efficacy of paclitaxel against human breast and ovarian xenograft tumors. / M. Sui, F. Chen, Z. Chen, W. Fan // *International journal of cancer* – 2006. – V. 119 – N 3 – P.712–7.
123. Benedetti, S. Dexamethasone inhibits the anti-tumor effect of interleukin 4 on rat experimental gliomas. / S. Benedetti, B. Pirola, P.L. Poliani, L. Cajola, B. Pollo, R. Bagnati, L. Magrassi, P. Tunic, G. Finocchiaro // *Gene therapy* – 2003. – V. 10 – N 2 – P.188–92.
124. Rutz, H.P. Dexamethasone-induced radioresistance occurring independent of human papilloma virus gene expression in cervical carcinoma cells. / H.P. Rutz, M. Mariotta, M. von Knebel Doeberitz, R.O. Mirimanoff // *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft*. – 1998. – V. 174 – N 2 – P.71–4.
125. Kamradt, M.C. Inhibition of radiation-induced apoptosis by dexamethasone in cervical carcinoma cell lines depends upon increased HPV E6/E7. / M.C. Kamradt, N. Mohideen, E. Krueger, S. Walter, A.T. Vaughan // *British journal of cancer* – 2000. – V. 82 – N 10 – P.1709–16.
126. Zhang, C. Dexamethasone desensitizes hepatocellular and colorectal tumours toward cytotoxic therapy. / C. Zhang, A. Kolb, J. Mattern, N. Gassler, T. Wenger, K. Herzer, K.-M. Debatin, M. Büchler, H. Friess, W. Rittgen, L. Edler, I. Herr // *Cancer letters* – 2006. – V. 242 – N 1 – P.104–11.
127. Gassler, N. Dexamethasone-induced cisplatin and gemcitabine resistance in lung carcinoma samples treated ex vivo. / N. Gassler, C. Zhang, T. Wenger, P.A. Schnabel, H. Dienemann, K.-M. Debatin, J. Mattern, I. Herr // *British journal of cancer* – 2005. – V. 92 – N 6 – P.1084–8.

128. Zhang, C. Corticosteroid co-treatment induces resistance to chemotherapy in surgical resections, xenografts and established cell lines of pancreatic cancer. / C. Zhang, A. Kolb, P. Büchler, A.C.B. Cato, J. Mattern, W. Rittgen, L. Edler, K.-M. Debatin, M.W. Büchler, H. Friess, I. Herr // *BMC cancer* – 2006. – V. 6 – P.61.
129. Bergman, A.M. Steroids affect collateral sensitivity to gemcitabine of multidrug-resistant human lung cancer cells. / A.M. Bergman, H.M. Pinedo, G.J. Peters // *European journal of pharmacology* – 2001. – V. 416 – N 1–2 – P.19–24.
130. Law, M.E. Glucocorticoids and histone deacetylase inhibitors cooperate to block the invasiveness of basal-like breast cancer cells through novel mechanisms. / M.E. Law, P.E. Corsino, S.C. Jahn, B.J. Davis, S. Chen, B. Patel, K. Pham, J. Lu, B. Sheppard, P. Nørgaard, J. Hong, P. Higgins, J.-S. Kim, H. Luesch, B.K. Law // *Oncogene* – 2013. – V. 32 – N 10 – P.1316–29.
131. Rubenstein, N.M. Glucocorticoid down-regulation of RhoA is required for the steroid-induced organization of the junctional complex and tight junction formation in rat mammary epithelial tumor cells. / N.M. Rubenstein, Y. Guan, P.L. Woo, G.L. Firestone // *The Journal of biological chemistry* – 2003. – V. 278 – N 12 – P.10353–60.
132. Hoevel, T. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. / T. Hoevel, R. Macek, K. Swisshelm, M. Kubbies // *International journal of cancer* – 2004. – V. 108 – N 3 – P.374–83.
133. Saitou, M. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. / M. Saitou, M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, S. Tsukita // *Molecular biology of the cell* – 2000. – V. 11 – N 12 – P.4131–42.
134. Osanai, M. Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. / M. Osanai, M. Murata, N. Nishikiori., H. Chiba, T. Kojima, N. Sawada // *Cancer research* – 2006. – V. 66 – N 18 – P.9125–33.
135. Salvador, E. Glucocorticoids and endothelial cell barrier function. / E. Salvador, S. Shityakov, C. Förster // *Cell and tissue research* – 2014. – V. 355 – N 3 – P.597–605.
136. Kobayashi, K. Prolactin and glucocorticoid signaling induces lactation-specific tight junctions concurrent with β -casein expression in mammary epithelial cells. / K. Kobayashi, Y. Tsugami, K. Matsunaga, S. Oyama, C. Kuki, H. Kumura // *Biochimica et biophysica acta* – 2016. – V. 1863 – N 8 – P.2006–16.
137. D'Souza-Schorey, C. Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. / C. D'Souza-Schorey // *Trends in cell biology* – 2005. – V. 15 – N 1 – P.19–26.
138. Harris, T.J.C. An introduction to adherens junctions: from molecular mechanisms to tissue development and disease. / T.J.C. Harris // *Sub-cellular biochemistry* – 2012. – V. 60 – P.1–5.
139. Berx, G. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. / G. Berx, F. van

Roy // Cold Spring Harbor perspectives in biology – 2009. – V. 1 – N 6 – P.a003129.

140. Tinkle, C.L. New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity. / C.L. Tinkle, H.A. Pasolli, N. Stokes, E. Fuchs // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2008. – V. 105 – N 40 – P.15405–10.

141. Shook, D. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. / D. Shook, R. Keller // Mechanisms of development – 2003. – V. 120 – N 11 – P.1351–83.

142. Wheelock, M.J. Cadherin switching. / M.J. Wheelock, Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto, K.R. Johnson // Journal of cell science – 2008. – V. 121 – N Pt 6 – P.727–35.

143. Hult, J. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. / J. Hult, K. Suyama, S. Chung, R. Keren, G. Agiostratidou, W. Shan, X. Dong, T.M. Williams, M.P. Lisanti, K. Knudsen, R.B. Hazan // Cancer research – 2007. – V. 67 – N 7 – P.3106–16.

144. Knudsen, K.A. Effect of N-cadherin misexpression by the mammary epithelium in mice. / K.A. Knudsen, C. Sauer, K.R. Johnson, M.J. Wheelock // Journal of cellular biochemistry – 2005. – V. 95 – N 6 – P.1093–107.

145. Aaltomaa, S. Alpha-catenin expression has prognostic value in local and locally advanced prostate cancer. / S. Aaltomaa, P. Lipponen, M. Ala-Opas, M. Eskelinen, V.M. Kosma // British journal of cancer – 1999. – V. 80 – N 3–4 – P.477–82.

146. Kadowaki, T. E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer. / T. Kadowaki, H. Shiozaki, M. Inoue, S. Tamura, H. Oka, Y. Doki, K. Iihara, S. Matsui, T. Iwazawa, A. Nagafuchi // Cancer research – 1994. – V. 54 – N 1 – P.291–6.

147. Nakanishi, Y. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic significance: immunohistochemical analysis of 96 lesions. / Y. Nakanishi, A. Ochiai, S. Akimoto, H. Kato, H. Watanabe, Y. Tachimori, S. Yamamoto, S. Hirohashi // Oncology – V. 54 – N 2 – P.158–65.

148. Richmond, P.J. Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. / P.J. Richmond, A.J. Karayiannakis, A. Nagafuchi, A.V. Kaisary, M. Pignatelli // Cancer research – 1997. – V. 57 – N 15 – P.3189–93.

149. Setoyama, T. alpha-catenin is a significant prognostic factor than E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. / T. Setoyama, S. Natsugoe, H. Okumura, M. Matsumoto, Y. Uchikado, N. Yokomakura, S. Ishigami, T. Aikou // Journal of surgical oncology – 2007. – V. 95 – N 2 – P.148–55.

150. Oort, I.M. The prognostic value of E-cadherin and the cadherin-associated molecules alpha-, beta-, gamma-catenin and p120ctn in prostate cancer specific survival: a long-term follow-up study. / I.M. van Oort, K. Tomita, A. van Bokhoven, M.J.G. Bussemakers, L.A. Kiemeny L.A., H.F.M.

Karthaus, J.A. Witjes, J.A. Schalken // *The Prostate* – 2007. – V. 67 – N 13 – P.1432–8.

151. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. / H. Clevers // *Cell* – 2006. – V. 127 – N 3 – P.469–80.

152. Wend, P. Wnt/ β -catenin activity is essential to turn the epigenetic state to “ON” in salivary gland stem cells to create cancer stem cells. / P. Wend, C. Loddenkemper, V. Brinkmann, K. Eckert, M.M. Taketo, M. Kahn, W. Birchmeier, U. Ziebold // *Journal of stem cells & regenerative medicine* – 2010. – V. 6 – N 2 – P.134.

153. Liu, L. Dexamethasone mediates pancreatic cancer progression by glucocorticoid receptor, TGF β and JNK/AP-1. / L. Liu, E. Aleksandrowicz E., F. Schönsiegel F., D. Gröner D., N. Bauer N., C.C. Nwaeburu C.C., Z. Zhao Z., J. Gladkich J., T. Hoppe-Tichy T., E. Yefenof E., T. Hackert T., O. Strobel O., I. Herr I. // *Cell death & disease* – 2017. – V. 8 – N 10 – P.e3064.

154. Sasson, R. Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: protection of ovarian follicular cells against apoptosis. / R. Sasson, V. Shinder, A. Dantes, A. Land, A. Amsterdam // *Biochemical and biophysical research communications* – 2003. – V. 311 – N 4 – P.1047–56.

155. Stojadinovic, O. Glucocorticoid receptor localizes to adherens junctions at the plasma membrane of keratinocytes. / O. Stojadinovic O., A. Sawaya A., I. Pastar I., M. Tomic-Canic M. // *PloS one* – 2013. – V. 8 – N 4 – P.e63453.

156. Wang, K. SGK1-dependent intestinal tumor growth in APC-deficient mice. / K. Wang K., S. Gu S., O. Nasir O., M. Föller M., T.F. Ackermann T.F., K. Klingel K., R. Kandolf R., D. Kuhl D., C. Stournaras C., F. Lang F. // *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* – 2010. – V. 25 – N 2–3 – P.271–8.

157. Mulholland, P.J. A 24 h corticosterone exposure exacerbates excitotoxic insult in rat hippocampal slice cultures independently of glucocorticoid receptor activation or protein synthesis. / P.J. Mulholland, R.L. Self, A.K. Hensley, H.J. Little J.M. Littleton, M.A. Prendergast // *Brain research* – 2006. – V. 1082 – N 1 – P.165–72.

158. Juszczak, G.R. Glucocorticoids, genes and brain function. / G.R. Juszczak, A.M. Stankiewicz // *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* – 2018. – V. 82 – P.136–168.

159. Schuchmann, S. Modulation of intracellular calcium signaling and mitochondrial function in cultured osteoblastic cells by dexamethasone and celecoxib during mechanical stimulation. / S. Schuchmann, M. Wiontzek, G.R. Burmester, F. Buttgereit // *Clinical and experimental rheumatology* – V. 22 – N 2 – P.184–96.

160. Hinkerohe, D. Dexamethasone differentially regulates functional membrane properties in glioma cell lines and primary astrocytes in vitro. / D. Hinkerohe D., D. Wolfkühler D., A. Haghikia A.,

C. Meier, P.M. Faustmann, U. Schlegel // *Journal of neuro-oncology* – 2011. – V. 103 – N 3 – P.479–89.

161. Ismail, F.S. Dexamethasone and levetiracetam reduce hetero-cellular gap-junctional coupling between F98 glioma cells and glial cells in vitro. / F.S. Ismail, Z. Moinfar, N. Prochnow, H. Dambach, D. Hinkerohe, C.G. Haase, E. Förster, P.M. Faustmann // *Journal of neuro-oncology* – 2017. – V. 131 – N 3 – P.469–476.

162. Swarovsky, B. Coupled induction of exocrine proteins and intracellular compartments involved in the secretory pathway in AR4-2J cells by glucocorticoids. / B. Swarovsky, W. Steinhilber, G.A. Scheele, H.F. Kern // *European journal of cell biology* – 1988. – V. 47 – N 1 – P.101–11.

163. Kwiatkowski, A.P. Comparison of glucocorticoid-mediated changes in the expression and function of rat hepatocyte gap junctional proteins. / A.P. Kwiatkowski, T.K. Baker, J.E. Klaunig // *Carcinogenesis* – 1994. – V. 15 – N 8 – P.1753–7.

164. Ferrand, N. Glucocorticoids induce CCN5/WISP-2 expression and attenuate invasion in oestrogen receptor-negative human breast cancer cells. / N. Ferrand, E. Stragier, G. Redeuilh, M. Sabbah // *The Biochemical journal* – 2012. – V. 447 – N 1 – P.71–9.

165. Yook, J.I. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. / J.I. Yook, X.-Y. Li, I. Ota, C. Hu, H.S. Kim, N.H. Kim N.H., S.Y. Cha, J.K. Ryu, Y.J. Choi, J. Kim, E.R. Fearon, S.J. Weiss // *Nature cell biology* – 2006. – V. 8 – N 12 – P.1398–406.

166. Voutsadakis, I.A. The ubiquitin-proteasome system and signal transduction pathways regulating Epithelial Mesenchymal transition of cancer. / I.A. Voutsadakis // *Journal of biomedical science* – 2012. – V. 19 – P.67.

167. Lee, M.K. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. / M.K. Lee, C. Pardoux, M.C. Hall, P.S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S.M. Smith, R. Derynck // *The EMBO journal* – 2007. – V. 26 – N 17 – P.3957–67.

168. Ozdamar, B. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. / B. Ozdamar, R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H.-R. Wang, Y. Zhang, J.L. Wrana // *Science* – 2005. – V. 307 – N 5715 – P.1603–9.

169. Larue, L. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. / L. Larue, A. Bellacosa // *Oncogene* – 2005. – V. 24 – N 50 – P.7443–54.

170. Zhang, L. Glucocorticoid induces mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration. / L. Zhang, W. Lei, X. Wang, Y. Tang, J. Song. // *FEBS letters* – 2010. – V. 584 – N 22 – P.4646–54.

171. Miranda, T.B. Reprogramming the chromatin landscape: interplay of the estrogen and glucocorticoid receptors at the genomic level. / T.B. Miranda, T.C. Voss, M.-H. Sung, S. Baek S., S.

John, M. Hawkins, L. Grøntved, R.L. Schiltz , G.L. Hager // *Cancer research* – 2013. – V. 73 – N 16 – P.5130–9.

172. Buxant, F. Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer. / F. Buxant F., C. Engohan-Aloghe C., J.-C. Noël J.-C. // *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* – 2010. – V. 18 – N 3 – P.254–7.

173. Avila, J. Opposite expression pattern of the human Na,K-ATPase beta 1 isoform in stomach and colon adenocarcinomas. / J. Avila J., E. Lecuona E., M. Morales M., A. Soriano A., T. Alonso T., P. Martín-Vasallo // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 1997. – V. 834 – P.653–5.

174. Espineda, C.E. Repression of Na,K-ATPase beta1-subunit by the transcription factor snail in carcinoma. / C.E. Espineda , J.H. Chang , J. Twiss , S.A. Rajasekaran , A.K. Rajasekaran // *Molecular biology of the cell* – 2004. – V. 15 – N 3 – P.1364–73.

175. Espineda, C. Analysis of the Na,K-ATPase alpha- and beta-subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. / C. Espineda, D.B. Seligson , W. James Ball ., J. Rao, A. Palotie, S. Horvath, Y. Huang, T. Shi, A.K. Rajasekaran // *Cancer* – 2003. – V. 97 – N 8 – P.1859–68.

176. Huynh, T.P. Glucocorticoids suppress renal cell carcinoma progression by enhancing Na,K-ATPase beta-1 subunit expression. / T.P. Huynh, S.P. Barwe, S.J. Lee, R. McSpadden, O.E. Franco, S.W. Hayward, R. Damoiseaux, S.S. Grubbs, N.J.Petrelli, A.K.Rajasekaran // *PloS one* – 2015. – V. 10 – N 4 – P.e0122442.

177. Cheng, J. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 is upregulated following unilateral ureteral obstruction causing epithelial-mesenchymal transition. / J.Cheng, L.D.Truong, X.Wu, D.Kuhl, F.Lang, J.Du // *Kidney international* – 2010. – V. 78 – N 7 – P.668–78.

178. Niessen, C.M. Molecular components of the adherens junction. / C.M.Niessen, C.J.Gottardi // *Biochimica et biophysica acta* – 2008. – V. 1778 – N 3 – P.562–71.

179. Sheng, W. Versican mediates mesenchymal-epithelial transition. / W. Sheng, G. Wang, D.P. Pierre, J.Wen, Z. Deng, C.-K.A. Wong, D.Y. Lee, B.B. Yang // *Molecular biology of the cell* – 2006. – V. 17 – N 4 – P.2009–20.

180. Guaita, S. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. / S. Guaita, I. Puig, C. Franci, M. Garrido, D. Dominguez, E. Batlle, E. Sancho, S. Dedhar, A.G. Herreros, J. Baulida // *The Journal of biological chemistry* – 2002. – V. 277 – N 42 – P.39209–16.

181. Jin, X. Cancer stem cells and differentiation therapy. / X. Jin, X. Jin, H. Kim // *Tumour biology* – 2017. – V. 39 – N 10 – P.1010428317729933.

182. Tzoneva, G. Recent advances on NOTCH signaling in T-ALL. / G. Tzoneva, A.A. Ferrando // *Current topics in microbiology and immunology* – 2012. – V. 360 – P.163–82.

183. Reya, T. Wnt signalling in stem cells and cancer. / T. Reya, H. Clevers // *Nature* – 2005. – V. 434 – N 7035 – P.843–50.
184. Fetisov, T.I. Alterations in WNT Signaling in Leukemias. / T.I. Fetisov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov., G.A. Belitsky // *Biochemistry. Biokhimiia* – 2018. – V. 83 – N 12 – P.1448–1458.
185. Giannakis, M. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. / M. Giannakis, E. Hodis, X. Jasmine Mu, M. Yamauchi, J. Rosenbluh, K. Cibulskis, G. Saksena, M.S. Lawrence, Z.R. Qian, R. Nishihara, E.M. Allen, W.C. Hahn, S.B. Gabriel, E.S. Lander, G. Getz, S. Ogino, C.S. Fuchs., L.A. Garraway // *Nature genetics* – 2014. – V. 46 – N 12 – P.1264–6.
186. Seshagiri, S. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. / S. Seshagiri, E.W. Stawiski, S. Durinck, Z. Modrusan, E.E. Storm, C.B. Conboy, S. Chaudhuri, Y. Guan, V. Janakiraman, B.S. Jaiswal, J. Guillory, C. Ha, G.J.P. Dijkgraaf, J. Stinson, F. Gnad, M.A. Huntley, J.D. Degenhardt, P.M. Haverty, R. Bourgon, W. Wang, H. Koeppen, R. Gentleman, T.K. Starr, Z. Zhang, D.A. Largaespada, T.D. Wu, F.J. Sauvage // *Nature* – 2012. – V. 488 – N 7413 – P.660–4.
187. Wetering, M. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. / M. van de Wetering, H.E. Francies, J.M. Francis, G. Bounova, F. Iorio, A. Pronk, W. van Houdt, J. van Gorp, A. Taylor-Weiner, L. Kester, A. McLaren-Douglas, J. Blokker, S. Jaksani, S. Bartfeld, R. Volckman, P. van Sluis, V.S.W Li., S. Seepo, C. Sekhar Pedamallu, K. Cibulskis, S.L. Carter, A. McKenna, M.S. Lawrence, L. Lichtenstein, C. Stewart, J. Koster, R. Versteeg, A. van Oudenaarden, J. Saez-Rodriguez, R.G.J. Vries, G. Getz, L. Wessels, M.R. Stratton, U. McDermott, M. Meyerson, M.J. Garnett, H. Clevers // *Cell* – 2015. – V. 161 – N 4 – P.933–45.
188. Hawkes, A.L. A randomised controlled trial of a theory-based intervention to improve sun protective behaviour in adolescents ('you can still be HOT in the shade'): study protocol. / A.L. Hawkes, K. Hamilton, K.M. White, R. McD Young // *BMC cancer* – 2012. – V. 12 – P.1.
189. Wang, L. Somatic mutation as a mechanism of Wnt/ β -catenin pathway activation in CLL. / L. Wang, A.K. Shalek, M. Lawrence, R. Ding, J.T. Gaublot, N. Pochet, P. Stojanov, C. Sougnez, S.A. Shukla, K.E. Stevenson, W. Zhang, J. Wong, Q.L. Sievers, B.T. MacDonald, A.R. Vartanov, N.R. Goldstein, D. Neuberg, X. He, E. Lander, N. Hacohen, A. Regev, G. Getz, J.R. Brown, H. Park, C.J. Wu // *Blood* – 2014. – V. 124 – N 7 – P.1089–98.
190. Reifemberger, J. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. / J. Reifemberger, M. Wolter, C.B. Knobbe, B. Köhler, A. Schönicke, C. Scharwächter, K. Kumar, B. Blaschke, T. Ruzicka, G. Reifemberger // *The British journal of dermatology* – 2005. – V. 152 – N 1 – P.43–51.
191. Rubin, L.L. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. / L.L. Rubin, F.J. de Sauvage // *Nature reviews. Drug discovery* – 2006. – V. 5 – N 12 – P.1026–33.

192. Reifenberger, J. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. / J. Reifenberger, M. Wolter, R.G. Weber, M. Megahed, T. Ruzicka, P. Lichter, G. Reifenberger // *Cancer research* – 1998. – V. 58 – N 9 – P.1798–803.
193. Raffel, C. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. / C. Raffel, R.B. Jenkins, L. Frederick, D. Hebrink, B. Alderete, D.W. Fults, C.D. James // *Cancer research* – 1997. – V. 57 – N 5 – P.842–5.
194. Xie, J. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. / J. Xie, M. Murone, S.M. Luoh, A. Ryan, Q. Gu, C. Zhang, J.M. Bonifas, C.W. Lam, M. Hynes, A. Goddard, A. Rosenthal, E.H. Epstein, F.J. de Sauvage // *Nature* – 1998. – V. 391 – N 6662 – P.90–2.
195. Jones, S. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. / S. Jones, X. Zhang, D.W. Parsons, J.C.-H. Lin, R.J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, H. Kamiyama, A. Jimeno, S.-M. Hong, B. Fu, M.-T. Lin, E.S. Calhoun, M. Kamiyama, K. Walter, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D.R. Smith, M. Hidalgo, S.D. Leach, A.P. Klein, E.M. Jaffee, M. Goggins, A. Maitra, C. Iacobuzio-Donahue, J.R. Eshleman, S.E. Kern, R.H. Hruban, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V.E. Velculescu, K.W. Kinzler // *Science* – 2008. – V. 321 – N 5897 – P.1801–6.
196. Taylor, M.D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. / M.D. Taylor, L. Liu, C. Raffel, C. Hui, T.G. Mainprize, X. Zhang, R. Agatep, S. Chiappa, L. Gao, A. Lowrance, A. Hao, A.M. Goldstein, T. Stavrou, S.W. Scherer, W.T. Dura, B. Wainwright, J.A. Squire, J.T. Rutka, D. Hogg // *Nature genetics* – 2002. – V. 31 – N 3 – P.306–10.
197. Watkins, D.N. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. / D.N. Watkins, D.M. Berman, S.G. Burkholder, B. Wang, P.A. Beachy, Baylin S.B. // *Nature* – 2003. – V. 422 – N 6929 – P.313–7.
198. Yauch, R.L. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. / R.L. Yauch, S.E. Gould, S.J. Scales, T. Tang, H. Tian, C.P. Ahn, D. Marshall, L. Fu, T. Januario, D. Kallop, M. Nannini-Pepe, K. Kotkow, J.C. Marsters, L.L. Rubin, F.J. de Sauvage // *Nature* – 2008. – V. 455 – N 7211 – P.406–10.
199. Theunissen, J.-W. Paracrine Hedgehog signaling in cancer. / J.-W. Theunissen, F.J. de Sauvage // *Cancer research* – 2009. – V. 69 – N 15 – P.6007–10.
200. Jeon, H.-M. Crosstalk between glioma-initiating cells and endothelial cells drives tumor progression. / H.-M. Jeon, S.-H. Kim, X. Jin, J.B. Park, S.H. Kim, K. Joshi, I. Nakano, H. Kim // *Cancer research* – 2014. – V. 74 – N 16 – P.4482–92.
201. Andersson, E.R. Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? / E.R. Andersson, U. Lendahl // *Nature reviews. Drug discovery* – 2014. – V. 13 – N 5 – P.357–78.

202. Robinson, D.R. Functionally recurrent rearrangements of the MAST kinase and Notch gene families in breast cancer. / D.R. Robinson, S. Kalyana-Sundaram, Y.-M. Wu, S. Shankar, X. Cao, B. Ateeq, I.A. Asangani, M. Iyer, C.A. Maher, C.S. Grasso, R.J. Lonigro, M. Quist, J. Siddiqui, R. Mehra, X. Jing, T.J. Giordano, M.S. Sabel, C.G. Kleer, N. Palanisamy, R. Natrajan, M.B. Lambros, J.S. Reis-Filho, C. Kumar-Sinha, A.M. Chinnaiyan // *Nature medicine* – 2011. – V. 17 – N 12 – P.1646–51.

203. Lee, S. Gain-of-function mutations and copy number increases of Notch2 in diffuse large B-cell lymphoma. / S. Lee, K. Kumano, K. Nakazaki, M. Sanada, A. Matsumoto, G. Yamamoto, Y. Nannya, R. Suzuki, S. Ota, Y. Ota, K. Izutsu, M. Sakata-Yanagimoto, A. Hangaishi, H. Yagita, M. Fukayama, M. Seto, M. Kurokawa, S. Ogawa, S. Chiba // *Cancer science* – 2009. – V. 100 – N 5 – P.920–6.

204. Weng, A.P. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. / A.P. Weng, A.A. Ferrando, W. Lee, J.P. Morris, L.B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S.C. Blacklow, A.T. Look, J.C. Aster // *Science* – 2004. – V. 306 – N 5694 – P.269–71.

205. Stephens, P.J. Whole exome sequencing of adenoid cystic carcinoma. / P.J. Stephens, H.R. Davies, Y. Mitani, P. Van Loo, A. Shlien, P.S. Tarpey, E. Papaemmanuil, A. Cheverton, G.R. Bignell, A.P. Butler, J. Gamble, S. Gamble, C. Hardy, J. Hinton, M. Jia, A. Jayakumar, D. Jones, C. Latimer, S. McLaren, D.J. McBride, A. Menzies, L. Mudie, M. Maddison, K. Raine, S. Nik-Zainal, S. O’Meara, J.W. Teague, I. Varela, D.C. Wedge, I. Whitmore, S.M. Lippman, U. McDermott, M.R. Stratton, P.J. Campbell, A.K. El-Naggar, P.A. Futreal // *The Journal of clinical investigation* – 2013. – V. 123 – N 7 – P.2965–8.

206. Stylianou, S. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. / S. Stylianou, R.B. Clarke, K. Brennan // *Cancer research* – 2006. – V. 66 – N 3 – P.1517–25.

207. Kan, Z. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. / Z. Kan, H. Zheng, X. Liu, S. Li, T.D. Barber, Z. Gong, H. Gao, K. Hao, M.D. Willard, J. Xu, R. Hantsche, P.A. Rejto, J. Fernandez, G. Wang, Q. Zhang, B. Wang, R. Chen, J. Wang, N.P. Lee, W. Zhou, Z. Lin, Z. Peng, K. Yi, S. Chen, L. Li, X. Fan, J. Yang, R. Ye, J. Ju, K. Wang, H. Estrella, S. Deng, P. Wei, M. Qiu, I.H. Wulur, J. Liu, M.E. Ehsani, C. Zhang, A. Loboda, W.K. Sung, A. Aggarwal, R.T. Poon, S.T. Fan, J. Wang, J. Hardwick, C. Reinhard, H. Dai, Y. Li, J.M. Luk, M. Mao // *Genome research* – 2013. – V. 23 – N 9 – P.1422–33.

208. Harrison, H. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. / H. Harrison, G. Farnie, S.J. Howell, R.E. Rock, S. Stylianou, K.R. Brennan, N.J. Bundred, R.B. Clarke // *Cancer research* – 2010. – V. 70 – N 2 – P.709–18.

209. Levine, R.L. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. / R.L. Levine, M. Wadleigh, J. Cools, B.L. Ebert, G. Wernig, B.J.P. Huntly, T.J. Boggon, I. Wlodarska, J.J. Clark, S. Moore, J.

Adelsperger, S. Koo, J.C. Lee, S. Gabriel, T. Mercher, A. D'Andrea, S. Fröhling, K. Döhner, P. Marynen, P. Vandenberghe, R.A. Mesa, A. Tefferi, J.D. Griffin, M.J. Eck, W.R. Sellers, M. Meyerson, T.R. Golub, S.J. Lee, Gilliland D.G. // *Cancer cell* – 2005. – V. 7 – N 4 – P.387–97.

210. James, C. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. / C. James, V. Ugo, J.-P. Le Couédic, J. Staerk, F. Delhommeau, C. Lacout, L. Garçon, H. Raslova, R. Berger, A. Bennaceur-Griscelli, J.L. Villeval, S.N. Constantinescu, N. Casadevall, W. Vainchenker // *Nature* – 2005. – V. 434 – N 7037 – P.1144–8.

211. Kralovics, R. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. / R. Kralovics, F. Passamonti, A.S. Buser, S.-S. Teo, R. Tiedt, J.R. Passweg, A. Tichelli, M. Cazzola, R.C. Skoda // *The New England journal of medicine* – 2005. – V. 352 – N 17 – P.1779–90.

212. Pradhan, A. Transformation of hematopoietic cells and activation of JAK2-V617F by IL-27R, a component of a heterodimeric type I cytokine receptor. / A. Pradhan, Q.T. Lambert, G.W. Reuther // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2007. – V. 104 – N 47 – P.18502–7.

213. Malinge, S. Novel activating JAK2 mutation in a patient with Down syndrome and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. / S. Malinge, R. Ben-Abdelali, C. Settegrana, I. Radford-Weiss, M. Debre, K. Beldjord, E.A. Macintyre, J.-L. Villeval, W. Vainchenker, R. Berger, O.A. Bernard, E. Delabesse, V. Penard-Lacronique // *Blood* – 2007. – V. 109 – N 5 – P.2202–4.

214. Walters, D.K. Activating alleles of JAK3 in acute megakaryoblastic leukemia. / D.K. Walters, T. Mercher, T.-L. Gu, T. O'Hare, J.W. Tyner, M. Loriaux, V.L. Goss, K.A. Lee, C.A. Eide, M.J. Wong, E.P. Stoffregen, L. McGreevey, J. Nardone, S.A. Moore, J. Crispino, T.J. Boggon, M.C. Heinrich, M.W. Deininger, R.D. Polakiewicz, D.G. Gilliland, B.J. Druker // *Cancer cell* – 2006. – V. 10 – N 1 – P.65–75.

215. Huang, T.T. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. / T.T. Huang, N. Kudo, M. Yoshida, S. Miyamoto // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2000. – V. 97 – N 3 – P.1014–9.

216. Mayo, M.W. Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. / M.W. Mayo, C.Y. Wang, P.C. Cogswell, K.S. Rogers-Graham, S.W. Lowe, C.J. Der, A.S. Baldwin // *Science (New York, N.Y.)* – 1997. – V. 278 – N 5344 – P.1812–5.

217. Baldwin, A.S. Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- κ B: critical mechanisms in immune function and cancer. / A.S. Baldwin // *Immunological reviews* – 2012. – V. 246 – N 1 – P.327–45.

218. Erez, N. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. / N. Erez, M. Truitt, P. Olson,

S.T. Arron, D. Hanahan // *Cancer cell* – 2010. – V. 17 – N 2 – P.135–47.

219. Koliaraki, V. IKK β in intestinal mesenchymal cells promotes initiation of colitis-associated cancer. / V. Koliaraki, M. Pasparakis, G. Kollias // *The Journal of experimental medicine* – 2015. – V. 212 – N 13 – P.2235–51.

220. Stein, S.J. NF- κ B suppresses ROS levels in BCR-ABL(+) cells to prevent activation of JNK and cell death. / S.J. Stein, A.S. Baldwin // *Oncogene* – 2011. – V. 30 – N 45 – P.4557–66.

221. Huber, M.A. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. / M.A. Huber, N. Azoitei, B. Baumann, S. Grünert, A. Sommer, H. Pehamberger, N. Kraut, H. Beug, T. Wirth // *The Journal of clinical investigation* – 2004. – V. 114 – N 4 – P.569–81.

222. Huang, S. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. / S. Huang, J.B. Robinson, A. Deguzman, C.D. Bucana, I.J. Fidler // *Cancer research* – 2000. – V. 60 – N 19 – P.5334–9.

223. Cooks, T. Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. / T. Cooks, I.S. Pateras, O. Tarcic, H. Solomon, A.J Schetter., S. Wilder, G. Lozano, E. Pikarsky, T. Forshe, N. Rosenfeld, N. Rozenfeld, N. Harpaz, S. Itzkowitz, C.C. Harris, V. Rotter, V.G. Gorgoulis, M. Oren // *Cancer cell* – 2013. – V. 23 – N 5 – P.634–46.

224. Beroukhi, R. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. / R. Beroukhi, C.H. Mermel, D. Porter, M. Meyerson // *Nature* – 2010. – V. 463 – N 7283 – P.899–905.

225. Boehm, J.S. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. / J.S Boehm., J.J. Zhao, J. Yao, S.Y. Kim, R. Firestein, I.F. Dunn, S.K. Sjöstrom, L.A. Garraway, S. Weremowicz, A.L. Richardson, H. Greulich, C.J. Stewart, L.A. Mulvey, R.R. Shen, L. Ambrogio, T. Hirozane-Kishikawa, D.E. Hill, M. Vidal, M. Meyerson, J.K. Grenier, G. Hinkle, D.E. Root, T.M. Roberts, E.S. Lander, K. Polyak, W.C. Hahn // *Cell* – 2007. – V. 129 – N 6 – P.1065–79.

226. Osman, A.M. Glucocorticoid receptors and cell cycle progression in human melanoma cell lines. / A.M. Osman, P.W. Jansen, L.A. Smets, C. Benckhuijsen // *Journal of cellular physiology* – 1985. – V. 125 – N 2 – P.306–12.

227. Lv, W.M. Role of Ras, ERK, and Akt in glucocorticoid-induced differentiation of embryonic rat somatotropes in vitro. / W.M. Lv, Y. Zhao, G. Yang, S.Y. Dong, G.H. Zhang, Y. Zhang, G.Z. Li, Y. Cheng // *Molecular and cellular biochemistry* – 2014. – V. 391 – N 1–2 – P.67–75.

228. Karlan, B.Y. Hormonal regulation of CA125 tumor marker expression in human ovarian carcinoma cells: inhibition by glucocorticoids. / B.Y. Karlan, W. Amin, S.E. Casper, B.A. Littlefield // *Cancer research* – 1988. – V. 48 – N 12 – P.3502–6.

229. Mo, J.-S. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) controls Notch1 signaling

by downregulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase. / J.-S. Mo, E.-J. Ann, J.-H. Yoon, J. Jung, Y.-H. Choi, H.-Y. Kim, J.-S. Ahn, S.-M. Kim, M.-Y. Kim, J.-A. Hong, M.-S. Seo, F. Lang, E.-J. Choi, H.-S. Park // *Journal of cell science* – 2011. – V. 124 – N Pt 1 – P.100–12.

230. Real, P.J. NOTCH inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. / P.J. Real, A.A. Ferrando // *Leukemia* – 2009. – V. 23 – N 8 – P.1374–7.

231. Deftos, M.L. Correlating notch signaling with thymocyte maturation. / M.L. Deftos, Y.W. He, E.W. Ojala, M.J. Bevan // *Immunity* – 1998. – V. 9 – N 6 – P.777–86.

232. Machuca, C. Dexamethasone protection from TNF-alpha-induced cell death in MCF-7 cells requires NF-kappaB and is independent from AKT. / C. Machuca, C. Mendoza-Milla, E. Córdova, S. Mejía, L. Covarrubias, J. Ventura, A. Zentella // *BMC cell biology* – 2006. – V. 7 – P.9.

233. Hadden, M.K. Hedgehog pathway agonism: therapeutic potential and small-molecule development. / M.K. Hadden // *ChemMedChem* – 2014. – V. 9 – N 1 – P.27–37.

234. Anacker, C. Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. / C. Anacker, A. Cattaneo, A. Luoni, K. Musaelyan, P.A. Zunszain, E. Milanesi, J. Rybka, A. Berry, F. Cirulli, S. Thuret, J. Price, M.A. Riva, M. Gennarelli, C.M. Pariante // *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* – 2013. – V. 38 – N 5 – P.872–83.

235. Bengoa-Vergniory, N. Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. / N. Bengoa-Vergniory, R.M. Kypta // *Cellular and molecular life sciences: CMLS* – 2015. – V. 72 – N 21 – P.4157–72.

236. Moors, M. Dickkopf 1 mediates glucocorticoid-induced changes in human neural progenitor cell proliferation and differentiation. / M. Moors, R. Bose, K. Johansson-Haque, K. Edoff, S. Okret, S. Ceccatelli // *Toxicological sciences* – 2012. – V. 125 – N 2 – P.488–95.

237. Kaymaz, B.T. Methylprednisolone induces apoptosis by interacting with the JAK/STAT pathway in HL-60 and K-562 leukemic cells. / B.T. Kaymaz, N. Selvi, G. Saydam, F. Sahin, B. Kosova // *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* – 2012. – V. 17 – N 2 – P.93–9.

238. Roxburgh, C.S.D. Therapeutics targeting innate immune/inflammatory responses through the interleukin-6/JAK/STAT signal transduction pathway in patients with cancer. / C.S.D. Roxburgh, D.C. McMillan // *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine* – 2016. – V. 167 – N 1 – P.61–6.

239. Hager, G.L. Dynamics of gene targeting and chromatin remodelling by nuclear receptors. / G.L. Hager, T.M. Fletcher, N. Xiao, C.T. Baumann, W.G. Müller, J.G. McNally // *Biochemical Society transactions* – 2000. – V. 28 – N 4 – P.405–10.

240. McNally, J.G. The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. / J.G. McNally, W.G. Müller, D. Walker, R. Wolford, G.L. Hager // *Science (New York, N.Y.)* –

2000. – V. 287 – N 5456 – P.1262–5.

241. Perlmann, T. Quantitative analysis of the glucocorticoid receptor-DNA interaction at the mouse mammary tumor virus glucocorticoid response element. / T. Perlmann, P. Eriksson, O. Wrangé // *The Journal of biological chemistry* – 1990. – V. 265 – N 28 – P.17222–9.

242. George, A.A. Dynamic access of the glucocorticoid receptor to response elements in chromatin. / George A.A., Schiltz R.L., Hager G.L. // *The international journal of biochemistry & cell biology* – 2009. – V. 41 – N 1 – P.214–24.

243. Меркулов, В.М. Рецептор глюкокортикоидов: переход из цитоплазмы в клеточное ядро, хроматиновый и внутриядерный шапероновый циклы / В.М. Меркулов, Н.В. Климова, Т.И. Меркулова // *Вавиловский журнал генетики и селекции* – 2015. – V. 19 – N 3 – P.255–263.

244. Picard, D. A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. / D. Picard, S.J. Salser, K.R. Yamamoto // *Cell* – 1988. – V. 54 – N 7 – P.1073–80.

245. Baer, J. Analysis of the DNA-binding affinity, sequence specificity and context dependence of the glucocorticoid receptor zinc finger region. / J. La Baer, K.R. Yamamoto // *Journal of molecular biology* – 1994. – V. 239 – N 5 – P.664–88.

246. Grombacher, T. Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. / T. Grombacher, S. Mitra, B. Kaina // *Carcinogenesis* – 1996. – V. 17 – N 11 – P.2329–36.

247. Meijnsing, S.H. Mechanisms of Glucocorticoid-Regulated Gene Transcription. / S.H. Meijnsing // *Advances in experimental medicine and biology* – 2015. – V. 872 – P.59–81.

248. Ritter, H.D. Expression microarray identifies the unliganded glucocorticoid receptor as a regulator of gene expression in mammary epithelial cells. / H.D. Ritter, C.R. Mueller // *BMC cancer* – 2014. – V. 14 – P.275.

249. Trotter, K.W. Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activation via the BRG1-Dependent Recruitment of TOP2 β and Ku70/86. / K.W. Trotter, H.A. King, T.K. Archer // *Molecular and cellular biology* – 2015. – V. 35 – N 16 – P.2799–817.

250. Akagi, T. Role of glucocorticoid receptor in the regulation of cellular sensitivity to irinotecan hydrochloride. / T. Akagi, T. Fukagawa, Y. Kage, H. To, N. Matsunaga, S. Koyanagi, A. Uchida, A. Fujii, H. Iba, T. Ikemura, H. Aramaki, S. Higuchi, S. Ohdo // *Journal of pharmacological sciences* – 2009. – V. 109 – N 2 – P.265–74.

251. Kuramoto, Y. Circadian regulation of mouse topoisomerase I gene expression by glucocorticoid hormones. / Y. Kuramoto, K. Hata, S. Koyanagi, S. Ohdo, H. Shimeno, S. Soeda // *Biochemical pharmacology* – 2006. – V. 71 – N 8 – P.1155–61.

252. Goodlad, G.A. Glucocorticoid-induced changes in liver: effect of dexamethasone

administration on DNA topoisomerase I and II activities and distribution of histone H1 subtypes. / G.A. Goodlad, C.M. Clark // *Cell biochemistry and function* – 1994. – V. 12 – N 4 – P.247–53.

253. <https://www.nursa.org>.

254. Fang, Y.-Y. Glucocorticoid receptor repression mediated by BRCA1 inactivation in ovarian cancer. / Y.-Y. Fang, D. Li, C. Cao, C.-Y. Li, T.-T. Li // *BMC cancer* – 2014. – V. 14 – P.188.

255. Vilasco, M. Loss of glucocorticoid receptor activation is a hallmark of BRCA1-mutated breast tissue. / M. Vilasco, L. Communal, J. Hugon-Rodin, F. Penault-Llorca, N. Mourra, Z. Wu, P. Forgez, A. Gompel, BRACAPS // *Breast cancer research and treatment* – 2013. – V. 142 – N 2 – P.283–96.

256. Menotta, M. Dexamethasone partially rescues ataxia telangiectasia-mutated (ATM) deficiency in ataxia telangiectasia by promoting a shortened protein variant retaining kinase activity. / M. Menotta, S. Biagiotti, M. Bianchi, L. Chessa, M. Magnani // *The Journal of biological chemistry* – 2012. – V. 287 – N 49 – P.41352–63.

257. Hoijman, E. Glucocorticoid alternative effects on proliferating and differentiated mammary epithelium are associated to opposite regulation of cell-cycle inhibitor expression. / E. Hoijman, L. Rocha-Viegas, S.G. Kalko, N. Rubinstein, M. Morales-Ruiz, E.B. de K. Joffé, E.C. Kordon, A. Pecci // *Journal of cellular physiology* – 2012. – V. 227 – N 4 – P.1721–30.

258. Fojo, A. Multidrug resistance in ovarian cancer. / A. Fojo, T.C. Hamilton, R.C. Young, R.F. Ozols // *Cancer* – 1987. – V. 60 – N 8 Suppl – P.2075–80.

259. Gong, J. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. / J. Gong, R. Jaiswal, J.-M. Mathys, V. Combes, G.E.R. Grau, M. Bebawy // *Cancer treatment reviews* – 2012. – V. 38 – N 3 – P.226–34.

260. Baguley, B.C. Multidrug resistance in cancer. / B.C. Baguley // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* – 2010. – V. 596 – P.1–14.

261. Gottesman, M.M. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. / M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates // *Nature reviews. Cancer* – 2002. – V. 2 – N 1 – P.48–58.

262. Szakács, G. Targeting multidrug resistance in cancer. / G. Szakács, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman // *Nature reviews. Drug discovery* – 2006. – V. 5 – N 3 – P.219–34.

263. Gottesman, M.M. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. / M.M. Gottesman, V. Ling // *FEBS letters* – 2006. – V. 580 – N 4 – P.998–1009.

264. Schinkel, A.H. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. / A.H. Schinkel, J.W. Jonker // *Advanced drug delivery reviews* – 2003. – V. 55 – N 1 – P.3–29.

265. Sarkadi, B. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. / B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakács, A. Váradi // *Physiological reviews* – 2006. – V. 86 – N 4 – P.1179–236.
266. Gillet, J.-P. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. / Gillet J.-P., Efferth T., Remacle J. // *Biochimica et biophysica acta* – 2007. – V. 1775 – N 2 – P.237–62.
267. Giacomini, K.M. International Transporter Consortium Membrane transporters in drug development. / K.M. Giacomini, S.-M. Huang, D.J. Tweedie, L.Z. Benet, K.L.R. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K.M. Hillgren, K.A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R.B. Kim, C.A. Lee, M. Niemi, J.W. Polli, Y. Sugiyama, P.W. Swaan, J.A. Ware, S.H. Wright, S.W. Yee, M.J. Zamek-Gliszczynski, L. Zhang // *Nature reviews. Drug discovery* – 2010. – V. 9 – N 3 – P.215–36.
268. Huang, S. The accumulation and efflux of lead partly depend on ATP-dependent efflux pump-multidrug resistance protein 1 and glutathione in testis Sertoli cells. / S. Huang, J. Ye, J. Yu, L. Chen, L. Zhou, H. Wang, Z. Li, C. Wang // *Toxicology letters* – 2014. – V. 226 – N 3 – P.277–84.
269. Piecuch, A. Yeast ABC proteins involved in multidrug resistance. / A. Piecuch, E. Obłąk // *Cellular & molecular biology letters* – 2014. – V. 19 – N 1 – P.1–22.
270. An, X. Regulation of multidrug resistance by microRNAs in anti-cancer therapy. / X. An, C. Sarmiento, T. Tan, H. Zhu // *Acta pharmaceutica Sinica. B* – 2017. – V. 7 – N 1 – P.38–51.
271. Sodani, K. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. / K. Sodani, A. Patel, R.J. Kathawala, Z.-S. Chen // *Chinese journal of cancer* – 2012. – V. 31 – N 2 – P.58–72.
272. Mao, Q. Role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in drug transport. / Q. Mao, J.D. Unadkat // *The AAPS journal* – 2005. – V. 7 – N 1 – P.E118-33.
273. Sun, Y.-L. Zafirlukast antagonizes ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated multidrug resistance. / Y.-L. Sun, R.J. Kathawala, S. Singh, K. Zheng, T.T. Talele, W.-Q. Jiang, Z.-S. Chen // *Anti-cancer drugs* – 2012. – V. 23 – N 8 – P.865–73.
274. Turzanski, J. Comments on: Multidrug resistance-associated protein (MRP) expression is correlated with expression of aberrant p53 protein in colorectal cancer, Fukushima Y, Oshika Y, Tokunaga T, et al., *Eur J Cancer* 1999, 35, 935-938. Mutant p53 and high expression of / J. Turzanski, Y.M. Zhu, M.J. Pallis, N.H. Russell // *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* – 2000. – V. 36 – N 2 – P.270–2.
275. Fukushima, Y. Multidrug resistance-associated protein (MRP) expression is correlated with expression of aberrant p53 protein in colorectal cancer. / Y. Fukushima, Y. Oshika, T. Tokunaga, H. Hatanaka, M. Tomisawa, K. Kawai, Y. Ozeki, T. Tsuchida, H. Kijima, H. Yamazaki, Y. Ueyama, N. Tamaoki, S. Miura, M. Nakamura // *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* – 1999. – V. 35 – N 6 – P.935–8.
276. Milicevic, Z. Mutant p53 protein expression and antioxidant status deficiency in breast

cancer. / Z. Milicevic, J. Kasapovic, L. Gavrilovic, Z. Milovanovic, V. Bajic, B. Spremo-Potparevic // EXCLI journal – 2014. – V. 13 – P.691–708.

277. Oshika, Y. Multidrug resistance-associated protein and mutant p53 protein expression in non-small cell lung cancer. / Y. Oshika, M. Nakamura, T. Tokunaga, Y. Fukushima, Y. Abe, Y. Ozeki, H. Yamazaki, N. Tamaoki, Y. Ueyama // *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* – 1998. – V. 11 – N 11 – P.1059–63.

278. Dole, M. Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. / M. Dole, G. Nuñez, A.K. Merchant, J. Maybaum, C.K. Rode, C.A. Bloch, V.P. Castle // *Cancer research* – 1994. – V. 54 – N 12 – P.3253–9.

279. Youle, R.J. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. / R.J. Youle, A. Strasser // *Nature reviews. Molecular cell biology* – 2008. – V. 9 – N 1 – P.47–59.

280. Bentires-Alj, M. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. / M. Bentires-Alj, V. Barbu, M. Fillet, A. Chariot, B. Relic, N. Jacobs, J. Gielen, M.-P. Merville, V. Bours // *Oncogene* – 2003. – V. 22 – N 1 – P.90–7.

281. Levine, B. Autophagy in the pathogenesis of disease. / B. Levine, G. Kroemer // *Cell* – 2008. – V. 132 – N 1 – P.27–42.

282. Shintani, T. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. / T. Shintani, D.J. Klionsky // *Science (New York, N.Y.)* – 2004. – V. 306 – N 5698 – P.990–5.

283. Chen, M. The cytoprotective role of gemcitabine-induced autophagy associated with apoptosis inhibition in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. / M. Chen, M. He, Y. Song, L. Chen, P. Xiao, X. Wan, F. Dai, P. Shen // *International journal of molecular medicine* – 2014. – V. 34 – N 1 – P.276–82.

284. Yu, L. Induction of autophagy counteracts the anticancer effect of cisplatin in human esophageal cancer cells with acquired drug resistance. / L. Yu, C. Gu, D. Zhong, L. Shi, Y. Kong, Z. Zhou, S. Liu // *Cancer letters* – 2014. – V. 355 – N 1 – P.34–45.

285. Pan, Y.-Z. Autophagy in drug resistance of the multiple myeloma cell line RPMI8226 to doxorubicin. / Y.-Z. Pan, X. Wang, H. Bai, C.-B. Wang, Q. Zhang, R. Xi // *Genetics and molecular research : GMR* – 2015. – V. 14 – N 2 – P.5621–9.

286. Kumar, A. Targeting autophagy to overcome drug resistance in cancer therapy. / A. Kumar, U.K. Singh, A. Chaudhary // *Future medicinal chemistry* – 2015. – V. 7 – N 12 – P.1535–42.

287. Chen, S. Protective autophagy promotes the resistance of HER2-positive breast cancer cells to lapatinib. / S. Chen, X. Zhu, H. Qiao, M. Ye, X. Lai, S. Yu, L. Ding, A. Wen, J. Zhang // *Tumour biology* – 2016. – V. 37 – N 2 – P.2321–31.

288. O'Donovan, T.R. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. / T.R. O'Donovan,

G.C. O'Sullivan, S.L. McKenna // *Autophagy* – 2011. – V. 7 – N 5 – P.509–24.

289. Henson, E.S. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. / E.S. Henson, S.B. Gibson // *Cellular signalling* – 2006. – V. 18 – N 12 – P.2089–97.

290. Ghadimi, M.P. Targeting the PI3K/mTOR axis, alone and in combination with autophagy blockade, for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors. / M.P. Ghadimi, G. Lopez, K.E. Torres, R. Belousov, E.D. Young, J. Liu, K.J. Brewer, A. Hoffman, K. Lusby, A.J. Lazar, R.E. Pollock, D. Lev // *Molecular cancer therapeutics* – 2012. – V. 11 – N 8 – P.1758–69.

291. Stanton, M.J. Autophagy control by the VEGF-C/NRP-2 axis in cancer and its implication for treatment resistance. / M.J. Stanton, S. Dutta, H. Zhang, N.S. Polavaram, A.A. Leontovich, P. Hönscheid, F.A. Sinicrope, D.J. Tindall, M.H. Muders, K. Datta // *Cancer research* – 2013. – V. 73 – N 1 – P.160–71.

292. Paillas, S. MAPK14/p38 α confers irinotecan resistance to TP53-defective cells by inducing survival autophagy. / S. Paillas, A. Causse, L. Marzi, P. de Medina, M. Poirot, V. Denis, N. Vezzio-Vie, L. Espert, H. Arzouk, A. Coquelle, P. Martineau, M. Del Rio, S. Patingre, C. Gongora // *Autophagy* – 2012. – V. 8 – N 7 – P.1098–112.

293. Hennigan, R.F. The NF2 tumor suppressor regulates microtubule-based vesicle trafficking via a novel Rac, MLK and p38(SAPK) pathway. / R.F. Hennigan, C.A. Moon, L.M. Parysek, K.R. Monk, G. Morfini, S. Berth, S. Brady, N. Ratner // *Oncogene* – 2013. – V. 32 – N 9 – P.1135–43.

294. Kivistö, K.T. The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions. / K.T. Kivistö, H.K. Kroemer, M. Eichelbaum // *British journal of clinical pharmacology* – 1995. – V. 40 – N 6 – P.523–30.

295. Mwinyi, J. Impact of variable CYP genotypes on breast cancer relapse in patients undergoing adjuvant tamoxifen therapy. / J. Mwinyi, K. Vokinger, A. Jetter, U. Breitenstein, C. Hiller, G.A. Kullak-Ublick, A. Trojan // *Cancer chemotherapy and pharmacology* – 2014. – V. 73 – N 6 – P.1181–8.

296. Peters, G.J. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. / G.J. Peters, H.H.J. Backus, S. Freemantle, B. van Triest, G. Codacci-Pisanelli, C.L. van der Wilt, K. Smid, J. Lunec, A.H. Calvert, S. Marsh, H.L. McLeod, E. Bloemena, S. Meijer, G. Jansen, C.J. van Groeningen, H.M. Pinedo // *Biochimica et biophysica acta* – 2002. – V. 1587 – N 2–3 – P.194–205.

297. Nakamura, J. Ribonucleotide reductase subunit M1 assessed by quantitative double-fluorescence immunohistochemistry predicts the efficacy of gemcitabine in biliary tract carcinoma. / J. Nakamura, N. Kohya, K. Kai, K. Ohtaka, K. Hashiguchi, M. Hiraki, Y. Kitajima, O. Tokunaga, H. Noshiro, K. Miyazaki // *International journal of oncology* – 2010. – V. 37 – N 4 – P.845–52.

298. Ganapathi, R.N. Mechanisms regulating resistance to inhibitors of topoisomerase II. / R.N.

Ganapathi, M.K. Ganapathi // *Frontiers in pharmacology* – 2013. – V. 4 – P.89.

299. Nitiss, J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. / J.L. Nitiss // *Nature reviews. Cancer* – 2009. – V. 9 – N 5 – P.338–50.

300. Geng, M. The association between chemosensitivity and Pgp, GST- π and Topo II expression in gastric cancer. / M. Geng, L. Wang, X. Chen, R. Cao, P. Li // *Diagnostic pathology* – 2013. – V. 8 – P.198.

301. Ribic, C.M. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. / C.M. Ribic, D.J. Sargent, M.J.Moore, S.N. Thibodeau, A.J. French, R.M. Goldberg, S.R. Hamilton, P. Laurent-Puig, R.Gryfe, L.E.Shepherd, D.Tu, M.Redston, S.Gallinger // *The New England journal of medicine* – 2003. – V. 349 – N 3 – P.247–57.

302. Acharya, A. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. / A.Acharya, I.Das, D.Chandhok, T.Saha // *Oxidative medicine and cellular longevity* – V. 3 – N 1 – P.23–34.

303. Liu, Y. Cancer drug resistance: redox resetting renders a way. / Y.Liu, Q.Li, L.Zhou, N.Xie, E.C.Nice, H.Zhang, C.Huang, Y.Lei // *Oncotarget* – 2016. – V. 7 – N 27 – P.42740–42761.

304. Traverso, N. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. / N.Traverso, R.Ricciarelli, M.Nitti, B.Marengo, A.L.Furfaro, M.A.Pronzato, U.M.Marinari, C.Domenicotti // *Oxidative medicine and cellular longevity* – 2013. – V. 2013 – P.972913.

305. Ramsay, E.E. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. / E.E.Ramsay, P.J. Dilda // *Frontiers in pharmacology* – 2014. – V. 5 – P.181.

306. Bourgeois, S. Expression of an mdr gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. / S.Bourgeois, D.J.Gruol, R.F.Newby, F.M.Rajah // *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* – 1993. – V. 7 – N 7 – P.840–51.

307. García-Carrasco, M. P-glycoprotein in autoimmune rheumatic diseases. / M.García-Carrasco, C.Mendoza-Pinto, S.Macias Díaz, M.Vera-Recabarren, L.Vázquez de Lara, S.Méndez Martínez, P.Soto-Santillán, R.González-Ramírez, A.Ruiz-Arguelles // *Autoimmunity reviews* – 2015. – V. 14 – N 7 – P.594–600.

308. Régina, A. Dexamethasone regulation of P-glycoprotein activity in an immortalized rat brain endothelial cell line, GPNT. / A.Régina, I.A.Romero, J.Greenwood, P.Adamson, J.M.Bourre, P.O.Couraud F., Roux // *Journal of neurochemistry* – 1999. – V. 73 – N 5 – P.1954–63.

309. Boer, M.L. den Relationship between major vault protein/lung resistance protein, multidrug resistance-associated protein, P-glycoprotein expression, and drug resistance in childhood leukemia. / M.L. den Boer, R.Pieters, K.M.Kazemier, M.M.Rottier, C.M.Zwaan, G.J.Kaspers, G.Janka-Schaub, G.Henze, U.Creutzig, R.J.Scheper, A.J.Veerman // *Blood* – 1998. – V. 91 – N 6 – P.2092–8.

310. Maung, Z.T. Raised intracellular glutathione levels correlate with in vitro resistance to

cytotoxic drugs in leukaemic cells from patients with acute lymphoblastic leukemia. / Z.T.Maung, H L.ogarth, M.M.Reid, S.J.Proctor, P.J.Hamilton, A.G.Hall // *Leukemia* – 1994. – V. 8 – N 9 – P.1487–91.

311. Kearns, P.R. Raised blast glutathione levels are associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. / P.R.Kearns, R.Pieters, M.M.Rottier, A.D.Pearson, A.G.Hall // *Blood* – 2001. – V. 97 – N 2 – P.393–8.

312. Boer, M.L. Den Different expression of glutathione S-transferase alpha, mu and pi in childhood acute lymphoblastic and myeloid leukaemia. / M.L. Den Boer, R.Pieters, K.M.Kazemier, G.E.Janka-Schaub, G.Henze, U.Creutzig, G.J.Kaspers, P.R.Kearns, A.G.Hall, A.D.Pearson, A.J.Veerman // *British journal of haematology* – 1999. – V. 104 – N 2 – P.321–7.

313. Anderer, G. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes and initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukaemia. / G.Anderer, M.Schrapppe, A.M.Brechlin, M.Lauten, P.Muti, K.Welte, M.Stanulla // *Pharmacogenetics* – 2000. – V. 10 – N 8 – P.715–26.

314. Tennant, D.A. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. / Tennant D.A., Durán R. V, Gottlieb E. // *Nature reviews. Cancer* – 2010. – V. 10 – N 4 – P.267–77.

315. Kerr, E.M. Metabolic rewiring in mutant Kras lung cancer. / E.M.Kerr, C.P.Martins // *The FEBS journal* – 2018. – V. 285 – N 1 – P.28–41.

316. Warburg, O. On the origin of cancer cells. / O.Warburg // *Science (New York, N.Y.)* – 1956. – V. 123 – N 3191 – P.309–14.

317. Levine, A.J. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. / A.J.Levine, A.M.Puzio-Kuter // *Science (New York, N.Y.)* – 2010. – V. 330 – N 6009 – P.1340–4.

318. Magda, D. mtDNA depletion confers specific gene expression profiles in human cells grown in culture and in xenograft. / D.Magda, P.Lecane, J.Prescott, P.Thiemann, X.Ma, P.K.Dranchak, D.M.Toleno, K.Ramaswamy, K.D.Siegmund, J.G.Hacia // *BMC genomics* – 2008. – V. 9 – P.521.

319. Wallace, D.C. Mitochondria and cancer. / D.C.Wallace // *Nature reviews. Cancer* – 2012. – V. 12 – N 10 – P.685–98.

320. Whitaker-Menezes, D. Hyperactivation of oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells in situ: visualizing the therapeutic effects of metformin in tumor tissue. / D.Whitaker-Menezes, U.E.Martinez-Outschoorn, N.Flomenberg, R.C.Birbe, A.K.Witkiewicz, A.Howell, S.Pavrides, A.Tsirigos, A.Ertel, R.G.Pestell, P.Broda, C.Minetti, M.P.Lisanti, F.Sotgia // *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* – 2011. – V. 10 – N 23 – P.4047–64.

321. Zu, X.L. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. / X.L.Zu, M.Guppy // *Biochemical and biophysical research communications* – 2004. – V. 313 – N 3 – P.459–65.

322. Dong, G. PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. / G.Dong, Q.Mao,

W.Xia, Y.Xu, J.Wang, L.Xu, F.Jiang // *Oncology letters* – 2016. – V. 11 – N 3 – P.1980–1986.

323. Kroemer, G. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. / G.Kroemer, J.Pouyssegur // *Cancer cell* – 2008. – V. 13 – N 6 – P.472–82.

324. Gatenby, R.A. Why do cancers have high aerobic glycolysis? / R.A.Gatenby, R.J.Gillies // *Nature reviews. Cancer* – 2004. – V. 4 – N 11 – P.891–9.

325. Menendez, J.A. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. / J.A.Menendez, R.Lupu // *Nature reviews. Cancer* – 2007. – V. 7 – N 10 – P.763–77.

326. Ramírez de Molina, A. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. / A.Ramírez de Molina, A.Rodríguez-González, R.Gutiérrez, L.Martínez-Piñeiro, J.Sánchez, F.Bonilla, R.Rosell, J.Lacal // *Biochemical and biophysical research communications* – 2002. – V. 296 – N 3 – P.580–3.

327. Bar-Peled, L. Regulation of mTORC1 by amino acids. / L.Bar-Peled, D.M.Sabatini // *Trends in cell biology* – 2014. – V. 24 – N 7 – P.400–6.

328. Tsun, Z.-Y. Amino acid management in cancer. / Z.-Y.Tsun, R.Possemato // *Seminars in cell & developmental biology* – 2015. – V. 43 – P.22–32.

329. Hassanein, M. Targeting SLC1a5-mediated glutamine dependence in non-small cell lung cancer. / M.Hassanein, J.Qian, M.D.Hoeksema, J.Wang, M.Jacobovitz, X.Ji, F.T.Harris, B.K.Harris, K.L.Boyd, H.Chen, R.Eisenberg, P.P.Massion // *International journal of cancer* – 2015. – V. 137 – N 7 – P.1587–97.

330. Wise, D.R. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. / D.R.Wise, C.B.Thompson // *Trends in biochemical sciences* – 2010. – V. 35 – N 8 – P.427–33.

331. Locasale, J.W. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. / J.W.Locasale, A.R.Grassian, T.Melman, C.A.Lyssiotis, K.R.Mattaini, A.J.Bass, G.Heffron, C.M.Metallo, T.Muranen, H.Sharfi, A.T.Sasaki, D.Anastasiou, E.Mullarky, N.I.Vokes, M.Sasaki, R.Beroukhim, G.Stephanopoulos, A.H.Ligon, M.Meyerson, A.L.Richardson, L.Chin, G.Wagner, J.M.Asara, J.S.Brugge, L.C.Cantley, M.G.Heiden Vander // *Nature genetics* – 2011. – V. 43 – N 9 – P.869–74.

332. Jeon, Y.J. Regulation of glutamine carrier proteins by RNF5 determines breast cancer response to ER stress-inducing chemotherapies. / Y.J.Jeon, S.Khelifa, B.Ratnikov, D.A.Scott, Y.Feng, F.Parisi, C.Ruller, E.Lau, H.Kim, L.M.Brill, T.Jiang, D.L.Rimm, R.D.Cardiff, G.B.Mills, J.W.Smith, A.L.Osterman, Y.Kluger, Z.A.Ronai // *Cancer cell* – 2015. – V. 27 – N 3 – P.354–69.

333. Possemato, R. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. / R.Possemato, K.M.Marks, Y.D.Shaul, M.E.Pacold, D.Kim, K.Birsoy, S.Sethumadhavan, H.-K.Woo, H.G.Jang, A.K.Jha, W.W.Chen, F.G.Barrett, N.Stransky, Z.-Y.Tsun, G.S.Cowley, J.Barretina, N.Y.Kalaany, P.P.Hsu, K.Ottina, A.M.Chan, B.Yuan, L.A.Garraway,

D.E.Root, M.Mino-Kenudson, E.F.Brachtel, E.M.Driggers, D.M.Sabatini // *Nature* – 2011. – V. 476 – N 7360 – P.346–50.

334. Zhang, J. Asparagine plays a critical role in regulating cellular adaptation to glutamine depletion. / J.Zhang, J.Fan, S.Venneti, J.R.Cross, T.Takagi, B.Bhinder, H.Djaballah, M.Kanai, E.H.Cheng, A.R.Judkins, B.Pawel, J.Baggs, S.Cherry, J.D.Rabinowitz, C.B.Thompson // *Molecular cell* – 2014. – V. 56 – N 2 – P.205–218.

335. Gao, P. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. / P.Gao, I.Tchernyshyov, T.-C.Chang, Y.-S.Lee, K.Kita, T.Ochi, K.I.Zeller, A.M. De Marzo, J.E. Van Eyk, J.T.Mendell, C.V.Dang // *Nature* – 2009. – V. 458 – N 7239 – P.762–5.

336. Fischer, K. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. / K.Fischer, P.Hoffmann, S.Voelkl, N.Meidenbauer, J.Ammer, M.Edinger, E.Gottfried, S.Schwarz, G.Rothe, S.Hoves, K.Renner, B.Timischl, A.Mackensen, L.Kunz-Schughart, R.Andreesen, S.W.Krause, M.Kreutz // *Blood* – 2007. – V. 109 – N 9 – P.3812–9.

337. Hunt, T.K. Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. / T.K.Hunt, R.S.Asalam, S.Beckert, S.Wagner, Q.P.Ghani, M.Z.Hussain, S.Roy, C.K.Sen // *Antioxidants & redox signaling* – 2007. – V. 9 – N 8 – P.1115–24.

338. Swietach, P. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. / P.Swietach, R.D.Vaughan-Jones, A.L.Harris // *Cancer metastasis reviews* – 2007. – V. 26 – N 2 – P.299–310.

339. Yuneva, M.O. The metabolic profile of tumors depends on both the responsible genetic lesion and tissue type. / M.O.Yuneva, T.W.M.Fan, T.D.Allen, R.M.Higashi, D.V.Ferraris, T.Tsukamoto, J.M.Matés, F.J.Alonso, C.Wang, Y.Seo, X.Chen, J.M.Bishop // *Cell metabolism* – 2012. – V. 15 – N 2 – P.157–70.

340. Mayers, J.R. Tissue of origin dictates branched-chain amino acid metabolism in mutant Kras-driven cancers. / J.R.Mayers, M.E.Torrence, L.V.Danai, T.Papagiannakopoulos, S.M.Davidson, M.R.Bauer, A.N.Lau, B.W.Ji, P.D.Dixit, A.M.Hosios, A.Muir, C.R.Chin, E.Freinkman, T.Jacks, B.M.Wolpin, D.Vitkup, M.G. Vander Heiden // *Science (New York, N.Y.)* – 2016. – V. 353 – N 6304 – P.1161–5.

341. Hensley, C.T. Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. / C.T.Hensley, B.Faubert, Q.Yuan, N.Lev-Cohain, E.Jin, J.Kim, L.Jiang, B.Ko, R.Skelton, L.Loudat, Wozzak M., C.Klimko, E.McMillan, Y.Butt, M.Ni, D.Oliver, J.Torrealba, C.R.Malloy, K.Kernstine, R.E.Lenkinski, R.J.DeBerardinis // *Cell* – 2016. – V. 164 – N 4 – P.681–94.

342. Min, H.-Y. Oncogene-Driven Metabolic Alterations in Cancer. / H.-Y.Min, H.-Y.Lee // *Biomolecules & therapeutics* – 2018. – V. 26 – N 1 – P.45–56.

343. Iurlaro, R. Regulation of cancer metabolism by oncogenes and tumor suppressors. / R.Iurlaro, C.L.León-Annicchiarico, C.Muñoz-Pinedo // *Methods in enzymology* – 2014. – V. 542 –

P.59–80.

344. Nagarajan, A. Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism. / A.Nagarajan, P.Malvi, N.Wajapeyee // Trends in cancer – 2016. – V. 2 – N 7 – P.365–377.

345. Shim, H. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. / H.Shim, C.Dolde, B.C.Lewis, C.S.Wu, G.Dang, R.A.Jungmann, R.Dalla-Favera, C.V.Dang // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 1997. – V. 94 – N 13 – P.6658–63.

346. Pusch, O. Cellular targets for activation by c-Myc include the DNA metabolism enzyme thymidine kinase. / O.Pusch, T.Soucek, E.Hengstschläger-Ottnd, G.Bernaschek, M.Hengstschläger // DNA and cell biology – 1997. – V. 16 – N 6 – P.737–47.

347. Mannava, S. Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. / S.Mannava, V.Grachtchouk, L.J.Wheeler, M.Im, D.Zhuang, E.G.Slavina, C.K.Mathews, D.S.Shewach, M.A.Nikiforov // Cell cycle (Georgetown, Tex.) – 2008. – V. 7 – N 15 – P.2392–400.

348. Edmunds, L.R. c-Myc programs fatty acid metabolism and dictates acetyl-CoA abundance and fate. / L.R.Edmunds, L.Sharma, A.Kang, J.Lu, J.Vockley, S.Basu, R.Uppala, E.S.Goetzman, M.E.Beck, D.Scott, E.V.Prochownik // The Journal of biological chemistry – 2014. – V. 289 – N 36 – P.25382–92.

349. Liu, W. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. / W.Liu, A.Le, C.Hancock, A.N.Lane, C.V.Dang, T.W.-M.Fan, J.M.Phang // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2012. – V. 109 – N 23 – P.8983–8.

350. Pakala, R. Polyamine metabolism and interconversion in NIH 3T3 and ras-transfected NIH 3T3 cells. / R.Pakala, M.Kreisel, U.Bachrach // Cancer research – 1988. – V. 48 – N 12 – P.3336–40.

351. Chiaradonna, F. Ras-dependent carbon metabolism and transformation in mouse fibroblasts. / F.Chiaradonna, E.Sacco, R.Manzoni, M.Giorgio, M.Vanoni, L.Alberghina // Oncogene – 2006. – V. 25 – N 39 – P.5391–404.

352. Ying, H. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. / H.Ying, A.C.Kimmelman, C.A.Lyssiotis, S.Hua, G.C.Chu, E.Fletcher-Sananikone, J.W.Locasale, J.Son, H.Zhang, J.L.Coloff, H.Yan, W.Wang, S.Chen, Viale A., H.Zheng, J.Paik, C.Lim, A.R.Guimaraes, E.S.Martin, J.Chang, A.F.Hezel, S.R.Perry, J.Hu, B.Gan, Y.Xiao, J.M.Asara, R.Weissleder, Y.A.Wang, L.Chin, L.C.Cantley, R.A.DePinho // Cell – 2012. – V. 149 – N 3 – P.656–70.

353. Son, J. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. / J.Son, C.A.Lyssiotis, H.Ying, X.Wang, S.Hua, M.Ligorio, R.M.Perera, C.R.Ferrone,

E.Mullarky, N.Shyh-Chang, Y.Kang, J.B.Fleming, N.Bardeesy, J.M.Asara, M.C.Haigis, R.A DePinho., L.C.Cantley, A.C.Kimmelman // *Nature* – 2013. – V. 496 – N 7443 – P.101–5.

354. Pavlova, N.N. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. / N.N.Pavlova, C.B.Thompson // *Cell metabolism* – 2016. – V. 23 – N 1 – P.27–47.

355. Scott, D.A. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. / D.A.Scott, A.D.Richardson, F.V.Filipp, C.A.Knutzen, G.G.Chiang, Z.A.Ronai, A.L.Osterman, J.W.Smith // *The Journal of biological chemistry* – 2011. – V. 286 – N 49 – P.42626–34.

356. Haq, R. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. / R.Haq, J.Shoag, P.Andreu-Perez, S.Yokoyama, H.Edelman, G.C.Rowe, D.T.Frederick, A.D.Hurley, A.Nellore, A.L.Kung, J.A.Wargo, J.S.Song, D.E.Fisher, Z.Arany, H.R.Widlund // *Cancer cell* – 2013. – V. 23 – N 3 – P.302–15.

357. Pikor, L.A. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. / L.A.Pikor, V.R.Ramnarine, S.Lam, W.L.Lam // *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* – 2013. – V. 82 – N 2 – P.179–89.

358. Ji, H. LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. / H.Ji, M.R.Ramsey, D.N.Hayes, C.Fan, K.McNamara, P.Kozlowski, C.Torrice, M.C.Wu, T.Shimamura, S.A.Perera, M.-C.Liang, D.Cai, G.N.Naumov, L.Bao, C.M.Contreras, D.Li, L.Chen, J.Krishnamurthy, J.Koivunen, L.R.Chirieac, R.F.Padera, R.T.Bronson, N.I.Lindeman, D.C.Christiani, X.Lin, G.I.Shapiro, P.A.Jänne, B.E.Johnson, M.Meyerson, D.J.Kwiatkowski, D.H.Castrillon, N.Bardeesy, N.E.Sharpless, K.-K.Wong // *Nature* – 2007. – V. 448 – N 7155 – P.807–10.

359. Li, H. Structural and biochemical studies of TIGAR (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator). / H.Li, G.Jogl // *The Journal of biological chemistry* – 2009. – V. 284 – N 3 – P.1748–54.

360. Berkers, C.R. Metabolic regulation by p53 family members. / C.R.Berkers, O.D.K.Maddocks, E.C.Cheung, I.Mor, K.H. Vousden // *Cell metabolism* – 2013. – V. 18 – N 5 – P.617–33.

361. Schwartzberg-Bar-Yoseph, F. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. / F.Schwartzberg-Bar-Yoseph, M.Armoni, E.Karnieli // *Cancer research* – 2004. – V. 64 – N 7 – P.2627–33.

362. Matoba, S. p53 regulates mitochondrial respiration. / S.Matoba, J.-G.Kang, W.D.Patino, A.Wragg, M.Boehm, O.Gavrilova, P.J.Hurley, F.Bunz, P.M.Hwang // *Science (New York, N.Y.)* – 2006. – V. 312 – N 5780 – P.1650–3.

363. Li, N. Inhibition of the sterol regulatory element-binding protein pathway suppresses hepatocellular carcinoma by repressing inflammation in mice. / N.Li, Z.-S.Zhou, Y.Shen, J.Xu, H.-H.Miao, Y.Xiong, F.Xu, B.-L.Li, J.Luo, B.-L.Song // *Hepatology* – 2017. – V. 65 – N 6 – P.1936–1947.

364. Sugden, M.C. PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC. / M.C.Sugden, P.W.Caton, M.J.Holness // *The Journal of endocrinology* – 2010. – V. 204 – N 2 – P.93–104.
365. Bengoechea-Alonso, M.T. The phosphorylation-dependent regulation of nuclear SREBP1 during mitosis links lipid metabolism and cell growth. / M.T.Bengoechea-Alonso, J.Ericsson // *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* – 2016. – V. 15 – N 20 – P.2753–65.
366. Huang, W.-C. Activation of androgen receptor, lipogenesis, and oxidative stress converged by SREBP-1 is responsible for regulating growth and progression of prostate cancer cells. / W.-C.Huang, X.Li, J.Liu, J.Lin, L.W.K.Chung // *Molecular cancer research : MCR* – 2012. – V. 10 – N 1 – P.133–42.
367. Wei, W. Ligand Activation of $ERR\alpha$ by Cholesterol Mediates Statin and Bisphosphonate Effects. / W.Weii, A.G.Schwaidd, X.Wang, X.Wang, S.Chen, Q.Chu, A.Saghatelian, Y.Wan // *Cell metabolism* – 2016. – V. 23 – N 3 – P.479–91.
368. Guo, D. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. / D.Guo, F.Reinitz, M.Youssef, C.Hong, D.Nathanson, D.Akhavan, D.Kuga, A.N.Amzajerdi, H.Soto, S.Zhu, I.Babic, K.Tanaka, J.Dang, A.Iwanami, B.Gini, J.Dejesus, D.D.Lisiero, T.T.Huang, R.M.Prins, P.Y.Wen, H.I.Robins, M.D.Prados, L.M.Deangelis, I.K.Mellinghoff, M.P.Mehta, C.D.James, A.Chakravarti, T.F.Cloughesy, P.Tontonoz, P.S.Mischel // *Cancer discovery* – 2011. – V. 1 – N 5 – P.442–56.
369. Vazquez, F. $PGC1\alpha$ expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. / F.Vazquez, J.-H.Lim, H.Chim, K.Bhalla, G.Girnun, K.Pierce, C.B.Clish, S.R.Granter, H.R.Widlund, B.M.Spiegelman, P.Puigserver // *Cancer cell* – 2013. – V. 23 – N 3 – P.287–301.
370. Thewes, V. Reprogramming of the $ERR\alpha$ and $ER\alpha$ target gene landscape triggers tamoxifen resistance in breast cancer. / V.Thewes, R.Simon, P.Schroeter, M.Schlotter, T.Anzeneder, R.Büttner, V.Benes, G.Sauter, B.Burwinkel, R.I.Nicholson, H.-P.Sinn, A.Schneeweiss, U.Deuschle, M.Zapatka, S.Heck, P.Lichter // *Cancer research* – 2015. – V. 75 – N 4 – P.720–31.
371. Chen, P. Estrogen-related receptor alpha confers methotrexate resistance via attenuation of reactive oxygen species production and P53 mediated apoptosis in osteosarcoma cells. / P.Chen, H.Wang, Z.Duan, J.X.Zou, H.Chen, W.He, J.Wang // *BioMed research international* – 2014. – V. 2014 – P.616025.
372. Stein, R.A. Estrogen-related receptor alpha as a therapeutic target in cancer. / R.A.Stein, D.P.McDonnell // *Endocrine-related cancer* – 2006. – V. 13 Suppl 1 – P.S25-32.
373. Buentke, E. Glucocorticoid-induced cell death is mediated through reduced glucose metabolism in lymphoid leukemia cells. / E.Buentke, A.Nordström, H.Lin, A.-C.Björklund, E.Laane, M.Harada, L.Lu, T.Tegnebratt, S.Stone-Elander, M.Heyman, S.Söderhäll, A.Porwit, C.-G.Ostenson, M.Shoshan, K.P.Tamm, D.Grandér // *Blood cancer journal* – 2011. – V. 1 – N 7 – P.e31.

374. Tung, S. PPAR α and fatty acid oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. / S.Tung, Y.Shi, K.Wong, F.Zhu, R.Gorczyński, R.C.Laister, M.Minden, A.-K.Blechert, Y.Genzel, U.Reichl, D.E.Spaner // *Blood* – 2013. – V. 122 – N 6 – P.969–80.
375. Boag, J.M. Altered glucose metabolism in childhood pre-B acute lymphoblastic leukaemia. / J.M.Boag, A.H.Beesley, M.J.Firth, J.R.Freitas, J.Ford, K.Hoffmann, A.J.Cummings, N.H. de Klerk, U.R.Kees // *Leukemia* – 2006. – V. 20 – N 10 – P.1731–7.
376. Maschek, G. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. / G.Maschek, N.Savaraj, W.Priebe, P.Braunschweiger, K.Hamilton, G.F.Tidmarsh, L.R. De Young, T.J. Lampidis // *Cancer research* – 2004. – V. 64 – N 1 – P.31–4.
377. Hernández-Alvarez, M.I. Glucocorticoid modulation of mitochondrial function in hepatoma cells requires the mitochondrial fission protein Drp1. / M.I.Hernández-Alvarez, J.C.Paz, D.Sebastián, J.P.Muñoz, M.Liesa, J.Segalés, M.Palacín, A.Zorzano // *Antioxidants & redox signaling* – 2013. – V. 19 – N 4 – P.366–78.
378. Nakamura, M. Transforming growth factor- β -stimulated clone-22 is a negative-feedback regulator of Ras / Raf signaling: Implications for tumorigenesis. / M.Nakamura, J.Kitaura, Y.Enomoto, Y.Lu, K.Nishimura, M.Isobe, K.Ozaki, Y.Komeno, F.Nakahara, T.Oki, H.Kume, Y.Homma, T.Kitamura // *Cancer science* – 2012. – V. 103 – N 1 – P.26–33.
379. Mason, J.A. Oncogenic Ras differentially regulates metabolism and anoikis in extracellular matrix-detached cells. / J.A.Mason, C.A.Davison-Versagli, A.K.Leliaert, D.J.Pape, C.McCallister, J.Zuo, S.M.Durbin, C.L.Buchheit, S.Zhang, Z.T.Schafer // *Cell death and differentiation* – 2016. – V. 23 – N 8 – P.1271–82.
380. 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, M.Matsuyama, M.Lam, T.H.Finkel, S.Matsuyama, C.W.Distelhorst // *The Journal of biological chemistry* – 2011. – V. 286 – N 34 – P.30181–9.
381. Aoki, S. Shift in energy metabolism caused by glucocorticoids enhances the effect of cytotoxic anti-cancer drugs against acute lymphoblastic leukemia cells. / S.Aoki, M.Morita, T.Hirao, M.Yamaguchi, R.Shiratori, M.Kikuya, H.Chibana, K.Ito // *Oncotarget* – 2017. – V. 8 – N 55 – P.94271–94285.
382. Flaherty, R.L. Glucocorticoids induce production of reactive oxygen species/reactive nitrogen species and DNA damage through an iNOS mediated pathway in breast cancer. / R.L.Flaherty, M.Owen, A.Fagan-Murphy, H.Intabli, D.Healy, A.Patel, M.C.Allen, B.A.Patel, M.S.Flint // *Breast cancer research : BCR* – 2017. – V. 19 – N 1 – P.35.
383. Dunn, G.P. The three Es of cancer immunoediting. / G.P.Dunn, L.J.Old, R.D.Schreiber //

Annual review of immunology – 2004. – V. 22 – P.329–60.

384. Mlecnik, B. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. / B.Mlecnik, G.Bindea, H.K.Angell, P.Maby, M.Angelova, D.Tougeron, S.E.Church, L.Lafontaine, M.Fischer, T.Fredriksen, M.Sasso, A.M.Bilocq, A.Kirilovsky, A.C.Obenauf, M.Hamieh, A.Berger, P.Bruneval, J.-J.Tuech, J.-C.Sabourin, F. Le Pessot, J.Mauillon, A.Rafii, P.Laurent-Puig, M.R.Speicher, Z.Trajanoski, P.Michel, R.Sesboüe, T.Freboung, F.Pagès, V.Valge-Archer, J.-B.Latouche, J.Galon // *Immunity* – 2016. – V. 44 – N 3 – P.698–711.

385. Schumacher, T.N. Neoantigens in cancer immunotherapy. / T.N.Schumacher, R.D.Schreiber // *Science (New York, N.Y.)* – 2015. – V. 348 – N 6230 – P.69–74.

386. Chen, D.S. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. / D.S.Chen, I.Mellman // *Immunity* – 2013. – V. 39 – N 1 – P.1–10.

387. Smyth, M.J. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. / M.J.Smyth, G.P.Dunn, R.D.Schreiber // *Advances in immunology* – 2006. – V. 90 – P.1–50.

388. Visser, K.E. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. / K.E. de Visser, A.Eichten, L.M.Coussens // *Nature reviews. Cancer* – 2006. – V. 6 – N 1 – P.24–37.

389. Garrido, F. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible “hard” lesions. / F.Garrido, I.Algarra, A.M.García-Lora // *Cancer immunology, immunotherapy : CII* – 2010. – V. 59 – N 10 – P.1601–6.

390. Jago, C.B. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. / C.B.Jago, J.Yates, N.O.S.Câmara, R.I.Lechler, G.Lombardi // *Clinical and experimental immunology* – 2004. – V. 136 – N 3 – P.463–71.

391. Blackburn, S.D. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. / S.D.Blackburn, H.Shin, W.N.Haining, T.Zou, C.J.Workman, A.Polley, M.R.Betts, G.J.Freeman, D.A.A.Vignali, E.J.Wherry // *Nature immunology* – 2009. – V. 10 – N 1 – P.29–37.

392. Bedi, A. Inhibition of TGF- β enhances the in vivo antitumor efficacy of EGF receptor-targeted therapy. / A.Bedi, X.Chang, K.Noonan, V.Pham, R.Bedi, E.J.Fertig, M.Considine, J.A.Califano, I.Borrello, C.H.Chung, D.Sidransky, R.Ravi // *Molecular cancer therapeutics* – 2012. – V. 11 – N 11 – P.2429–39.

393. Allen, C.T. The clinical implications of antitumor immunity in head and neck cancer. / C.T.Allen, N.P.Judd, J.D.Bui, R.Uppaluri // *The Laryngoscope* – 2012. – V. 122 – N 1 – P.144–57.

394. Bou Nasser Eddine, F. Tumor Immunology meets... Immunology: Modified cancer cells as professional APC for priming naïve tumor-specific CD4+ T cells. / F.Bou Nasser Eddine, E.Ramia,

G.Tosi, G.Forlani, R.S.Accolla // *Oncoimmunology* – 2017. – V. 6 – N 11 – P.e1356149.

395. Oleinika, K. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression. / K.Oleinika, R.J.Nibbs, G.J.Graham, A.R.Fraser // *Clinical and experimental immunology* – 2013. – V. 171 – N 1 – P.36–45.

396. Gabrilovich, D.I. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. / D.I.Gabrilovich, S.Nagaraj // *Nature reviews. Immunology* – 2009. – V. 9 – N 3 – P.162–74.

397. Galdiero, M.R. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. / M.R.Galdiero, E.Bonavita, I.Barajon, C.Garlanda, A.Mantovani, S.Jaillon // *Immunobiology* – 2013. – V. 218 – N 11 – P.1402–10.

398. Smith, H.A. The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. / H.A.Smith, Y.Kang // *Journal of molecular medicine* – 2013. – V. 91 – N 4 – P.411–29.

399. Vasquez-Dunddel, D. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. / D.Vasquez-Dunddel, F.Pan, Q.Zeng, M.Gorbounov, E.Albesiano, J.Fu, R.L.Blosser, A.J.Tam, T.Bruno, H.Zhang, D.Pardoll, Y.Kim // *The Journal of clinical investigation* – 2013. – V. 123 – N 4 – P.1580–9.

400. Zhu, Y. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. / Y.Zhu, B.L.Knolhoff, M.A.Meyer, T.M.Nywening, B.L.West, J.Luo, A.Wang-Gillam, S.P.Goedegebuure, D.C.Linehan, D.G.DeNardo // *Cancer research* – 2014. – V. 74 – N 18 – P.5057–69.

401. Califano, J.A. Tadalafil augments tumor specific immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. / J.A. Califano, Z. Khan, K.A. Noonan, L. Rudraraju, Z. Zhang, H. Wang, S. Goodman, C.G. Gourin, P.K. Ha, C. Fakhry, J. Saunders, M. Levine, M. Tang, G. Neuner, J.D. Richmon, R. Blanco, N. Agrawal, W.M. Koch, S. Marur, D.T. Weed, P. Serafini, I. Borrello // *Clinical cancer research* – 2015. – V. 21 – N 1 – P.30–8.

402. Noy, R. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. / R. Noy, J.W. Pollard // *Immunity* – 2014. – V. 41 – N 1 – P.49–61.

403. Goerdt, S. Alternative versus classical activation of macrophages. / S. Goerdt, O. Politz, K. Schledzewski, R. Birk, A. Gratchev, P. Guillot, N. Hakiy, C.D. Klemke, E. Dippel, V. Kodelja, C.E. Orfanos // *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* – 1999. – V. 67 – N 5–6 – P.222–6.

404. Ковалева, О.В. Роль макрофагов, ассоциированных с опухолью, в патогенезе почечно-клеточного рака / О.В. Ковалева, Г.Д. Ефремов, Д.Р.Михайленко, Б.Я. Алексеев, А.Н. Грачев // *Онкоурология* – 2017. – Т. 13 – № 1 – С.20–26.

405. Knutson, K.L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. / K.L. Knutson, M.L. Disis // *Cancer immunology, immunotherapy : CII* – 2005. – V.

54 – N 8 – P.721–8.

406. Lu, H. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. / H. Lu, R.A. Forbes, A. Verma // *The Journal of biological chemistry* – 2002. – V. 277 – N 26 – P.23111–5.

407. Ivanov, S. V Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. / S.V. Ivanov, I. Kuzmin, M.H. Wei, S. Pack, L. Geil, B.E. Johnson, E.J. Stanbridge, M.I. Lerman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1998. – V. 95 – N 21 – P.12596–601.

408. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. / G.L. Semenza // *Nature reviews. Cancer* – 2003. – V. 3 – N 10 – P.721–32.

409. Huber, V. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. / V. Huber, C. Camisaschi, A. Berzi, S. Ferro, L. Lugini, T. Triulzi, A. Tuccitto, E. Tagliabue, C. Castelli, L. Rivoltini // *Seminars in cancer biology* – 2017. – V. 43 – P.74–89.

410. Cox, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. / G. Cox // *Journal of immunology* – 1995. – V. 154 – N 9 – P.4719–25.

411. Aoki, K. Role of CXC chemokines in the enhancement of LPS-induced neutrophil accumulation in the lung of mice by dexamethasone. / K. Aoki, Y. Ishida, N. Kikuta, H. Kawai, M. Kuroiwa, H. Sato // *Biochemical and biophysical research communications* – 2002. – V. 294 – N 5 – P.1101–8.

412. Yamagata, S. Non-genomic inhibitory effect of glucocorticoids on activated peripheral blood basophils through suppression of lipid raft formation. / S. Yamagata, K. Tomita, H. Sano, Y. Itoh, Y. Fukai, N. Okimoto, N. Watatani, S. Inbe, H. Miyajima, K. Tsukamoto, H. Santoh, H. Ichihashi, A. Sano, R. Sato, Y. Tohda // *Clinical and experimental immunology* – 2012. – V. 170 – N 1 – P.86–93.

413. Saffar, A.S. The molecular mechanisms of glucocorticoids-mediated neutrophil survival. / A.S. Saffar, H. Ashdown, A.S. Gounni // *Current drug targets* – 2011. – V. 12 – N 4 – P.556–62.

414. Yoshimura, C. Glucocorticoids induce basophil apoptosis. / C. Yoshimura, M. Miyamasu, H. Nagase, M. Iikura, M. Yamaguchi, O. Kawanami, Y. Morita, T. Iwata, K. Yamamoto, K. Hirai // *The Journal of allergy and clinical immunology* – 2001. – V. 108 – N 2 – P.215–20.

415. Matasić, R. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. / R. Matasić, A.B. Dietz, S. Vuk-Pavlović // *Journal of leukocyte biology* – 1999. – V. 66 – N 6 – P.909–14.

416. Woltman, A.M. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. / A.M. Woltman, J.W. de Fijter, S.W. Kamerling, L.C. Paul, M.R. Daha, C. van Kooten // *European journal of immunology* – 2000. – V. 30 – N 7 – P.1807–12.

417. Rogatsky, I. Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. / I. Rogatsky, H.F. Luecke, D.C. Leitman, K.R. Yamamoto // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2002. – V. 99 – N 26 – P.16701–6.
418. Oppong, E. Molecular mechanisms of glucocorticoid action in mast cells. / E. Oppong, N. Flink, A.C.B. Cato // *Molecular and cellular endocrinology* – 2013. – V. 380 – N 1–2 – P.119–26.
419. Herold, M.J. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. / M.J. Herold, K.G. McPherson, H.M. Reichardt // *Cellular and molecular life sciences : CMLS* – 2006. – V. 63 – N 1 – P.60–72.
420. Zamoyska, R. The influence of the src-family kinases, Lck and Fyn, on T cell differentiation, survival and activation. / R. Zamoyska, A. Basson, A. Filby, G. Legname, M. Lovatt, B. Seddon // *Immunological reviews* – 2003. – V. 191 – P.107–18.
421. Gruver-Yates, A.L. Analysis of glucocorticoid receptors and their apoptotic response to dexamethasone in male murine B cells during development. / A.L. Gruver-Yates, M.A. Quinn, J.A. Cidlowski // *Endocrinology* – 2014. – V. 155 – N 2 – P.463–74.
422. Cupps, T.R. Multiple mechanisms of B cell immunoregulation in man after administration of in vivo corticosteroids. / T.R. Cupps, L.C. Edgar, C.A. Thomas, A.S. Fauci // *Journal of immunology* – 1984. – V. 132 – N 1 – P.170–5.
423. Cupps, T.R. Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation. / T.R. Cupps, T.L. Gerrard, R.J. Falkoff, G. Whalen, A.S. Fauci // *The Journal of clinical investigation* – 1985. – V. 75 – N 2 – P.754–61.
424. Gratchev, A. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. / A. Gratchev, P. Guillot, N. Hakiy, O. Politz, C.E. Orfanos, K. Schledzewski, S. Goerdts // *Scandinavian journal of immunology* – 2001. – V. 53 – N 4 – P.386–92.
425. Gratchev, A. Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-beta receptor II. / A. Gratchev, J. Kzhyshkowska, S. Kannookadan, M. Ochsenreiter, A. Popova, X. Yu, S. Mamidi, E. Stonehouse-Usselman, I. Muller-Molinet, L. Gooi, S. Goerdts // *Journal of immunology* – 2008. – V. 180 – N 10 – P.6553–65.
426. Gratchev, A. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. / A. Gratchev, J. Kzhyshkowska, J. Utikal, S. Goerdts // *Scandinavian journal of immunology* – 2005. – V. 61 – N 1 – P.10–7.
427. Ginderachter, J.A. Van Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. / J.A. Van Ginderachter, K. Movahedi, G.

Hassanzadeh Ghassabeh, S. Meerschaut, A. Beschin, G. Raes, P. De Baetselier // Immunobiology – 2006. – V. 211 – N 6–8 – P.487–501.

428. Duffy, M.J. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. / M.J. Duffy // Clinical chemistry – 2002. – V. 48 – N 8 – P.1194–7.

429. Lu, Y. Glucocorticoid receptor promotes the function of myeloid-derived suppressor cells by suppressing HIF1 α -dependent glycolysis. / Y. Lu, H. Liu, Y. Bi, H. Yang, Y. Li, J. Wang, Z. Zhang, Y. Wang, C. Li, A. Jia, L. Han, Y. Hu, Y. Zhao, R. Wang, G. Liu // Cellular & molecular immunology – 2018. – V. 15 – N 6 – P.618–629.

430. Colak, S. Targeting TGF- β Signaling in Cancer. / S. Colak, P. Ten Dijke // Trends in cancer – 2017. – V. 3 – N 1 – P.56–71.

431. Liu, B. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor negatively regulates activation of human primary natural killer (NK) cells by blocking proliferative signals and increasing NK cell apoptosis. / B. Liu, Z. Li, S.P. Mahesh, S. Pantanelli, F.S. Hwang, W.O. Siu, R.B. Nussenblatt // The Journal of biological chemistry – 2008. – V. 283 – N 13 – P.8202–10.

432. Nocentini, G. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. / G. Nocentini, L. Giunchi, S. Ronchetti, L.T. Krausz, A. Bartoli, R. Moraca, G. Migliorati, C. Riccardi // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 1997. – V. 94 – N 12 – P.6216–21.

433. Ji, H. Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. / H. Ji, G. Liao, W.A. Faubion, A.C. Abadía-Molina, C. Cozzo, F.S. Laroux, A. Caton, C. Terhorst // Journal of immunology – 2004. – V. 172 – N 10 – P.5823–7.

434. Kwon, B. Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. / B. Kwon, K.Y. Yu, J. Ni, G.L. Yu, I.K. Jang, Y.J. Kim, L. Xing, D. Liu, S.X. Wang, B.S. Kwon // The Journal of biological chemistry – 1999. – V. 274 – N 10 – P.6056–61.

435. Gurney, A.L. Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. / A.L. Gurney, S.A. Marsters, R.M. Huang, R.M. Pitti, D.T. Mark, D.T. Baldwin, A.M. Gray., A.D. Dowd, A.D. Brush, A.D. Heldens, A.D. Schow, A.D. Goddard, W.I. Wood, K.P. Baker, P.J. Godowski, A. Ashkenazi // Current biology : CB – 1999. – V. 9 – N 4 – P.215–8.

436. Li, Z. Expression of glucocorticoid induced TNF receptor family related protein (GITR) on peripheral T cells from normal human donors and patients with non-infectious uveitis. / Z. Li, S.P. Mahesh, B.J. Kim, R.R. Buggage, R.B. Nussenblatt // Journal of autoimmunity – 2003. – V. 21 – N 1 –

P.83–92.

437. Ronchetti, S. Role of GITR in activation response of T lymphocytes. / S. Ronchetti, G. Nocentini, C. Riccardi, P.P. Pandolfi // *Blood* – 2002. – V. 100 – N 1 – P.350–2.

438. Ronchetti, S. GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. / S. Ronchetti, O. Zollo, S. Bruscoli, M. Agostini, R. Bianchini, G. Nocentini, E. Ayroldi, C. Riccardi // *European journal of immunology* – 2004. – V. 34 – N 3 – P.613–622.

439. Shimizu, J. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. / J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, S. Sakaguchi // *Nature immunology* – 2002. – V. 3 – N 2 – P.135–42.

440. Riccardi, C. Glucocorticoid hormone-induced modulation of gene expression and regulation of T-cell death: role of GITR and GILZ, two dexamethasone-induced genes. / C. Riccardi, M.G. Cifone, G. Migliorati // *Cell death and differentiation* – 1999. – V. 6 – N 12 – P.1182–9.

441. Miner, J.N. New and improved glucocorticoid receptor ligands. / J.N. Miner, M.H. Hong, A. Negro-Vilar // *Expert opinion on investigational drugs* – 2005. – V. 14 – N 12 – P.1527–45.

442. Schmidt, S. Glucocorticoid resistance in two key models of acute lymphoblastic leukemia occurs at the level of the glucocorticoid receptor. / S. Schmidt, J.A.E. Irving, L. Minto, E. Matheson, L. Nicholson, A. Ploner, W. Parson, A. Kofler, M. Amort, M. Erdel, A. Hall, R. Kofler // *FASEB journal* – 2006. – V. 20 – N 14 – P.2600–2.

443. Katsumata, M. Diphenylhydantoin: an alternative ligand of a glucocorticoid receptor affecting prostaglandin generation in A/J mice. / M. Katsumata, C. Gupta, M.K. Baker, C.E. Sussdorf, A.S. Goldman // *Science (New York, N.Y.)* – 1982. – V. 218 – N 4579 – P.1313–5.

444. Buttgerit, F. Delayed-release prednisone - a new approach to an old therapy. / F. Buttgerit, A. Gibofsky // *Expert opinion on pharmacotherapy* – 2013. – V. 14 – N 8 – P.1097–106.

445. Derendorf, H. Pharmacokinetics of modified-release prednisone tablets in healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. / H. Derendorf, K. Ruebsamen, L. Clarke, A. Schaeffler, J.R. Kirwan // *Journal of clinical pharmacology* – 2013. – V. 53 – N 3 – P.326–33.

446. Strehl, C. Glucocorticoid-targeted therapies for the treatment of rheumatoid arthritis. / C. Strehl, M.C. van der Goes, J.W.J. Bijlsma, J.W.G. Jacobs, F. Buttgerit // *Expert opinion on investigational drugs* – 2017. – V. 26 – N 2 – P.187–195.

447. Buttgerit, F. Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomised controlled trial. / F. Buttgerit, G. Doering, A. Schaeffler, S. Witte, S. Sierakowski, E. Gromnica-Ihle, S. Jeka, K. Krueger, J. Szechinski, R. Alten // *Lancet* – 2008. – V. 371 – N 9608 – P.205–14.

448. Buttgerit, F. Targeting pathophysiological rhythms: prednisone chronotherapy shows

sustained efficacy in rheumatoid arthritis. / F. Buttgerit, G. Doering, A. Schaeffler, S. Witte, S. Sierakowski, E. Gromnica-Ihle, S. Jeka, K. Krueger, J. Szechinski, R. Alten // *Annals of the rheumatic diseases* – 2010. – V. 69 – N 7 – P.1275–80.

449. Uings, I.J. Discovery of GW870086: a potent anti-inflammatory steroid with a unique pharmacological profile. / I.J. Uings, D. Needham, J. Matthews, M. Haase, R. Austin, D. Angell, K. Leavens, J. Holt, K. Biggadike, S.N. Farrow // *British journal of pharmacology* – 2013. – V. 169 – N 6 – P.1389–403.

450. Bareille, P. Efficacy and safety of once-daily GW870086 a novel selective glucocorticoid in mild-moderate asthmatics: a randomised, two-way crossover, controlled clinical trial. / P. Bareille, K. Hards, A.C. Donald // *The Journal of asthma* – 2013. – V. 50 – N 10 – P.1077–82.

451. Kuna, P. Efficacy and Tolerability of an Inhaled Selective Glucocorticoid Receptor Modulator - AZD5423 - in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients: Phase II Study Results. / P. Kuna, M. Aurivillius, C. Jorup, S. Prothon, Z. Taib, S. Edsbäcker // *Basic & clinical pharmacology & toxicology* – 2017. – V. 121 – N 4 – P.279–289.

452. Vandevyver, S. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. / S. Vandevyver, L. Dejager, J. Tuckermann, C. Libert // *Endocrinology* – 2013. – V. 154 – N 3 – P.993–1007.

453. Rauchhaus, U. Separating therapeutic efficacy from glucocorticoid side-effects in rodent arthritis using novel, liposomal delivery of dexamethasone phosphate: long-term suppression of arthritis facilitates interval treatment. / U. Rauchhaus, F.W. Schwaiger, S. Panzner // *Arthritis research & therapy* – 2009. – V. 11 – N 6 – P.R190.

454. Rauchhaus, U. Targeted delivery of liposomal dexamethasone phosphate to the spleen provides a persistent therapeutic effect in rat antigen-induced arthritis. / U. Rauchhaus, R.W. Kinne, D. Pohlers, S. Wiegand, A. Wölfert, M. Gajda, R. Bräuer, S. Panzner // *Annals of the rheumatic diseases* – 2009. – V. 68 – N 12 – P.1933–4.

455. Zimmermann, G.R. Selective amplification of glucocorticoid anti-inflammatory activity through synergistic multi-target action of a combination drug. / G.R. Zimmermann, W. Avery, A.L. Finelli, M. Farwell, C.C. Fraser, A.A. Borisy // *Arthritis research & therapy* – 2009. – V. 11 – N 1 – P.R12.

456. Paul-Clark, M.J. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. / M.J. Paul-Clark, D.W. Gilroy, D. Willis, D.A. Willoughby, A. Tomlinson // *Journal of immunology* – 2001. – V. 166 – N 2 – P.1169–77.

457. Paul-Clark, M.J. Potent antiarthritic properties of a glucocorticoid derivative, NCX-1015, in an experimental model of arthritis. / Paul-Clark M.J., Mancini L., Soldato P. Del, Flower R.J., Perretti M. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2002. – V. 99

– N 3 – P.1677–82.

458. Spies, C.M. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) on monocytes are up-regulated after vaccination. / C.M. Spies, B. Bartholome, T. Berki, G.-R. Burmester, A. Radbruch, A. Scheffold, F. Buttgereit // *Rheumatology (Oxford, England)* – 2007. – V. 46 – N 2 – P.364–5.

459. Tryc, A.B. Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. / A.B. Tryc, C.M. Spies, U. Schneider, D. Kunkel, T. Berki, J. Sieper, G.-R. Burmester, A. Radbruch, A. Scheffold, F. Buttgereit // *The Journal of rheumatology* – 2006. – V. 33 – N 11 – P.2249–53.

460. Spies, C.M. Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. / C.M. Spies, D.H.S. Schaumann, T. Berki, K. Mayer, M. Jakstadt, D. Huscher, C. Wunder, G.-R. Burmester, A. Radbruch, R. Lauster, A. Scheffold, F. Buttgereit // *Annals of the rheumatic diseases* – 2006. – V. 65 – N 9 – P.1139–46.

461. Strehl, C. Origin and functional activity of the membrane-bound glucocorticoid receptor. / C. Strehl, T. Gaber, M. Löwenberg, D.W. Hommes, A.P. Verhaar, S. Schellmann, M. Hahne, M. Fangradt, M. Wagegg, P. Hoff, A. Scheffold, C.M. Spies, G.-R. Burmester, F. Buttgereit // *Arthritis and rheumatism* – 2011. – V. 63 – N 12 – P.3779–88.

462. Clark, A.R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. / A.R. Clark // *Molecular and cellular endocrinology* – 2007. – V. 275 – N 1–2 – P.79–97.

463. Tuckermann, J.P. The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. / J.P. Tuckermann, H.M. Reichardt, R. Arribas, K.H. Richter, G. Schütz, P. Angel // *The Journal of cell biology* – 1999. – V. 147 – N 7 – P.1365–70.

464. Reichardt, H.M. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. / H.M. Reichardt, J.P. Tuckermann, M. Göttlicher, M. Vujic, F. Weih, P. Angel, P. Herrlich, G. Schütz // *The EMBO journal* – 2001. – V. 20 – N 24 – P.7168–73.

465. Tuckermann, J.P. Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. / J.P. Tuckermann, A. Kleiman, R. Moriggl, R. Spanbroek, A. Neumann, A. Illing, B.E. Clausen, B. Stride, I. Förster, A.J.R. Habenicht, H.M. Reichardt, F. Tronche, W. Schmid, G. Schütz // *The Journal of clinical investigation* – 2007. – V. 117 – N 5 – P.1381–90.

466. Kleiman, A. Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. / A. Kleiman, J.P. Tuckermann // *Molecular and cellular endocrinology* – 2007. – V. 275 – N 1–2 – P.98–108.

467. Miner, J.N. Antiinflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects exhibits an altered protein-protein interaction profile. / J.N. Miner, B. Ardecky, K. Benbatoul, K. Griffiths, C.J. Larson, D.E. Mais, K. Marschke, J. Rosen, E. Vajda, L. Zhi, A. Negro-Vilar // *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2007. – V. 104 – N 49 – P.19244–9.

468. Vayssière, B.M. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. / B.M.Vayssière, S. Dupont, A. Choquart, F. Petit, T. Garcia, C. Marchandea, H. Gronemeyer, M. Resche-Rigon // *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) – 1997. – V. 11 – N 9 – P.1245–55.

469. Schäcke, H. Insight into the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action promotes identification of novel ligands with an improved therapeutic index. / H. Schäcke, H. Rehwinkel, K. Asadullah, A.C.B. Cato // *Experimental dermatology* – 2006. – V. 15 – N 8 – P.565–73.

470. Schäcke, H. Characterization of ZK 245186, a novel, selective glucocorticoid receptor agonist for the topical treatment of inflammatory skin diseases. / H. Schäcke, T.M. Zollner, W.D. Döcke, H. Rehwinkel, S. Jaroch, W. Skuballa, R. Neuhaus, E. May, U. Zügel, K. Asadullah // *British journal of pharmacology* – 2009. – V. 158 – N 4 – P.1088–103.

471. Spinelli, S.L. Mapracorat, a selective glucocorticoid receptor agonist, upregulates RelB, an anti-inflammatory nuclear factor-kappaB protein, in human ocular cells. / S.L. Spinelli, X. Xi, D.H. McMillan, C.F. Woeller, M.E. Richardson, M.E. Cavet, J.-Z. Zhang, S.E. Feldon, R.P. Phipps // *Experimental eye research* – 2014. – V. 127 – P.290–8.

472. Baiula, M. Mapracorat, a selective glucocorticoid receptor agonist, causes apoptosis of eosinophils infiltrating the conjunctiva in late-phase experimental ocular allergy. / M. Baiula, A. Bedini, J. Baldi, M.E. Cavet, P. Govoni, S. Spampinato // *Drug design, development and therapy* – 2014. – V. 8 – P.745–57.

473. Cavet, M.E. Anti-allergic effects of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, in human conjunctival fibroblasts and epithelial cells. / M.E. Cavet, S. Volhejn, K.L. Harrington, J.-Z. Zhang // *Molecular vision* – 2013. – V. 19 – P.1515–25.

474. Bäumer, W. The selective glucocorticoid receptor agonist mapracorat displays a favourable safety-efficacy ratio for the topical treatment of inflammatory skin diseases in dogs. / W. Bäumer, K. Rossbach, B.H. Schmidt // *Veterinary dermatology* – 2017. – V. 28 – N 1 – P.46-e11.

475. Baiula, M. Mapracorat, a novel non-steroidal selective glucocorticoid receptor agonist for the treatment of allergic conjunctivitis. / M. Baiula, S. Spampinato // *Inflammation & allergy drug targets* – 2014. – V. 13 – N 5 – P.289–98.

476. Hu, X. The antagonists but not partial agonists of glucocorticoid receptor ligands show substantial side effect dissociation. / X. Hu, S. Du, C. Tunca, T. Braden, K.R. Long, J. Lee, E.G. Webb, J.D. Dietz, S. Hummert, S. Rouw, S.G. Hegde, R.K. Webber, M.G. Obukowicz // *Endocrinology* – 2011. – V. 152 – N 8 – P.3123–34.

477. Conrado, D.J. Predicting the probability of successful efficacy of a dissociated agonist of

the glucocorticoid receptor from dose-response analysis. / D.J. Conrado, S. Krishnaswami, S. Shoji, S. Kolluri, J. Hey-Hadavi, D. McCabe, R. Rojo, B.K. Tammara // *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* – 2016. – V. 43 – N 3 – P.325–41.

478. Kurimoto, T. JTP-117968, a novel selective glucocorticoid receptor modulator, exhibits improved transrepression/transactivation dissociation. / T. Kurimoto, I. Tamai, A. Miyai, Y. Kosugi, T. Nakagawa, Y. Yamamoto, K. Deai, S. Misaki, Y. Bessho, T. Negoro, T. Yamaguchi, T. Hata, M. Matsushita // *European journal of pharmacology* – 2017. – V. 803 – P.179–186.

479. Edman, K. The discovery of potent and selective non-steroidal glucocorticoid receptor modulators, suitable for inhalation. / K. Edman, R. Ahlgren, M. Bengtsson, H. Bladh, S. Bäckström, J. Dahmén, K. Henriksson, P. Hillertz, V. Hulikal, A. Jerre, L. Kinchin, C. Kåse, M. Lepistö, I. Mile, S. Nilsson, A. Smailagic, J. Taylor, A. Tjörnebo, L. Wissler, T. Hansson // *Bioorganic & medicinal chemistry letters* – 2014. – V. 24 – N 11 – P.2571–7.

480. Swart, P. Biological activities of the shrub *Salsola tuberculiformis* Botsch.: contraceptive or stress alleviator? / P. Swart, A.C. Swart, A. Louw, K.J. van der Merwe // *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* – 2003. – V. 25 – N 6 – P.612–9.

481. Gauvreau, G.M. A nonsteroidal glucocorticoid receptor agonist inhibits allergen-induced late asthmatic responses. / G.M. Gauvreau, L.-P. Boulet, R. Leigh, D.W. Cockcroft, K.J. Killian, B.E. Davis, F. Deschesnes, R.M. Watson, V. Swystun, C.K. Mårdh, P. Wessman, C. Jorup, M. Aurivillius, P.M. O'Byrne // *American journal of respiratory and critical care medicine* – 2015. – V. 191 – N 2 – P.161–7.

482. Brinker, A.M. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae). / A.M. Brinker, J. Ma, P.E. Lipsky, I. Raskin // *Phytochemistry* – 2007. – V. 68 – N 6 – P.732–66.

483. Xiang, G. Anti-inflammatory actions of Caesalpinin M2 in experimental colitis as a selective glucocorticoid receptor modulator. / G. Xiang, M. Fan, Y. Ma, M. Wang, J. Gao, J. Chen, X. Li, W. Xue, Y. Wang, H. Gao, Y. Shen, Q. Xu // *Biochemical pharmacology* – 2018. – V. 150 – P.150–159.

484. Goldbach-Mansky, R. Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F versus sulfasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis: a randomized trial. / R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, R. Fleischmann, N. Olsen, J. Silverfield, P. Kempf, A. Kivitz, Y. Sherrer, F. Pucino, G. Csako, R. Costello, T.H. Pham, C. Snyder, D. van der Heijde, X. Tao, R. Wesley, P.E. Lipsky // *Annals of internal medicine* – 2009. – V. 151 – N 4 – P.229–40, W49-51.

485. Botschantzev, V. A Synopsis of *Salsola* (Chenopodiaceae) from South and South-West Africa / V. Botschantzev // *Kew Bulletin* – 1974. – V. 29 – N 3 – P.597.

486. Lange M. Prolonged gestation in karakul ewes in South West Africa / M. De Lange // *Proc*

4th Internat Congress Anim Reprod The Hague – 1961. – V. 3 – P.590–592.

487. Basson, P.A. “Grootlamsiekte”, a specific syndrome of prolonged gestation in sheep caused by a shrub *Salsola tuberculata* (Fenzl ex Moq) Schinz var. *tomentosa* C. A. Smith ex Aellen. / P.A. Basson, J.C. Morgenthal, R.B. Bilbrough, J.L. Marais, S.P. Kruger, J.L. van der Merwe // *The Onderstepoort journal of veterinary research* – 1969. – V. 36 – N 1 – P.59–103.

488. Geldenhuys, C.J. Floristic and Structural Composition of Wonderwoud Forest in the Wolkberg, North-Eastern Transvaal / C.J. Geldenhuys, F.J. Pieterse // *South African Forestry Journal* – 1993. – V. 164 – N 1 – P.9–19.

489. Wheeler, O.H. The Girard reagents / O.H. Wheeler // *Chem Reviews* – 1962. – V. 62 – P.205–221.

490. Swart, P. Micro-assay for sheep 11 beta-hydroxylase activity using high-performance liquid chromatography for steroid analysis. / P. Swart, P.C. Todres, A.C. Swart, K.J. Van der Merwe // *Journal of chromatography* – 1988. – V. 442 – P.424–30.

491. Merwe, K.J. Natural products affecting the gestation period of sheep and their mode of action / K.J. Merwe, J.-H.S. Hofmeyr, P. Swart, D.P. Parkin, J. Rossouw, J. Hartshome, S.J. Van Rensburg, J.C. Morgenthal, P.A. Basson // *S Afr J Sci* – 1976. – V. 72 – P.184.

492. Louw, A. Inhibition of cytochrome P450c11 by biogenic amines and an aziridine precursor, 2-(4-acetoxyphenyl)-2-chloro-N-methyl-ethylammonium chloride. / A. Louw, F. Allie, A.C. Swart, P. Swart // *Endocrine research* – 2000. – V. 26 – N 4 – P.729–36.

493. Swart, P. Inhibition of cytochrome P-450(11)beta by some naturally occurring acetophenones and plant extracts from the shrub *Salsola tuberculatifomis*. / P. Swart, K.J. van der Merwe, A.C. Swart, P.C. Todres, J.H. Hofmeyr // *Planta medica* – 1993. – V. 59 – N 2 – P.139–43.

494. Louw, A. *Salsola tuberculatifomis* Botschantzev and an aziridine precursor analog mediate the in vivo increase in free corticosterone and decrease in corticosteroid-binding globulin in female Wistar rats. / A. Louw, P. Swart // *Endocrinology* – 1999. – V. 140 – N 5 – P.2044–53.

495. Louw, A. Mechanism for the stabilization in vivo of the aziridine precursor --(4-acetoxyphenyl)-2-chloro-N-methyl-ethylammonium chloride by serum proteins. / A. Louw, P. Swart, S.S. de Kock, K.J. van der Merwe // *Biochemical pharmacology* – 1997. – V. 53 – N 2 – P.189–97.

496. Adcock, I.M. Glucocorticoid-regulated transcription factors. / I.M. Adcock // *Pulmonary pharmacology & therapeutics* – 2001. – V. 14 – N 3 – P.211–9.

497. Necela, B.M. Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. / B.M. Necela, J.A. Cidlowski // *Proceedings of the American Thoracic Society* – 2004. – V. 1 – N 3 – P.239–46.

498. Barnes, P.J. Glucocorticosteroids: current and future directions. / P.J. Barnes // *British journal of pharmacology* – 2011. – V. 163 – N 1 – P.29–43.

499. Robertson, S. Abrogation of glucocorticoid receptor dimerization correlates with dissociated glucocorticoid behavior of compound a. / S. Robertson, F. Allie-Reid, W. Vanden Berghe, K. Visser, A. Binder, D. Africander, M. Vismer, K. De Bosscher, J. Hapgood, G. Haegeman, A. Louw // *The Journal of biological chemistry* – 2010. – V. 285 – N 11 – P.8061–75.

500. Bosscher, K. A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. / K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, I.M.E. Beck, W. Van Molle, N. Hennuyer, J. Hapgood, C. Libert, B. Staels, A. Louw, G. Haegeman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2005. – V. 102 – N 44 – P.15827–32.

501. Gossye, V. A plant-derived glucocorticoid receptor modulator attenuates inflammation without provoking ligand-induced resistance. / V. Gossye, D. Elewaut, K. Van Beneden, P. Dewint, G. Haegeman, K. De Bosscher // *Annals of the rheumatic diseases* – 2010. – V. 69 – N 1 – P.291–6.

502. Beck, I.M. Compound A, a selective glucocorticoid receptor modulator, enhances heat shock protein Hsp70 gene promoter activation. / I.M. Beck, Z.J. Drebert, R. Hoya-Arias, A.A. Bahar, M. Devos, D. Clarisse, S. Desmet, N. Bougarne, B. Ruttens, V. Gossye, G. Denecker, S. Lievens, M. Bracke, J. Tavernier, W. Declercq, K. Gevaert, W. Vanden Berghe, G. Haegeman, K. De Bosscher // *PloS one* – 2013. – V. 8 – N 7 – P.e69115.

503. Bosscher, K. Selective modulation of the glucocorticoid receptor can distinguish between transrepression of NF- κ B and AP-1. / K. De Bosscher, I.M. Beck, L. Dejager, N. Bougarne, A. Gaigneaux, S. Chateauvieux, D. Ratman, M. Bracke, J. Tavernier, W. Vanden Berghe, C. Libert, M. Diederich, G. Haegeman // *Cellular and molecular life sciences : CMLS* – 2014. – V. 71 – N 1 – P.143–63.

504. Tanner, T.M. Anti-androgenic properties of Compound A, an analog of a non-steroidal plant compound. / T.M. Tanner, G. Verrijdt, W. Rombauts, A. Louw, J.P. Hapgood, F. Claessens // *Molecular and cellular endocrinology* – 2003. – V. 201 – N 1–2 – P.155–64.

505. Chebotaev, D. The tumor suppressor effect of the glucocorticoid receptor in skin is mediated via its effect on follicular epithelial stem cells. / D. Chebotaev, A. Yemelyanov, L. Zhu, R.M. Lavker, I. Budunova // *Oncogene* – 2007. – V. 26 – N 21 – P.3060–8.

506. Bosscher, K. De Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system? / K. De Bosscher, I.M. Beck, G. Haegeman // *Brain, behavior, and immunity* – 2010. – V. 24 – N 7 – P.1035–42.

507. Schäcke, H. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. / H. Schäcke, W.D. Döcke, K. Asadullah // *Pharmacology & therapeutics* – 2002. – V. 96 – N 1 – P.23–43.

508. Schäcke, H. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. / H. Schäcke, M. Berger, H. Rehwinkel, K. Asadullah // *Molecular and cellular endocrinology* – 2007. – V. 275 – N 1–2 – P.109–17.

509. Nixon, M. It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. / M. Nixon, R. Andrew, K.E. Chapman // *Steroids* – 2013. – V. 78 – N 1 – P.59–68.
510. Striz, I. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. / I. Striz, E. Brabcova, L. Kolesar, A. Sekerkova // *Clinical science* – 2014. – V. 126 – N 9 – P.593–612.
511. Barnes, P.J. Achieving asthma control. / P.J. Barnes // *Current medical research and opinion* – 2005. – V. 21 Suppl 4 – P.S5-9.
512. Oh, S. The role of protein modifications of T-bet in cytokine production and differentiation of T helper cells. / S. Oh, E.S. Hwang // *Journal of immunology research* – 2014. – V. 2014 – P.589672.
513. Oh, H. NF- κ B: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. / H. Oh, S. Ghosh // *Immunological reviews* – 2013. – V. 252 – N 1 – P.41–51.
514. Hoesel, B. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. / B. Hoesel, J.A. Schmid // *Molecular cancer* – 2013. – V. 12 – P.86.
515. Zhang, Y. Th1/Th2 cell's function in immune system. / Y. Zhang, Y. Zhang, W. Gu, L. He, B. Sun // *Advances in experimental medicine and biology* – 2014. – V. 841 – P.45–65.
516. Wan, Y.Y. GATA3: a master of many trades in immune regulation. / Y.Y. Wan // *Trends in immunology* – 2014. – V. 35 – N 6 – P.233–42.
517. Zhang, Y. TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals. / Y. Zhang, Y. Zhang, W. Gu, B. Sun // *Advances in experimental medicine and biology* – 2014. – V. 841 – P.15–44.
518. Liberman, A.C. Compound A, a dissociated glucocorticoid receptor modulator, inhibits T-bet (Th1) and induces GATA-3 (Th2) activity in immune cells. / A.C. Liberman, M. Antunica-Noguerol, V. Ferraz-de-Paula, J. Palermo-Neto, C.N. Castro, J. Druker, F. Holsboer, M.J. Perone, S. Gerlo, K. De Bosscher, G. Haegeman, E. Arzt // *PloS one* – 2012. – V. 7 – N 4 – P.e35155.
519. Rauner, M. Effects of the selective glucocorticoid receptor modulator compound A on bone metabolism and inflammation in male mice with collagen-induced arthritis. / M. Rauner, S. Thiele, K. Sinnigen, M. Winzer, J. Salbach-Hirsch, I. Gloe, K. Peschke., G. Haegeman, J.P. Tuckermann, L.C. Hofbauer // *Endocrinology* – 2013. – V. 154 – N 10 – P.3719–28.
520. Loo, G. Antiinflammatory properties of a plant-derived nonsteroidal, dissociated glucocorticoid receptor modulator in experimental autoimmune encephalomyelitis. / G. van Loo, M. Sze, N. Bougarne, J. Praet, C. Mc Guire, A. Ullrich, G. Haegeman, M. Prinz, R. Beyaert, K. De Bosscher // *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* – 2010. – V. 24 – N 2 – P.310–22.
521. Zhang, Z. Compound A, a plant origin ligand of glucocorticoid receptors, increases regulatory T cells and M2 macrophages to attenuate experimental autoimmune neuritis with reduced side effects. / Z. Zhang, Z.-Y. Zhang, H.J. Schluesener // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* – 2009. – V. 183 – N 5 – P.3081–91.

522. Wüst, S. Therapeutic and adverse effects of a non-steroidal glucocorticoid receptor ligand in a mouse model of multiple sclerosis. / S. Wüst, D. Tischner, M. John, J.P. Tuckermann, C. Menzfeld, U.-K. Hanisch, J. van den Brandt, F. Lühder, H.M. Reichardt // *PloS one* – 2009. – V. 4 – N 12 – P.e8202.
523. Reber, L.L. A dissociated glucocorticoid receptor modulator reduces airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of asthma. / L.L. Reber, F. Daubeuf, M. Plantinga, L. De Cauwer, S. Gerlo, W. Waelput, S. Van Calenbergh, J. Tavernier, G. Haegeman, B.N. Lambrecht, N. Frossard, K. De Bosscher // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* – 2012. – V. 188 – N 7 – P.3478–87.
524. Bosscher, K. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. / K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, G. Haegeman // *Oncogene* – 2006. – V. 25 – N 51 – P.6868–86.
525. Huynh, T. Selective modulation through the glucocorticoid receptor ameliorates muscle pathology in mdx mice. / T. Huynh, K. Uaesoontrachoon, J.L. Quinn, K.S. Tatem, C.R. Heier, J.H. Van Der Meulen, Q. Yu, M. Harris, C.J. Nolan, G. Haegeman, M.D. Grounds, K. Nagaraju // *The Journal of pathology* – 2013. – V. 231 – N 2 – P.223–35.
526. Haapakoski, R. Intradermal cytosine-phosphate-guanosine treatment reduces lung inflammation but induces IFN- γ -mediated airway hyperreactivity in a murine model of natural rubber latex allergy. / R. Haapakoski, P. Karisola, N. Fyhrquist, T. Savinko, H. Wolff, K. Turjanmaa, T. Palosuo, T. Reunala, A. Lauerma, H. Alenius // *American journal of respiratory cell and molecular biology* – 2011. – V. 44 – N 5 – P.639–47.
527. Reuter, K.C. Selective glucocorticoid receptor agonists for the treatment of inflammatory bowel disease: studies in mice with acute trinitrobenzene sulfonic acid colitis. / K.C. Reuter, C.R. Grunwitz, B.M. Kaminski, D. Steinhilber, H.H. Radeke, J. Stein // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* – 2012. – V. 341 – N 1 – P.68–80.
528. Dewint, P. A plant-derived ligand favoring monomeric glucocorticoid receptor conformation with impaired transactivation potential attenuates collagen-induced arthritis. / P. Dewint, V. Gossye, K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, K. Van Beneden, D. Deforce, S. Van Calenbergh, U. Müller-Ladner, B. Vander Cruyssen, G. Verbruggen, G. Haegeman, D. Elewaut // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* – 2008. – V. 180 – N 4 – P.2608–15.
529. Pugazhenthii, S. Induction of an inflammatory loop by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α involves NF- κ B and STAT-1 in differentiated human neuroprogenitor cells. / S. Pugazhenthii, Y. Zhang, R. Bouchard, G. Mahaffey // *PloS one* – 2013. – V. 8 – N 7 – P.e69585.
530. Kim, S.-Y. Tunicamycin inhibits Toll-like receptor-activated inflammation in RAW264.7 cells by suppression of NF- κ B and c-Jun activity via a mechanism that is independent of ER-stress and N-glycosylation. / S.-Y. Kim, J.-S. Hwang, I.-O. Han // *European journal of pharmacology* – 2013. – V. 721 – N 1–3 – P.294–300.

531. Saksida, T. Compound A, a selective glucocorticoid receptor agonist, inhibits immunoinflammatory diabetes, induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. / T. Saksida, M. Vujicic, I. Nikolic, I. Stojanovic, G. Haegeman, S. Stosic-Grujicic // *British journal of pharmacology* – 2014. – V. 171 – N 24 – P.5898–909.

532. Suttitheptumrong, A. Compound A, a dissociated glucocorticoid receptor modulator, reduces dengue virus-induced cytokine secretion and dengue virus production. / A. Suttitheptumrong, S. Khunchai, J. Panaampon, U. Yasamut, A. Morchang, C. Puttikhunt, S. Noisakran, G. Haegeman, P.-T. Yenchitsomanus, T. Limjindaporn // *Biochemical and biophysical research communications* – 2013. – V. 436 – N 2 – P.283–8.

533. Budunova, I. V Glucocorticoid receptor functions as a potent suppressor of mouse skin carcinogenesis. / I.V. Budunova, D. Kowalczyk, P. Pérez, Y.J. Yao, J.L. Jorcano, T.J. Slaga // *Oncogene* – 2003. – V. 22 – N 21 – P.3279–87.

534. Jo, J.-C. Initial cytoreductive treatment with thalidomide plus bolus vincristine/doxorubicin and reduced dexamethasone followed by autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. / J.-C. Jo, B.W. Kang, S.J. Sym, S.S. Lee, G. Jang, S. Kim, D.H. Lee, S.-W. Kim, J.S. Lee, C. Suh // *Investigational new drugs* – 2011. – V. 29 – N 1 – P.175–81.

535. Buda, G. Bortezomib with thalidomide plus dexamethasone compared with thalidomide plus doxorubicin and dexamethasone as induction therapy in previously untreated multiple myeloma patients. / G. Buda, E. Orciuolo, G. Carulli, S. Galimberti, F. Ghio, G. Cervetti, M. Pelosini, M. Petrini // *Acta haematologica* – 2013. – V. 129 – N 1 – P.35–9.

536. Romano, A. Salvage therapy with pegylated liposomal doxorubicin, bortezomib, cyclophosphamide, and dexamethasone in relapsed/refractory myeloma patients. / A. Romano, A. Chiarenza, C. Conticello, M. Cavalli, C. Vetro, C. Di Raimondo, R. Cunsolo, G.A. Palumbo, F. Di Raimondo // *European journal of haematology* – 2014. – V. 93 – N 3 – P.207–13.

537. Oki, Y. Prospective phase II study of rituximab with alternating cycles of hyper-CVAD and high-dose methotrexate with cytarabine for young patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. / Y. Oki, J.R. Westin, F. Vega, H. Chuang, N. Fowler, S. Neelapu, F.B. Hagemeister, P. McLaughlin, L.W. Kwak, J.E. Romaguera, M. Fanale, A. Younes, M.A. Rodriguez, R.Z. Orlowski, M. Wang, S.T. Ouzounian, F. Samaniego, L. Fayad // *British journal of haematology* – 2013. – V. 163 – N 5 – P.611–20.

538. Yemelyanov, A. Differential targeting of androgen and glucocorticoid receptors induces ER stress and apoptosis in prostate cancer cells: a novel therapeutic modality. / A. Yemelyanov, P. Bhalla, X. Yang, A. Ugolkov, K. Iwadate, A. Karseladze, I. Budunova // *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* – 2012. – V. 11 – N 2 – P.395–406.

539. Richardson, P.G. Proteasome inhibition in hematologic malignancies. / P.G. Richardson, T.

Hideshima, C. Mitsiades, K. Anderson // *Annals of medicine* – 2004. – V. 36 – N 4 – P.304–14.

540. Goy, A. Update on the proteasome inhibitor bortezomib in hematologic malignancies. / A. Goy, F. Gilles // *Clinical lymphoma* – 2004. – V. 4 – N 4 – P.230–7.

541. Wallace, A.D. Lysine 419 targets human glucocorticoid receptor for proteasomal degradation. / A.D. Wallace, Y. Cao, S. Chandramouleeswaran, J.A. Cidlowski // *Steroids* – 2010. – V. 75 – N 12 – P.1016–23.

542. Wallace, A.D. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. / A.D. Wallace, J.A. Cidlowski // *The Journal of biological chemistry* – 2001. – V. 276 – N 46 – P.42714–21.

543. Zhang, L. Bcl-2 protects lymphoma cells from apoptosis but not growth arrest promoted by cAMP and dexamethasone. / L. Zhang, P.A. Insel // *American journal of physiology. Cell physiology* – 2001. – V. 281 – N 5 – P.1642-7.

544. Melhem, A. Administration of glucocorticoids to ovarian cancer patients is associated with expression of the anti-apoptotic genes SGK1 and MKP1/DUSP1 in ovarian tissues. / A. Melhem, S.D. Yamada, G.F. Fleming, B. Delgado, D.R. Brickley, W. Wu, M. Kocherginsky, S.D. Conzen // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* – 2009. – V. 15 – N 9 – P.3196–204.

545. Isikbay, M. Glucocorticoid receptor activity contributes to resistance to androgen-targeted therapy in prostate cancer. / M. Isikbay, K. Otto, S. Kregel, J. Kach, Y. Cai, D.J. Vander Griend, S.D. Conzen, R.Z. Szmulewitz // *Hormones & cancer* – 2014. – V. 5 – N 2 – P.72–89.

546. Rossum, E.F.C. Glucocorticoid resistance. / E.F.C. van Rossum, E.L.T. van den Akker // *Endocrine development* – 2011. – V. 20 – P.127–36.

547. Ramamoorthy, S. Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. / S. Ramamoorthy, J.A. Cidlowski // *Molecular and cellular biology* – 2013. – V. 33 – N 9 – P.1711–22.

548. Wiederrecht, G. Characterization of high molecular weight FK-506 binding activities reveals a novel FK-506-binding protein as well as a protein complex. / G. Wiederrecht, S. Hung, H.K. Chan, A. Marcy, M. Martin, J. Calaycay, D. Boulton, N. Sigal, R.L. Kincaid, J.J. Siekierka // *The Journal of biological chemistry* – 1992. – V. 267 – N 30 – P.21753–60.

549. Chun, E. Dexamethasone-induced FKBP51 expression in peripheral blood mononuclear cells could play a role in predicting the response of asthmatics to treatment with corticosteroids. / E. Chun, H.-S. Lee, B.-R. Bang, T.-W. Kim, S.-H. Lee, J.-H. Kim, S.-H. Cho, K.-U. Min, Y.-Y. Kim, H.-W. Park // *Journal of clinical immunology* – 2011. – V. 31 – N 1 – P.122–7.

550. Stechschulte, L.A. FKBP51-a selective modulator of glucocorticoid and androgen

sensitivity. / L.A. Stechschulte, E.R. Sanchez // *Current opinion in pharmacology* – 2011. – V. 11 – N 4 – P.332–7.

551. Barnes, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. / P.J. Barnes // *Clinical science (London, England : 1979)* – 1998. – V. 94 – N 6 – P.557–72.

552. Resche-Rigon, M. Therapeutic potential of selective modulators of nuclear receptor action. / M. Resche-Rigon, H. Gronemeyer // *Current opinion in chemical biology* – 1998. – V. 2 – N 4 – P.501–7.

553. Baida, G. REDD1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. / G. Baida, P. Bhalla, K. Kirsanov, E. Lesovaya, M. Yakubovskaya, K. Yuen, S. Guo, R.M. Lavker, B. Readhead, J.T. Dudley, I. Budunova // *EMBO molecular medicine* – 2015. – V. 7 – N 1 – P.42–58.

554. Shimizu, N. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. / N. Shimizu, N. Yoshikawa, N. Ito, T. Maruyama, Y. Suzuki, S. Takeda, J. Nakae, Y. Tagata, S. Nishitani, K. Takehana, M. Sano, K. Fukuda, M. Suematsu, C. Morimoto, H. Tanaka // *Cell metabolism* – 2011. – V. 13 – N 2 – P.170–82.

555. Thiele, S. Selective glucocorticoid receptor modulation maintains bone mineral density in mice. / S. Thiele, N. Ziegler, E. Tsourdi, K. De Bosscher, J.P. Tuckermann, L.C. Hofbauer, M. Rauner // *Journal of bone and mineral research* – 2012. – V. 27 – N 11 – P.2242–50.

556. Rauner, M. Dissociation of osteogenic and immunological effects by the selective glucocorticoid receptor agonist, compound A, in human bone marrow stromal cells. / M. Rauner, C. Goettsch, N. Stein, S. Thiele, M. Bornhaeuser, K. De Bosscher, G. Haegeman, J. Tuckermann, L.C. Hofbauer // *Endocrinology* – 2011. – V. 152 – N 1 – P.103–12.

557. Schoepe, S. Test systems for the determination of glucocorticoid receptor ligand induced skin atrophy. / Schoepe S., Schäcke H., Asadullah K. // *Dermato-endocrinology* – 2011. – V. 3 – N 3 – P.175–9.

558. Klopot, A. Selective Activator of the Glucocorticoid Receptor Compound A Dissociates Therapeutic and Atrophogenic Effects of Glucocorticoid Receptor Signaling in Skin. / A. Klopot, G. Baida, P. Bhalla, G. Haegeman, I. Budunova // *Journal of cancer prevention* – 2015. – V. 20 – N 4 – P.250–9.

559. Bosscher, K. Selective Glucocorticoid Receptor modulators. / K. De Bosscher // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* – 2010. – V. 120 – N 2–3 – P.96–104.

560. Lee, T.W. A concise asymmetric route for the synthesis of a novel class of glucocorticoid mimetics containing a trifluoromethyl-substituted alcohol. / T.W. Lee, J.R. Proudfoot, D.S. Thomson // *Bioorganic & medicinal chemistry letters* – 2006. – V. 16 – N 3 – P.654–7.

561. Lin, C.W. trans-Activation and repression properties of the novel nonsteroid glucocorticoid

receptor ligand 2,5-dihydro-9-hydroxy-10-methoxy-2,2,4-trimethyl-5-(1-methylcyclohexen-3-yl)-1H-[1]benzopyrano[3,4-f]quinoline (A276575) and its four stereoisomers. / C.W. Lin, M. Nakane, M. Stashko, D. Falls, J. Kuk, L. Miller, R. Huang, C. Tyree, J.N. Miner, J. Rosen, P.R. Kym, M.J. Coghlan, G. Carter, B.C. Lane // *Molecular pharmacology* – 2002. – V. 62 – N 2 – P.297–303.

562. Shoshani, T. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. / T. Shoshani, A. Faerman, I. Mett, E. Zelin, T. Tenne, S. Gorodin, Y. Moshel, S. Elbaz, A. Budanov, A. Chajut, H. Kalinski, I. Kamer, A. Rozen, O. Mor, E. Keshet, D. Leshkowitz, P. Einat, R. Skaliter, E. Feinstein // *Molecular and cellular biology* – 2002. – V. 22 – N 7 – P.2283–93.

563. 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, B.D. Manning, J.H. Reiling, E. Hafen, L.A. Witters, L.W. Ellisen, W.G. Kaelin // *Genes & development* – 2004. – V. 18 – N 23 – P.2893–904.

564. Reiling, J.H. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in Drosophila. / J.H. Reiling, E. Hafen // *Genes & development* – 2004. – V. 18 – N 23 – P.2879–92.

565. Watson, A. Iron depletion suppresses mTORC1-directed signalling in intestinal Caco-2 cells via induction of REDD1. / A. Watson., C. Lipina, H.J. McArdle, P.M. Taylor, H.S. Hundal // *Cellular signalling* – 2016. – V. 28 – N 5 – P.412–424.

566. Lipina, C. Is REDD1 a Metabolic Éminence Grise? / C. Lipina, H.S. Hundal // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* – 2016. – V. 27 – N 12 – P.868–880.

567. 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, N.V. Grishin, J. Brugarolas, X. Zhang // *Biochemistry* – 2010. – V. 49 – N 11 – P.2491–501.

568. Dungan, C.M. 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. – V. 453 – N 4 – P.778–83.

569. Regazzetti, C. Regulated in development and DNA damage responses -1 (REDD1) protein contributes to insulin signaling pathway in adipocytes. / C. Regazzetti, K. Dumas, Y. Le Marchand-Brustel, P. Peraldi, J.-F. Tanti, S. Giorgetti-Peraldi // *PloS one* – 2012. – V. 7 – N 12 – P.e52154.

570. Laplante, M. mTOR signaling in growth control and disease. / M. Laplante, D.M. Sabatini // *Cell* – 2012. – V. 149 – N 2 – P.274–93.

571. Sahra, I. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. / I. Ben Sahra, C. Regazzetti, G. Robert, K. Laurent, Y. Le Marchand-Brustel, P. Auberger, J.-F. Tanti, S. Giorgetti-Peraldi, F. Bost // *Cancer research* – 2011. – V. 71 – N 13 – P.4366–72.

572. Williamson, D.L. Altered nutrient response of mTORC1 as a result of changes in REDD1 expression: effect of obesity vs. REDD1 deficiency. / D.L. Williamson, Z. Li, R.M. Tuder, E. Feinstein, S.R. Kimball, C.M. Dungan // *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) – 2014. – V. 117 – N 3 – P.246–56.

573. Bartolomé, A. Pancreatic β -cell failure mediated by mTORC1 hyperactivity and autophagic impairment. / A. Bartolomé, M. Kimura-Koyanagi, S.-I. Asahara, C. Guillén, H. Inoue, K. Teruyama, S. Shimizu, A. Kanno, A. García-Aguilar, M. Koike, Y. Uchiyama, M. Benito, T. Noda, Y. Kido // *Diabetes* – 2014. – V. 63 – N 9 – P.2996–3008.

574. Horton, J.D. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. / J.D. Horton, J.L. Goldstein, M.S. Brown // *The Journal of clinical investigation* – 2002. – V. 109 – N 9 – P.1125–31.

575. Brown, N.F. The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. / N.F. Brown, M. Stefanovic-Racic, I.J. Sipula, G. Perdomo // *Metabolism: clinical and experimental* – 2007. – V. 56 – N 11 – P.1500–7.

576. Schupp, M. Metabolite and transcriptome analysis during fasting suggest a role for the p53-Ddit4 axis in major metabolic tissues. / M. Schupp, F. Chen, E.R. Briggs, S. Rao, H.J. Pelzmann, A.R. Pessentheiner, J.G. Bogner-Strauss, M.A Lazar., D. Baldwin, A. Prokesch // *BMC genomics* – 2013. – V. 14 – P.758.

577. Horak, P. Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis. / P. Horak, A.R. Crawford, D.D. Vadysirisack, Z.M. Nash, M.P. DeYoung, D. Sgroi, L.W. Ellisen // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2010. – V. 107 – N 10 – P.4675–80.

578. 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, A. Yang, H. Beppu, K. Minda, J.D. Oliner, F. McKeon, D.A. Haber // *Molecular cell* – 2002. – V. 10 – N 5 – P.995–1005.

579. Qiao, S. A REDD1/TXNIP pro-oxidant complex regulates ATG4B activity to control stress-induced autophagy and sustain exercise capacity. / S. Qiao, M. Dennis, X. Song, D.D. Vadysirisack, D. Salunke, Z. Nash, Z. Yang, M. Liesa, J. Yoshioka, S.-I. Matsuzawa, O.S. Shirihai, R.T. Lee, J.C. Reed, L.W. Ellisen // *Nature communications* – 2015. – V. 6 – P.7014.

580. 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, F. Zhong, F. Xu, C.W. Distelhorst // *The Journal of biological chemistry* – 2003. – V. 278 – N 29 – P.27053–8.

581. Jawhari, S. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone “ménage-à-trois”. / S. Jawhari, M.-H. Ratinaud, M. Verdier // *Cell death & disease* – 2016. – V. 7 – N 10 – P.e2434.

582. Hu, Y.-L. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. / Y.-L. Hu, M. DeLay, A. Jahangiri, A.M. Molinaro, S.D. Rose, W.S. Carbonell, M.K. Aghi // *Cancer research* – 2012. – V. 72 – N 7 – P.1773–83.

583. Zeng, Q. Inhibition of REDD1 Sensitizes Bladder Urothelial Carcinoma to Paclitaxel by Inhibiting Autophagy. / Q. Zeng, J. Liu, P. Cao, J. Li, X. Liu, X. Fan, L. Liu, Y. Cheng, W. Xiong, J. Li, Bo H., Y. Zhu, F. Yang, J. Hu, M. Zhou, Y. Zhou, Q. Zou, J. Zhou, K. Cao // *Clinical cancer research* – 2018. – V. 24 – N 2 – P.445–459.

584. Conza, G. Di The mTOR and PP2A Pathways Regulate PHD2 Phosphorylation to Fine-Tune HIF1 α Levels and Colorectal Cancer Cell Survival under Hypoxia. / G. Di Conza, S. Trusso Cafarello, S. Loroch, D. Mennerich, S. Deschoemaeker, M. Di Matteo, M. Ehling, K. Gevaert, H. Prenen, R.P. Zahedi, A. Sickmann, Kietzmann T., F. Moretti, M. Mazzone // *Cell reports* – 2017. – V. 18 – N 7 – P.1699–1712.

585. Ellisen, L.W. Growth control under stress: mTOR regulation through the REDD1-TSC pathway. / L.W. Ellisen // *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* – 2005. – V. 4 – N 11 – P.1500-02.

586. Denny, W.B. Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. / W.B. Denny, D.L. Valentine, P.D. Reynolds, D.F. Smith, J.G. Scammell // *Endocrinology* – 2000. – V. 141 – N 11 – P.4107–13.

587. Romano, S. FKBP51 and the NF- κ B regulatory pathway in cancer. / S. Romano, M. Mallardo, M.F. Romano // *Current opinion in pharmacology* – 2011. – V. 11 – N 4 – P.288–93.

588. Reynolds, P.D. Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51. / P.D. Reynolds, Y. Ruan, D.F. Smith, J.G. Scammell // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* – 1999. – V. 84 – N 2 – P.663–9.

589. Bouwmeester, T. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. / T. Bouwmeester, A. Bauch, H. Ruffner, P.-O. Angrand, G. Bergamini, K. Croughton, C. Cruciat, D. Eberhard, J. Gagneur, S. Ghidelli, C. Hopf, B. Huhse, R. Mangano, A.-M. Michon, M. Schirle, J. Schlegl, M. Schwab, M.A. Stein, A. Bauer, G. Casari, G. Drewes, A.-C. Gavin, D.B. Jackson, G. Joberty, G. Neubauer, J. Rick, B. Kuster, G. Superti-Furga // *Nature cell biology* – 2004. – V. 6 – N 2 – P.97–105.

590. Yu, H.-M. Silencing of FKBP51 alleviates the mechanical pain threshold, inhibits DRG inflammatory factors and pain mediators through the NF-kappaB signaling pathway. / H.-M. Yu, Q. Wang, W.-B. Sun // *Gene* – 2017. – V. 627 – P.169–175.

591. Giraudier, S. Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. / S. Giraudier, H. Chagraoui, E. Komura, S. Barnache, B. Blanchet, J.P. LeCouedic, D.F. Smith, F. Larbret, A.-L. Taksin, F. Moreau-Gachelin, N. Casadevall, M. Tulliez, A. Hulin, N. Debili, W. Vainchenker // *Blood* – 2002. – V. 100 – N 8 – P.2932–

40.

592. Wang, L. FKBP51 regulation of AKT/protein kinase B phosphorylation. / L. Wang // *Current opinion in pharmacology* – 2011. – V. 11 – N 4 – P.360–4.

593. Jinwal, U.K. The Hsp90 cochaperone, FKBP51, increases Tau stability and polymerizes microtubules. / U.K. Jinwal, J. Koren, S.I. Borysov, A.B. Schmid, J.F. Abisambra, L.J. Blair, A.G. Johnson, J.R. Jones, C.L. Shults, J.C. O’Leary, Y. Jin, J. Buchner, M.B. Cox, C.A. Dickey // *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* – 2010. – V. 30 – N 2 – P.591–9.

594. Romano, S. Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells. / S. Romano, A. D’Angelillo, R. Pacelli, S. Staibano, E. De Luna, R. Bisogni, E.-L. Eskelinen, M. Mascolo, G. Cali, C. Arra, M.F. Romano // *Cell death and differentiation* – 2010. – V. 17 – N 1 – P.145–57.

595. Cioffi, D.L. Organization and function of the FKBP52 and FKBP51 genes. / D.L. Cioffi, T.R. Hubler, J.G. Scammell // *Current opinion in pharmacology* – 2011. – V. 11 – N 4 – P.308–13.

596. Gassen, N.C. FKBP5/FKBP51 enhances autophagy to synergize with antidepressant action. / N.C. Gassen, J. Hartmann, M.V. Schmidt, T. Rein // *Autophagy* – 2015. – V. 11 – N 3 – P.578–80.

597. Pereira, M.J. FKBP5 expression in human adipose tissue increases following dexamethasone exposure and is associated with insulin resistance. / M.J. Pereira, J. Palming, M.K. Svensson, M. Rizell, J. Dalenbäck, M. Hammar, T. Fall, C.O. Sidibeh, P.-A. Svensson, J.W. Eriksson // *Metabolism: clinical and experimental* – 2014. – V. 63 – N 9 – P.1198–208.

598. Gassen, N.C. Chaperoning epigenetics: FKBP51 decreases the activity of DNMT1 and mediates epigenetic effects of the antidepressant paroxetine. / N.C. Gassen, G.R. Fries, A.S. Zannas, J. Hartmann, J. Zschocke, K. Hafner, T. Carrillo-Roa, J. Steinbacher, S.N. Preißinger, L. Hoeijmakers, M. Knop, F. Weber, S. Kloiber, S. Lucae, G.P. Chrousos, T. Carell, M. Ising, E.B. Binder, M.V. Schmidt, J. Rüegg, T. Rein // *Science signaling* – 2015. – V. 8 – N 404 – P.ra119.

599. Fichna, M. FKBP5 polymorphism is associated with insulin resistance in children and adolescents with obesity. / M. Fichna, I. Krzyśko-Pieczka, M. Żurawek, B. Skowrońska, D. Januszkiewicz-Lewandowska, P. Fichna // *Obesity research & clinical practice* – V. 12 – N 1S1 – P.62–70.

600. Fries, G.R. The FKBP51 Glucocorticoid Receptor Co-Chaperone: Regulation, Function, and Implications in Health and Disease. / G.R. Fries, N.C. Gassen, T. Rein // *International journal of molecular sciences* – 2017. – V. 18 – N 12.

601. Baxter, R.C. IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. / R.C. Baxter // *Nature reviews. Cancer* – 2014. – V. 14 – N 5 – P.329–41.

602. Jones, J.I. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. / J.I. Jones, A. Gockerman, W.H.

Busby, G. Wright, D.R. Clemmons // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1993. – V. 90 – N 22 – P.10553–7.

603. Zhang, X. Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits breast cancer cell motility. / X. Zhang, D. Yee // *Cancer research* – 2002. – V. 62 – N 15 – P.4369–75.

604. Renehan, A.G. Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis. / A.G. Renehan, J. Frystyk, A. Flyvbjerg // *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* – 2006. – V. 17 – N 8 – P.328–36.

605. Rettenmeier, R. Isolation and characterization of the human tyrosine aminotransferase gene. / R. Rettenmeier, E. Natt, H. Zentgraf, G. Scherer // *Nucleic acids research* – 1990. – V. 18 – N 13 – P.3853–61.

606. Delbaere, L.T.J. Structure/function studies of phosphoryl transfer by phosphoenolpyruvate carboxykinase. / L.T.J. Delbaere, A.M. Sudom, L. Prasad, Y. Leduc, H. Goldie // *Biochimica et biophysica acta* – 2004. – V. 1697 – N 1–2 – P.271–8.

607. Ghosh, A. The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. / A. Ghosh, J.-J. Shieh, C.-J. Pan, M.-S. Sun, J.Y. Chou // *The Journal of biological chemistry* – 2002. – V. 277 – N 36 – P.32837–42.

608. Wang, X. Inducible nitric-oxide synthase expression is regulated by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. / Wang X., Q. Zhao, R. Matta, X. Meng, X. Liu, C.-G. Liu, L.D. Nelin, Y. Liu // *The Journal of biological chemistry* – 2009. – V. 284 – N 40 – P.27123–34.

609. Wang, J. ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. / J. Wang, J.-Y. Zhou, G.S. Wu // *Cancer research* – 2007. – V. 67 – N 24 – P.11933–41.

610. Cortes-Sempere, M. MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF-kappaB and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. / M. Cortes-Sempere, S. Chattopadhyay, A. Rovira, V. Rodriguez-Fanjul, C. Belda-Iniesta, M. Tapia, P. Cejas, R. Machado-Pinilla, C. Manguan-García, I. Sánchez-Pérez, M. Nistal, C. Moratilla, J. de Castro-Carpeño, M. Gonzalez-Barón, J. Albanell, R. Perona // *Cancer letters* – 2009. – V. 286 – N 2 – P.206–16.

611. Haagenson, K.K. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. / K.K. Haagenson, G.S. Wu // *Cancer metastasis reviews* – 2010. – V. 29 – N 1 – P.143–9.

612. Ayroldi, E. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. / E. Ayroldi, C. Riccardi // *FASEB journal* – 2009. – V. 23 – N 11 – P.3649–58.

613. Lekva, T. The glucocorticoid-induced leucine zipper gene (GILZ) expression decreases after successful treatment of patients with endogenous Cushing's syndrome and may play a role in glucocorticoid-induced osteoporosis. / T. Lekva, J. Bollerslev, C. Kristo, O.K. Olstad, T. Ueland, R. Jemtland // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* – 2010. – V. 95 – N 1 – P.246–55.

614. Nguyen, P. Prenatal glucocorticoid exposure programs adrenal PNMT expression and adult hypertension. / P. Nguyen, S. Khurana, H. Peltsch, J. Grandbois, J. Eibl, J. Crispo, D. Ansell, T.C. Tai // *The Journal of endocrinology* – 2015. – V. 227 – N 2 – P.117–27.
615. Resch, M. Hyperaldosteronism and altered expression of an SGK1-dependent sodium transporter in ZDF rats leads to salt dependence of blood pressure. / M. Resch, T. Bergler, S. Fredersdorf, D.P. Griese, J. Weil, P. Kreuzer, S. Brunner, G.A.J. Riegger, A. Luchner, D.H. Endemann // *Hypertension research* – 2010. – V. 33 – N 10 – P.1082–8.
616. Umbach, A.T. SGK1-dependent salt appetite in pregnant mice. / A.T. Umbach, G. Pathare, M. Föllner, J.J. Brosens, F. Artunc, F. Lang // *Acta physiologica (Oxford, England)* – 2011. – V. 202 – N 1 – P.39–45.
617. Kawarazaki, H. Mineralocorticoid receptor--Rac1 activation and oxidative stress play major roles in salt-induced hypertension and kidney injury in prepubertal rats. / H. Kawarazaki, K. Ando, S. Shibata, K. Muraoka, M. Fujita, C. Kawarasaki, T. Fujita // *Journal of hypertension* – 2012. – V. 30 – N 10 – P.1977–85.
618. Shanmugam, I. Serum/glucocorticoid-induced protein kinase-1 facilitates androgen receptor-dependent cell survival. / I. Shanmugam, G. Cheng, P.F. Terranova, J.B. Thrasher, C.P. Thomas, B. Li // *Cell death and differentiation* – 2007. – V. 14 – N 12 – P.2085–94.
619. Lang, F. (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. / F. Lang, C. Böhmer, M. Palmada, G. Seebohm, N. Strutz-Seebohm, V. Vallon // *Physiological reviews* – 2006. – V. 86 – N 4 – P.1151–78.
620. Lang, F. Targeting SGK1 in diabetes. / F. Lang, A. Görlach, V. Vallon // *Expert opinion on therapeutic targets* – 2009. – V. 13 – N 11 – P.1303–11.
621. Lang, F. Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. / F. Lang, C. Stournaras // *Hormones* – V. 12 – N 2 – P.160–71.
622. Gavriatopoulou, M. Dickkopf-1: a suitable target for the management of myeloma bone disease. / M. Gavriatopoulou, M.-A. Dimopoulos, D. Christoulas, M. Migkou, M. Iakovaki, M. Gkatzamanidou, E. Terpos // *Expert opinion on therapeutic targets* – 2009. – V. 13 – N 7 – P.839–48.
623. Gupta, S.C. Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs / S.C. Gupta, B. Sung, S. Prasad, L.J. Webb, B.B. Aggarwal // *Trends Pharmacol Sci* – 2013. – V. 34 – N 9 – P.508–517.
624. Шуляк, Р. Фармацевтический рынок России / Р. Шуляк, Ю. Нечаева, Н. Гудошникова, И. Майзель // *Годовой отчет GSM GROUP* – 2016. – С. 100.
625. Rotella, D.P. Drug discovery 2012 and beyond / D.P. Rotella // *ACS Med Chem Lett* – 2012. – V. 3 – N 3 – P.172–173.
626. Jin, G. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into

- efficient pipelines / G. Jin, S.T. Wong // *Drug Discov Today* – 2014. – V. 19 – N 5 – P.637–644.
627. Pfister, D.G. Off-label use of oncology drugs: the need for more data and then some / D.G. Pfister // *J Clin Oncol* – 2012. – V. 30 – N 6 – P.584–586.
628. Swamidass, S.J. Mining small-molecule screens to repurpose drugs / S.J. Swamidass // *Brief Bioinform* – 2011. – V. 12 – N 4 – P.327–335.
629. Jin, G. A novel method of transcriptional response analysis to facilitate drug repositioning for cancer therapy / G. Jin, C. Fu, H. Zhao, K. Cui, J. Chang, S.T. Wong // *Cancer Res* – 2012. – V. 72 – N 1 – P.33–44.
630. McCabe, B. Repurposing medicinal compounds for blood cancer treatment / B. McCabe, F. Liberante, K.I. Mills // *Ann Hematol* – 2015. – V. 94 – N 8 – P.1267–1276.
631. Fu, C. DrugMap Central: an on-line query and visualization tool to facilitate drug repositioning studies / C. Fu, G. Jin, J. Gao, R. Zhu, E. Ballesteros-Villagrana, S.T. Wong // *Bioinformatics* – 2013. – V. 29 – N 14 – P.1834–1836.
632. Zhao, H. Novel modeling of cancer cell signaling pathways enables systematic drug repositioning for distinct breast cancer metastases / H. Zhao, G. Jin, K. Cui, D. Ren, T. Liu, P. Chen, S. Wong, F. Li, Y. Fan, A. Rodriguez // *Cancer research* – 2013. – V. 73 – N 20 – P.6149–6163.
633. Houghton, P.J. Stage 2 combination testing of rapamycin with cytotoxic agents by the Pediatric Preclinical Testing Program. / P.J. Houghton, C.L. Morton, R. Gorlick, R.B. Lock, H. Carol, C.P. Reynolds, M.H. Kang, J.M. Maris, S.T. Keir, E.A. Kolb, J. Wu, A.W. Wozniak, C.A. Billups, L. Rubinstein, M.A. Smith // *Molecular cancer therapeutics* – 2010. – V. 9 – N 1 – P.101–12.
634. Blatt, J. Drug repurposing in pediatrics and pediatric hematology oncology / J. Blatt, S.J. Corey // *Drug Discov Today* – 2013. – V. 18 – N 1–2 – P.4–10.
635. Sirota, M. Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data / M. Sirota, J.T. Dudley, J. Kim, A.P. Chiang, A.A. Morgan, A. Sweet-Cordero, J. Sage, A.J. Butte // *Sci Transl Med* – 2011. – V. 3 – N 96 – P.96ra77.
636. Liu, Z. In silico drug repositioning: what we need to know / Z. Liu, H. Fang, K. Reagan, X. Xu, D.L. Mendrick, W. Slikker Jr., W. Tong // *Drug Discov Today* – 2013. – V. 18 – N 3–4 – P.110–115.
637. Chen, X. Drug-target interaction prediction: databases, web servers and computational models / X. Chen, C.C. Yan, X. Zhang, X. Zhang, F. Dai, J. Yin, Y. Zhang // *Brief Bioinform* – 2016. – V. 17 – N 4 – P.696–712.
638. Wu, Z. Network-based drug repositioning / Z. Wu, Y. Wang, L. Chen // *Mol Biosyst* – 2013. – V. 9 – N 6 – P.1268–1281.
639. Cheng, F. Individualized network-based drug repositioning infrastructure for precision oncology in the panomics era / F. Cheng, H. Hong, S. Yang, Y. Wei // *Briefings in bioinformatics* –

2016. – V. 18 – N 4 – P.682–697.

640. Lamb, J. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease / J. Lamb, E.D. Crawford, D. Peck, J.W. Modell, I.C. Blat, M.J. Wrobel, J. Lerner, J.P. Brunet, A. Subramanian, K.N. Ross, M. Reich, H. Hieronymus, G. Wei, S.A. Armstrong, S.J. Haggarty, P.A. Clemons, R. Wei, S.A. Carr, E.S. Lander, T.R. Golub // *Science* – 2006. – V. 313 – N 5795 – P.1929–1935.

641. Pritchard, J.E. Enhancing the Promise of Drug Repositioning through Genetics / J.E. Pritchard, T.A. O'Mara, D.M. Glubb // *Front Pharmacol* – 2017. – V. 8 – P.896.

642. Duan, Q. LINCS Canvas Browser: interactive web app to query, browse and interrogate LINCS L1000 gene expression signatures / Q. Duan, C. Flynn, M. Niepel, M. Hafner, J.L. Muhlich, N.F. Fernandez, A.D. Rouillard, C.M. Tan, E.Y. Chen, T.R. Golub, P.K. Sorger, A. Subramanian, A. Ma'ayan // *Nucleic Acids Res* – 2014. – V. 42 – N Web Server issue – P.W449-60.

643. Корман, Д.Б. Перепрофилирование лекарств для онкологии / Д.Б. Корман // *Практическая онкология* – 2017. – Т. 18 – № 1 – С.139–158.

644. Набережнов, Д.С. Сравнительный анализ влияния узкобороздочных лигандов на активацию белка PARP1 / Д.С. Набережнов, В.Ю. Глазунов, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И.Кирсанов // *Современные проблемы науки и образования* – 2016. – № 6 – С.134.

645. Kirsanov, K.I. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways / K.I. Kirsanov, E. Kotova, P. Makhov, K. Golovine, E.A. Lesovaya, V.M. Kolenko, M.G. Yakubovskaya, A.V. Tulin // *Oncotarget* – 2014. – V. 5 – N 2 – P.428–437.

646. Zhou, J. Diminazene or berenil, a classic duplex minor groove binder, binds to G-quadruplexes with low nanomolar dissociation constants and the amidine groups are also critical for G-quadruplex binding / J. Zhou, V. Le, D. Kalia, S. Nakayama, C. Mikek, E.A. Lewis, H.O. Sintim // *Mol Biosyst* – 2014. – V. 10 – N 10 – P.2724–2734.

647. Wang, C. Alkyne-substituted diminazene as G-quadruplex binders with anticancer activities / C. Wang, B. Carter-Cooper, Y. Du, J. Zhou, M.A. Saeed, J. Liu, M. Guo, B. Roembke, C. Mikek, E.A. Lewis, R.G. Lapidus, H.O. Sintim // *Eur J Med Chem* – 2016. – V. 118 – P.266–275.

648. Jarocka, I. Effect of novel dinuclear platinum(II) complexes on redox status of MOLT-4 leukemic cells / I. Jarocka, A. Gegotek, A. Bielawska, K. Bielawski, W. Luczaj, T. Hodun, E. Skrzydlewska // *Toxicol Mech Methods* – 2013. – V. 23 – N 9 – P.641–649.

649. Gegotek, A. The redox status of human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB231) treated with novel dinuclear berenil-platinum(II) complexes / A. Gegotek, M. Cyunczyk, W. Luczaj, A. Bielawska, K. Bielawski, E. Skrzydlewska // *Pharmazie* – 2014. – V. 69 – N 12 – P.923–928.

650. Bielawski, K. Cytotoxicity and induction of apoptosis of human breast cancer cells by novel platinum(II) complexes / K. Bielawski, R. Czarnomysy, A. Muszynska, A. Bielawska, B. Poplawska //

Environ Toxicol Pharmacol – 2013. – V. 35 – N 2 – P.254–264.

651. Czarnomysy, R. Effects of novel alkyl pyridine platinum complexes on apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells / R. Czarnomysy, A. Bielawska, A. Muszynska, K. Bielawski // *Med Chem* – 2015. – V. 11 – N 6 – P.540–550.

652. Gornowicz, A. Mechanism of anticancer action of novel berenil complex of platinum(II) combined with anti-MUC1 in MCF-7 breast cancer cells. / A. Gornowicz, A. Bielawska, W. Szymanowski, H. Gabryel-Porowska, R. Czarnomysy, K. Bielawski // *Oncology letters* – 2018. – V. 15 – N 2 – P.2340–2348.

653. Houghton, P.J. Stage 2 combination testing of rapamycin with cytotoxic agents by the Pediatric Preclinical Testing Program / P.J. Houghton, C.L. Morton, R. Gorlick, R.B. Lock, H. Carol, C.P. Reynolds, M.H. Kang, J.M. Maris, S.T. Keir, E.A. Kolb, J. Wu, A.W. Wozniak, C.A. Billups, L. Rubinstein, M.A. Smith // *Mol Cancer Ther* – 2010. – V. 9 – N 1 – P.101–112.

654. Lesovaya, E. Rapamycin Modulates Glucocorticoid Receptor Function, Blocks Atrophogene REDD1, and Protects Skin from Steroid Atrophy. / E. Lesovaya, S. Agarwal, B. Readhead, E. Vinokour, G. Baida, P. Bhalla, K. Kirsanov, M. Yakubovskaya, L.C. Platanius, J.T. Dudley, I. Budunova // *The Journal of investigative dermatology* – 2018. – V. 138 – N 9 – P.1935–1944.

655. Fischkoff, S.A. Induction of neutrophilic differentiation of human promyelocytic leukemic cells by branched-chain carboxylic acid anticonvulsant drugs / S.A. Fischkoff, E. Walter Jr. // *J Biol Response Mod* – 1984. – V. 3 – N 2 – P.132–137.

656. Michaelis, M. Valproic acid as anti-cancer drug / M. Michaelis, H.W. Doerr, Jr. J. Cinatl // *Curr Pharm Des* – 2007. – V. 13 – N 33 – P.3378–3393.

657. Gu, S. Valproic acid shows a potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma / Gu S., Tian Y., Chlenski A., Salwen H.R., Lu Z., Raj J.U., Yang Q. // *Anticancer Drugs* – 2012. – V. 23 – N 10 – P.1054–1066.

658. Leaute-Labreze, C. Propranolol for severe hemangiomas of infancy / C. Leaute-Labreze, E. Dumas de la Roque, T. Hubiche, F. Boralevi, J.B. Thambo, A. Taieb // *N Engl J Med* – 2008. – V. 358 – N 24 – P.2649–2651.

659. Zhang, L. Propranolol inhibits angiogenesis via down-regulating the expression of vascular endothelial growth factor in hemangioma derived stem cell / L. Zhang, H.M. Mai, J. Zheng, J.W. Zheng, Y.A. Wang, Z.P. Qin, K.L. Li // *Int J Clin Exp Pathol* – 2014. – V. 7 – N 1 – P.48–55.

660. Greenberger, S. Infantile hemangioma-mechanism(s) of drug action on a vascular tumor / S. Greenberger, J. Bischoff // *Cold Spring Harb Perspect Med* – 2011. – V. 1 – N 1 – P.a006460.

661. Kuang, X. Propranolol enhanced the anti-tumor effect of sunitinib by inhibiting proliferation and inducing G0/G1/S phase arrest in malignant melanoma / X. Kuang, M. Qi, C. Peng, C. Zhou, J. Su, W. Zeng, H. Liu, J. Zhang, M. Chen, M. Shen, X. Xie, F. Li, S. Zhao, Q. Li, Z. Luo, J. Chen, J. Tao, Y.

He, X. Chen // *Oncotarget* – 2018. – V. 9 – N 1 – P.802–811.

662. Montoya, A. Use of non-selective beta-blockers is associated with decreased tumor proliferative indices in early stage breast cancer / A. Montoya, C.N. Amaya, A. Belmont, N. Diab, R. Trevino, G. Villanueva, S. Rains, L.A. Sanchez, N. Badri, S. Otoukesh, A. Khammanivong, D.Liss, S.T. Baca, R.J. Aguilera, E.B. Dickerson, A. Torabi, A.K. Dwivedi, A. Abbas, K. Chambers, B.A. Bryan, Z. Nahleh // *Oncotarget* – 2017. – V. 8 – N 4 – P.6446–6460.

663. Wang, S. Effects of matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline and CD147 antagonist peptide-9 on gallbladder carcinoma cell lines / S. Wang, C. Liu, X. Liu, Y. He, D. Shen, Q. Luo, Y. Dong, H. Dong, Z. Pang // *Tumour Biol* – 2017. – V. 39 – N 10 – P.1010428317718192.

664. Jang, H.I. Perioperative administration of propranolol to women undergoing ovarian cancer surgery: A pilot study / H.I. Jang, S.H. Lim, Y.Y. Lee, T.J. Kim, C.H. Choi, J.W. Lee, B.G. Kim, D.S. Bae // *Obstet Gynecol Sci* – 2017. – V. 60 – N 2 – P.170–177.

665. Stenvang, J. Biomarker-guided repurposing of chemotherapeutic drugs for cancer therapy: a novel strategy in drug development / J. Stenvang, I. Kumler, S.B. Nygard, D.H. Smith, D. Nielsen, N. Brunner, J.M. Moreira // *Front Oncol* – 2013. – V. 3 – P.313.

666. Horisberger, K. Topoisomerase I expression correlates to response to neoadjuvant irinotecan-based chemoradiation in rectal cancer / K. Horisberger, P. Erben, B. Muessle, C. Woernle, P. Stroebel, G. Kaehler, F. Wenz, A. Hochhaus, S. Post, F. Willeke, R.D. Hofheinz // *Anticancer Drugs* – 2009. – V. 20 – N 6 – P.519–524.

667. Lan, H. Irinotecan as a palliative therapy for metastatic breast cancer patients after previous chemotherapy / H. Lan, Y. Li, C.Y. Lin // *Asian Pac J Cancer Prev* – 2014. – V. 15 – N 24 – P.10745–10748.

668. Kumler, I. A systematic review on topoisomerase 1 inhibition in the treatment of metastatic breast cancer / I. Kumler, N. Brunner, J. Stenvang, E. Balslev, D.L. Nielsen // *Breast Cancer Res Treat* – 2013. – V. 138 – N 2 – P.347–358.

669. Sharpless, K.B. The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement / K.B. Sharpless, W. Amberg, Y.L. Bennani, G.A. Crispino, J. Hartung, K.S. Jeong, H.L. Kwong, K. Morikawa, Z.M. Wang // *The Journal of Organic Chemistry* – 1992. – V. 57 – N 10 – P.2768–2771.

670. Moshkin, V.S. A simple two-step synthesis of 2-(alkylamino)-1-arylethanols, including racemic adrenaline, from aromatic aldehydes via 5-aryloxazolidines / V.S. Moshkin, V.Y. Sosnovskikh // *Tetrahedron Letters* – 2013. – V. 54 – N 44 – P.5869–5872.

671. Chou, T.C. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. / T.C. Chou, P. Talalay // *Advances in enzyme regulation* – 1984. – V. 22 – P.27–55.

672. Gessner, P.K. Isobolographic analysis of interactions: an update on applications and utility. / P.K. Gessner // *Toxicology* – 1995. – V. 105 – N 2–3 – P.161–79.
673. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / U.K. Laemmli // *Nature* – 1970. – V. 227 – N 5259 – P.680–5.
674. Maron, D.M. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. / D.M. Maron, B.N. Ames // *Mutation research* – 1983. – V. 113 – N 3–4 – P.173–215.
675. Белицкий, Г.А.. Совол как индуктор микросомных ферментов, активирующих проканцерогены / Г.А. Белицкий, Л.М. Фонштейн, В.В. Худолей. // *Экспериментальная онкология* – 1987. – Т. 9 – № 3 – С.20.
676. Мигачев, Г.И.. Синтез производных 5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дiazопирена / Г.И. Мигачев, А.М. Андриевский, Н.Р. Докунихин. // *Химия гетероциклических соединений* – 1975. – Т. 12 – С.1699–1700.
677. Абилев, Р.К.. О мутагенном действии производного тетрагидродиазопирена на бактерии / Р.К. Абилев, Л.М. Фонштейн, Г.И. Мигачев, А.М. Андриевский. // *Генетика* – 1979. – Т. 15 – № 5 – С.807–811.
678. Jaatinen, T. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. / T. Jaatinen, J. Laine // *Current protocols in stem cell biology* – 2007. – V. Chapter 2 – P.Unit 2A.1.
679. Bruscoli, S. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. / S. Bruscoli, V. Donato, E. Velardi, M. Di Sante, G. Migliorati, R. Donato, C. Riccardi // *The Journal of biological chemistry* – 2010. – V. 285 – N 14 – P.10385–96.
680. McLaughlin, F. Glucocorticoid-induced osteopenia in the mouse as assessed by histomorphometry, microcomputed tomography, and biochemical markers. / F. McLaughlin, J. Mackintosh, B.P. Hayes, A. McLaren, I.J. Uings, P. Salmon, J. Humphreys, E. Meldrum, S.N. Farrow // *Bone* – 2002. – V. 30 – N 6 – P.924–30.
681. Shipp, L.E. Transcriptional regulation of human dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) gene by glucocorticoids. / L.E. Shipp, J.V. Lee, C.-Y. Yu, M. Pufall, P. Zhang, D.K. Scott, J.-C. Wang // *PloS one* – 2010. – V. 5 – N 10 – P.e13754.
682. Tchen, C.R. Glucocorticoid regulation of mouse and human dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) genes: unusual cis-acting elements and unexpected evolutionary divergence. / C.R. Tchen, J.R.S. Martins, N. Paktiawal, R. Perelli, J. Saklatvala, A.R. Clark // *The Journal of biological chemistry* – 2010. – V. 285 – N 4 – P.2642–52.
683. Navab, M. The role of dysfunctional HDL in atherosclerosis. / M. Navab, S.T. Reddy, B.J. Van Lenten, G.M. Anantharamaiah, A.M. Fogelman // *Journal of lipid research* – 2009. – V. 50 Suppl –

P.S145-9.

684. Eren, E. High Density Lipoprotein and it's Dysfunction. / E. Eren, N. Yilmaz, O. Aydin // The open biochemistry journal – 2012. – V. 6 – P.78–93.

685. Foit, L. Synthetic high-density lipoprotein-like nanoparticles for cancer therapy. / L. Foit, F.J. Giles, L.I. Gordon, C.S. Thaxton // Expert review of anticancer therapy – 2015. – V. 15 – N 1 – P.27–34.

686. Simons, K. How cells handle cholesterol. / K. Simons, E. Ikonen // Science (New York, N.Y.) – 2000. – V. 290 – N 5497 – P.1721–6.

687. Chapman, M.J. Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. / M.J. Chapman // Journal of lipid research – 1980. – V. 21 – N 7 – P.789–853.

688. Тилова, Л.Р.. Молекулярно-генетические нарушения, лежащие в основе опухолей системы крови, и соответствующие им изменения сигнальных систем клетки / Л.Р. Тилова, Е.М. Жидкова, А.В. Савинкова, О.И. Борисова, К.А. Кузин, О.А. Власова, А.Р. Антипова, О.Ю. Баранова, К.И. Кирсанов, Г.А.Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А.Лесовая // Клиническая онкогематология – 2017. – Т. 2 – С.235–247.

689. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some aziridines, N-, S- & O-mustards and selenium. // IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man – 1975. – V. 9 – P.1–268.

690. Brandon, D.D. Inhibition of dexamethasone binding to human glucocorticoid receptor by New World primate cell extracts. / D.D. Brandon, J.W. Kendall, K. Alman, P. Tower, D.L. Loriaux // Steroids – 1995. – V. 60 – N 7 – P.463–6.

691. <http://www.bertin-bioreagent.com/pr51600/cpda>.

692. 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, P. Swart, G. Haegeman, I. Budunova // Oncotarget – 2015. – V. 6 – N 31 – P.30730–44.

693. Wang, H. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1 / H. Wang, N. Kubica, L.W. Ellisen, L.S. Jefferson, S.R. Kimball // Journal of Biological Chemistry – 2006.

694. Schenone, S. ATP-competitive inhibitors of mTOR: an update. / S. Schenone, C. Brullo, F. Musumeci, M. Radi, M. Botta // Current medicinal chemistry – 2011. – V. 18 – N 20 – P.2995–3014.

695. Chen, W. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. / W. Chen, T. Dang, R.D. Blind, Z. Wang, C.N. Cavasotto, A.B. Hittelman, I. Rogatsky, S.K. Logan, M.J. Garabedian // Molecular endocrinology – 2008. – V. 22 – N 8 – P.1754–66.

696. Wu, W. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. / W. Wu, S. Chaudhuri, D.R. Brickley,

D. Pang, T. Karrison, S.D. Conzen // *Cancer research* – 2004. – V. 64 – N 5 – P.1757–64.

697. Alvarez, J.V. mILC-ing the mouse mammary gland: A model for invasive lobular carcinoma // *Cancer Cell*. – 2006.

698. Sarkar, M.K. Endogenous Glucocorticoid Deficiency in Psoriasis Promotes Inflammation and Abnormal Differentiation. / M.K. Sarkar, N. Kaplan, L.C. Tsoi, X. Xing, Y. Liang, W.R. Swindell, P. Hoover, M. Aravind, G. Baida, M. Clark, J.J. Voorhees, R.P. Nair, J.T. Elder, I. Budunova, S. Getsios, J.E. Gudjonsson // *The Journal of investigative dermatology* – 2017. – V. 137 – N 7 – P.1474–1483.

699. Britto, F.A. REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. / Britto F.A., Begue G., Rossano B., Docquier A., Vernus B., Sar C., Ferry A., Bonniieu A., Ollendorff V., Favier F.B. // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* – 2014. – V. 307 – N 11 – P.E983-93.

700. Лесовая, Е.А.. Новые лиганды глюкокортикоидного рецептора: модифицированные стероиды и нестероидные селективные агонисты / Е.А. Лесовая, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, И.В. Будунова, М.Г. Якубовская. // *Технология живых систем* – 2012. – Т. 9 – С.27–32.

701. Tanner, T. The hinge region of the androgen receptor plays a role in proteasome-mediated transcriptional activation. / T. Tanner, F. Claessens, A. Haelens // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2004. – V. 1030 – P.587–92.

702. López, F.J. LGD-5552, an antiinflammatory glucocorticoid receptor ligand with reduced side effects, in vivo. / F.J. López, R.J. Ardecky, B. Bebo, K. Benbatoul, L. De Grandpre, S. Liu, M.D. Leibowitz, K. Marschke, J. Rosen, D. Rungta, H.O. Viveros, W.-C. Yen, L. Zhi, A. Negro-Vilar, J.N. Miner // *Endocrinology* – 2008. – V. 149 – N 5 – P.2080–9.

703. Lesovaya, E.A. Antitumor effect of non-steroid glucocorticoid receptor ligand CpdA on leukemia cell lines CEM and K562. / E.A. Lesovaya, A.Y. Yemelyanov, K.I. Kirsanov, M.G.Yakubovskaya, I.V. Budunova // *Biochemistry* – 2011. – V. 76 – N 11 – P.1242–52.

704. Жидкова, Е.М. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора CpdA на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов / Е.М. Жидкова, К.А. Кузин, Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, О.И. Борисова, М.Д. Лаврова, В.П. Максимова, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская, Е.А.Лесовая. // *Сибирский онкологический журнал* – 2017. – Т. 16 – № 6 – С.41–46.

705. Mehta-Shah, N. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. / N. Mehta-Shah, L. Ratner, S.M. Horwitz // *Journal of oncology practice* – 2017. – V. 13 – N 8 – P.487–492.

706. Horibe, K. Long-term Results of the Risk-adapted Treatment for Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Report From the Japan Association of Childhood Leukemia Study ALL-97 Trial. / K. Horibe, K. Yumura-Yagi, T. Kudoh, S. Nishimura, M. Oda, M. Yoshida, Y. Komada, J. Hara, A. Tawa, I. Usami, A. Tanizawa, K. Kato, R. Kobayashi, K. Matsuo, H. Hori // *Journal of pediatric*

hematology/oncology – 2017. – V. 39 – N 2 – P.81–89.

707. Smith, M.R. Mantle cell lymphoma initial therapy with abbreviated R-CHOP followed by 90Y-ibritumomab tiuxetan: 10-year follow-up of the phase 2 ECOG-ACRIN study E1499. / M.R. Smith, F. Hong, H. Li, L.I. Gordon, R.D. Gascoyne, E.M. Palletta, R.H. Advani, A. Forero-Torres, S.J. Horning, B.S. Kahl // *Leukemia* – 2017. – V. 31 – N 2 – P.517–519.

708. Iannitto, E. Rituximab with cyclophosphamide, vincristine, non-pegylated liposomal doxorubicin and prednisone as first-line treatment for splenic marginal zone lymphoma: a Fondazione Italiana Linfomi phase II study. / E. Iannitto, S. Luminari, C. Tripodo, S. Mancuso, M. Cesaretti, L. Marcheselli, F. Merli, C. Stelitano, A.M. Carella, A. Fragasso, E. Montechiarelo, G. Ricciuti, A. Pulsoni, M. Paulli, V. Franco, M. Federico // *Leukemia & lymphoma* – 2015. – V. 56 – N 12 – P.3281–7.

709. Scalzulli, E. Proteasome inhibitors for the treatment of multiple myeloma. / Scalzulli E., Grammatico S., Vozella F., Petrucci M.T. // *Expert opinion on pharmacotherapy* – 2018. – V. 19 – N 4 – P.375–386.

710. Shah, J.J. Phase I Study of the Novel Investigational NEDD8-Activating Enzyme Inhibitor Pevonedistat (MLN4924) in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma or Lymphoma. / J.J. Shah, A.J. Jakubowiak, O.A. O'Connor, R.Z. Orlowski, R.D. Harvey, M.R. Smith, D. Lebovic, C. Diefenbach, K. Kelly, Z. Hua, A.J. Berger, G. Mulligan, H.M. Faessel, S. Tirrell, B.J. Dezube, S. Lonial // *Clinical cancer research* – 2016. – V. 22 – N 1 – P.34–43.

711. Jia, L. SCF E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. / L. Jia, Y. Sun // *Current cancer drug targets* – 2011. – V. 11 – N 3 – P.347–56.

712. Swords, R.T. Pevonedistat (MLN4924), a First-in-Class NEDD8-activating enzyme inhibitor, in patients with acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes: a phase 1 study. / R.T. Swords, H.P. Erba, D.J. DeAngelo, D.L. Bixby, J.K. Altman, M. Maris, Z. Hua, S.J. Blakemore, H. Faessel, F. Sedarati, B.J. Dezube, F.J. Giles, B.C. Medeiros // *British journal of haematology* – 2015. – V. 169 – N 4 – P.534–43.

713. Шалгинских, Н.А. Эпигенетические эффекты узкобороздочных лигандов / Н.А. Шалгинских, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, Р.А. Кац, М.Г. Якубовская. // *Молекулярная медицина* – 2013. – Т. 5 – С.43–48.

714. Кирсанов, К.И. Индукция опухолей у дрозофилы бисбензимидазольными красителями ДНК Hoechst33258 и Hoechst33342 / К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, А.А. Иванов, О.Ю. Сусова, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская. // *Вестник РОНЦ* – 2012. – Т. 23 – № 4 – С.6–11.

715. Susova, O.Y. Minor groove dimeric bisbenzimidazoles inhibit in vitro DNA binding to eukaryotic DNA topoisomerase I. / O.Y. Susova, A.A. Ivanov, S.S. Morales Ruiz, E.A. Lesovaya, A.V. Gromyko, S.A. Streltsov, A.L. Zhuze // *Biochemistry. Biokhimiia* – 2010. – V. 75 – N 6 – P.695–701.

716. Kirsanov, K.I. SYBR Gold and SYBR Green II are not mutagenic in the Ames test. / K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya, G.A. Belitsky // *Mutation research* – 2010. – V. 699 – N 1–2 – P.1–4.

717. Хитрово, И.А. Результаты сравнительного анализа мутагенной активности флуоресцентных красителей ДНК бромистого этидия и SYBR Gold / И.А. Хитрово, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская. // *Вестник РОНЦ* – 2009. – Т. 4 – № 20 – С.38–43.

718. Donald, S. Complete protection by high-dose dexamethasone against the hepatotoxicity of the novel antitumor drug yondelis (ET-743) in the rat. / S. Donald, R.D. Verschoyle, P. Greaves, T.W. Gant, T. Colombo, M. Zaffaroni, R. Frapolli, M. Zucchetti, M. D'Incalci, D. Meco, R. Riccardi, L. Lopez-Lazaro, J. Jimeno, A.J. Gescher // *Cancer research* – 2003. – V. 63 – N 18 – P.5902–8.

719. Fetterly, G.J. Semimechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model for hepatoprotective effect of dexamethasone on transient transaminitis after trabectedin (ET-743) treatment. / Fetterly G.J., Owen J.S., Stuyckens K., Passarell J.A., Zannikos P., Soto-Matos A., Izquierdo M.A., Perez-Ruixo J.J. // *Cancer chemotherapy and pharmacology* – 2008. – V. 62 – N 1 – P.135–47.

720. Белицкий, Г.А. Трабектедин – лиганд узкой бороздки ДНК / Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, М.Г. Якубовская // *Успехи молекулярной онкологии* – 2015. – Т. 2 – С.41–49.

721. Szerszenowicz, J. Semi-automatic synthesis, antiproliferative activity and DNA-binding properties of new netropsin and bis-netropsin analogues. / J. Szerszenowicz, D. Drozdowska // *Molecules (Basel, Switzerland)* – 2014. – V. 19 – N 8 – P.11300–15.

722. Zerbini, L.F. Computational repositioning and preclinical validation of pentamidine for renal cell cancer. / L.F. Zerbini, M.K. Bhasin, J.F. de Vasconcellos, J.D. Pაცეც, X. Gu, A.L. Kung, T.A. Libermann // *Molecular cancer therapeutics* – 2014. – V. 13 – N 7 – P.1929–1941.

723. Mérian, J. Development of a liposome formulation for improved biodistribution and tumor accumulation of pentamidine for oncology applications. / J. Mérian, R. De Souza, Y. Dou, S.N. Ekdawi, F. Ravenelle, C. Allen // *International journal of pharmaceutics* – 2015. – V. 488 – N 1–2 – P.154–64.

724. Höglund, P. A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans. / P. Höglund, T. Eriksson, S. Björkman // *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* – 1998. – V. 26 – N 4 – P.363–83.

725. Wainer, I.W. The therapeutic promise of single enantiomers: introduction. / I.W. Wainer // *Human psychopharmacology* – 2001. – V. 16 – N S2 – P.S73–S77.

726. Савинкова, А.В. Противоопухольевый эффект энантиомеров CpдА in vitro на модели острого лимфобластного лейкоза / А.В. Савинкова, Л.Р. Тилова, О.И. Борисова, Е.М. Жидкова, К.А. Кузин, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, И.В. Будунова, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая //

Российский биотерапевтический журнал – 2017. – №. 1 – С.61–69.

727. 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.-Z. Zhang // *The Journal of biological chemistry* – 2012. – V. 287 – N 42 – P.35212–21.

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

729. Gu, Y. MLN4924, an NAE inhibitor, suppresses AKT and mTOR signaling via upregulation of REDD1 in human myeloma cells. / Y. Gu, J.L. Kaufman, L. Bernal, C. Torre, S.M. Matulis, R.D. Harvey, J. Chen, S.-Y. Sun, L.H. Boise, S. Lonial // *Blood* – 2014. – V. 123 – N 21 – P.3269–76.

730. Zhao, Y. Targeting Cullin-RING ligases by MLN4924 induces autophagy via modulating the HIF1-REDD1-TSC1-mTORC1-DEPTOR axis. / Y. Zhao, X. Xiong, L. Jia, Y. Sun // *Cell death & disease* – 2012. – V. 3 – P.e386.

731. Wolff, N.C. REDD1/DDIT4-independent mTORC1 inhibition and apoptosis by glucocorticoids in thymocytes. / N.C. Wolff, R.M. McKay, J. Brugarolas // *Molecular cancer research : MCR* – 2014. – V. 12 – N 6 – P.867–77.

732. Getsios, S. Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. / S. Getsios, C.L. Simpson, S. Kojima, R. Harmon, L.J. Sheu, R.L. Dusek, M. Cornwell, K.J. Green // *The Journal of cell biology* – 2009. – V. 185 – N 7 – P.1243–58.

733. Савинкова, А.В. Варианты и перспективы перепрофилирования лекарственных препаратов для использования в терапии онкологических заболеваний / А.В. Савинкова, Е.М. Жидкова, Л.Р. Тилова, М.Д. Лаврова, Е.С. Лылова, К.А. Кузин, А.Ю. Портянникова, В.П. Максимова, А.В. Холодова, О.А. Власова, Т.И. Фетисов, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая. // *Сибирский онкологический журнал* – 2018. – V. 17 – N 3 – P.77–87.

734. Dudley, J.T. Exploiting drug-disease relationships for computational drug repositioning. / J.T. Dudley, T. Deshpande, A.J. Butte // *Briefings in bioinformatics* – 2011. – V. 12 – N 4 – P.303–11.

735. Katiyar, S. REDD1, an inhibitor of mTOR signalling, is regulated by the CUL4A-DDB1 ubiquitin ligase. / S. Katiyar, E. Liu, C.A. Knutzen, E.S. Lang, C.R. Lombardo, S. Sankar, J.I. Toth, M.D. Petroski, Z. Ronai, G.G. Chiang // *EMBO reports* – 2009. – V. 10 – N 8 – P.866–72.

736. Kimball, S.R. Rapid turnover of the mTOR complex 1 (mTORC1) repressor REDD1 and activation of mTORC1 signaling following inhibition of protein synthesis. / S.R. Kimball, A.N.D. Do, L. Kutzler, D.R. Cavener, L.S. Jefferson // *The Journal of biological chemistry* – 2008. – V. 283 – N 6 – P.3465–75.

737. Tan, C.Y. mTORC1 dependent regulation of REDD1 protein stability. / C.Y. Tan, T. Hagen. // *PloS one* – 2013. – V. 8 – N 5 – P.e63970.
738. Galliher-Beckley, A.J. 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. – V. 61 – N 10 – P.979–86.
739. Kitagishi, Y. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. / Y. Kitagishi, M. Kobayashi, K. Kikuta, S. Matsuda. // *Depression research and treatment* – 2012. – V. 2012 – P.752563.
740. Mendoza, M.C. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. / M.C. Mendoza, E.E. Er, J. Blenis. // *Trends in biochemical sciences* – 2011. – V. 36 – N 6 – P.320–8.
741. Nader, N. AMPK regulates metabolic actions of glucocorticoids by phosphorylating the glucocorticoid receptor through p38 MAPK. / N. Nader, S.S.M. Ng, G.I. Lambrou, P. Pervanidou, Y. Wang, G.P. Chrousos, T. Kino. // *Molecular endocrinology*. – 2010. – V. 24 – N 9 – P.1748–64.
742. Sabatini, D.M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. / D.M. Sabatini. // *Nature reviews. Cancer* – 2006. – V. 6 – N 9 – P.729–34.
743. Lesovaya, E.A. Rapatar, a nanoformulation of rapamycin, decreases chemically-induced benign prostate hyperplasia in rats. / E.A. Lesovaya, K.I. Kirsanov, E.E. Antoshina, L.S. Trukhanova, T.G. Gorkova, E.V. Shipaeva, R.M. Salimov, G.A. Belitsky, M.V. Blagosklonny, M.G. Yakubovskaya, O.B. Chernova. // *Oncotarget* – 2015. – V. 6 – N 12 – P.9718–27.
744. Лесовая, Е.А. Моделирование доброкачественной гиперплазии простаты / Е.А. Лесовая, К.И. Кирсанов, Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова, Л.П. Труханова, М.Г. Якубовская, Г.А. Белицкий. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* – 2013. – V. 12 – P.55–64.
745. Hess, G. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. / G. Hess, R. Herbrecht, J. Romaguera, G. Verhoef, M. Crump, C. Gisselbrecht, A. Laurell, F. Offner, A. Strahs, A. Berkenblit, O. Hanushevsky, J. Clancy, B. Hewes, L. Moore, B. Coiffie. // *Journal of clinical oncology*. – 2009. – V. 27 – N 23 – P.3822–9.
746. Ansell, S.M. Low-dose, single-agent temsirolimus for relapsed mantle cell lymphoma: a phase 2 trial in the North Central Cancer Treatment Group. / S.M. Ansell, D.J. Inwards, K.M. Rowland, P.J. Flynn, R.F. Morton, D.F. Moore, S.H. Kaufmann, I. Ghobrial, P.J. Kurtin, M. Maurer, C. Allmer, T.E. Witzig. // *Cancer* – 2008. – V. 113 – N 3 – P.508–14.
747. Yazbeck, V.Y. Temsirolimus downregulates p21 without altering cyclin D1 expression and induces autophagy and synergizes with vorinostat in mantle cell lymphoma. / V.Y. Yazbeck, D. Buglio, G.V. Georgakis, Y. Li, E. Iwado, J.E. Romaguera, S. Kondo, A. Younes. // *Experimental hematology* –

2008. – V. 36 – N 4 – P.443–50.

748. Witzig, T.E. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. / T.E. Witzig, S.M. Geyer, I. Ghobrial, D.J. Inwards, R. Fonseca, P. Kurtin, S.M. Ansell, R. Luyun, P.J. Flynn, R.F. Morton, S.R. Dakhil, H. Gross, S.H. Kaufmann. // *Journal of clinical oncology*. – 2005. – V. 23 – N 23 – P.5347–56.

749. Chan, S. Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer. / S. Chan, M.E. Scheulen, S. Johnston, K. Mross, F. Cardoso, C. Dittrich, W. Eiermann, D. Hess, R. Morant, V. Semiglazov, M. Borner, M. Salzberg, V. Ostapenko, H.-J. Illiger, D. Behringer, N. Bardy-Bouxin, J. Boni, S. Kong, M. Cincotta, L. Moore. // *Journal of clinical oncology*. – 2005. – V. 23 – N 23 – P.5314–22.

750. Stallone, G. Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. / G. Stallone, A. Schena, B. Infante, S. Paolo, A. Loverre, G. Maggio, E. Ranieri, L. Gesualdo, F.P. Schena, G. Grandaliano. // *The New England journal of medicine* – 2005. – V. 352 – N 13 – P.1317–23.

751. Meric-Bernstam, F. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. / F. Meric-Bernstam, A.M. Gonzalez-Angulo. // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* – 2009. – V. 27 – N 13 – P.2278–87.

752. Ruggero, D. The translation factor eIF4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. / D. Ruggero, L. Montanaro, L. Ma, W. Xu, P. Londei, C. Cordon-Cardo, P.P. Pandolfi // *Nature medicine* – 2004. – V. 10 – N 5 – P.484–6.

753. Wendel, H.-G. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. / H.-G. Wendel H.-G., E. Stanchina E. De, J.S. Fridman J.S., A. Malina, S. Ray, S. Kogan, C. Cordon-Cardo, J. Pelletier, S.W. Lowe // *Nature* – 2004. – V. 428 – N 6980 – P.332–7.

754. Beesley, A.H. Glucocorticoid resistance in T-lineage acute lymphoblastic leukaemia is associated with a proliferative metabolism. / A.H. Beesley, M.J. Firth, J. Ford, R.E. Weller, J.R. Freitas, K.U. Perera, U.R. Kees. // *British journal of cancer* – 2009. – V. 100 – N 12 – P.1926–36.

755. Zhang, C. Synergistic activity of rapamycin and dexamethasone in vitro and in vivo in acute lymphoblastic leukemia via cell-cycle arrest and apoptosis. / C. Zhang, Y-K. Ryu, T.Z. Chen, C.P. Hall, D.R. Webster, M.H. Kang // *Leukemia research* – 2012. – V. 36 – N 3 – P.342–9.

756. Frenkel, B. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. / B. Frenkel, W. White, J. Tuckermann. // *Advances in experimental medicine and biology* – 2015. – V. 872 – P.179–215.

757. Compston, J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. / J. Compston // *Endocrine* – 2018. – V. 61 – N 1 – P.7–16.