

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

*На правах рукописи*

**ТИЛОВА ЛЕЙЛА РАСУЛОВНА**

**ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ  
СЕЛЕКТИВНЫХ АГОНИСТОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА  
НА МОДЕЛЯХ ГЕМОБЛАСТОЗОВ**

14.01.12 – онкология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научные руководители:**

кандидат биологических наук

**Екатерина Андреевна Лесовая,**

доктор химических наук

**Валерик Зармикевич Ширинян**

**Москва – 2018г.**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Молекулярные механизмы действия глюкокортикоидов в нормальных и опухолевых клетках .....	14
1.1.1. Роль глюкокортикоидов в организме .....	14
1.1.2. Молекулярный механизм действия глюкокортикоидов .....	16
1.1.3. Действие глюкокортикоидов на клетки иммунной системы в норме и при опухоли.....	26
1.2. Глюкокортикоиды в лечении лейкозов и лимфом.....	33
1.2.1. Механизм глюкокортикоид-индуцируемого апоптоза при злокачественных новообразованиях кроветворной системы.....	34
1.2.2. Глюкокортикоид-опосредованное подавление пролиферативной активности клетки.....	39
1.3. Современные подходы к совершенствованию терапии глюкокортикоидами. ....	43
1.3.1. Оптимизация систем доставки глюкокортикоидов .....	43
1.3.2. Современные тенденции в разработке новых препаратов – аналогов глюкокортикоидов.....	49
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	57
2.1. Список реактивов, использованных в работе.....	57
2.2. Приборы, использованные в работе.....	59
2.3. Клеточные линии и обработка клеток.....	59
2.4. Определение антипролиферативного эффекта .....	60
2.5. Определение уровня апоптоза .....	60
2.6. Бактериальный тест на мутагенную активность Эймса.....	60
2.7. Конкурентное связывание .....	61
2.8. Выделение РНК и обратная транскрипция.....	62
2.9. Количественная ПЦР .....	62
2.10. Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS .....	63

2.11. Вестерн блоттинг.....	63
2.12. Трансформация бактериальных клеток .....	64
2.13. Выделение плазмидной ДНК .....	65
2.14. Приготовление сред и растворов для работы с бактериями.....	65
2.15. Используемые вектора .....	66
2.16. Трансдукция клеток лентивирусными векторами .....	67
2.17. Определение активности люциферазы .....	67
2.18. Оценка противоопухолевой активности CpдA-03 <i>in vivo</i> на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей .....	67
2.19. Статистическая обработка данных.....	68
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	69
3.1. Противоопухолевый эффект новосинтезированных аналогов глюкокортикоидов <i>in vitro</i> и его зависимость от GR.....	71
3.1.1. Модельная система, используемая в работе.....	72
3.1.2. Определение антипролиферативного и проапоптотического эффектов энантиомеров CpдA.....	75
3.1.3. Антипролиферативные и проапоптотические эффекты новосинтезированных химических производных CpдA .....	80
3.2. Оценка эффектов исследуемых соединений на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора .....	86
3.2.1. Исследование способности энантиомеров CpдA к запуску транс-репрессии и транс-активации.....	86
3.2.2. Оценка влияния новосинтезированных химических производных CpдA на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора .....	98
3.3. Исследование мутагенной активности энантиомеров CpдA и новосинтезированных химических производных CpдA .....	116
3.4. Оценка противоопухолевого эффекта наиболее активного химического производного CpдA, CpдA-03, <i>in vivo</i> .....	121
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	123
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	134

ВЫВОДЫ .....	135
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	139

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Глюкокортикоиды (GC) регулируют основные физиологические процессы в организме, включая гомеостаз, эмбриональное и постэмбриональное развитие, а также ответ организма на стресс. С момента открытия GC в конце 1940-х годов их иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства активно исследовали и затем стали использовать в клинической практике. Несмотря на то, что при длительном приеме GC развивается большое количество побочных эффектов, GC остаются ключевыми препаратами для купирования острых и хронических воспалительных процессов, а также играют важную роль в лечении как злокачественных новообразований кроветворной системы в качестве компонентов основной терапии, так и в качестве адъюванта в лечении различных солидных опухолей.

Биологическая активность GC осуществляется посредством связывания лиганда с глюкокортикоидным рецептором (GR). В отсутствие лиганда рецептор находится в цитоплазме в мультипротеиновом комплексе с белками-шаперонами. При связывании с лигандом происходит изменение конформации GR, и диссоциация шаперонного комплекса, высвобождение рецептора и транслокация его в ядро. В ядре GR способен взаимодействовать с глюкокортикоид-респонсивными элементами (GRE) в промоторах и энхансерах генов, активируя их транскрипцию. Кроме того, как в ядре, так и в цитоплазме активированный рецептор может образовывать комплексы с другими факторами транскрипции (TF), напротив, подавляя их активность. Таким образом, GC стимулируют экспрессию противовоспалительных и некоторых проапоптотических белков, и подавляют активность про-пролиферативных и провоспалительных ферментов. В то же время GC могут ингибировать транскрипцию провоспалительных (например, цитокинов, ферментов и молекул адгезии) и некоторых антиапоптотических генов через ряд других механизмов. В частности, связывание GR с негативными GRE (nGRE) приводит к описанным выше процессам.

Противовоспалительные эффекты GC в основном обусловлены ДНК-независимым белок-белковым взаимодействием GR с различными TF, определяемым как механизм транс-репрессии. Развитие большей части GC-индуцируемых побочных эффектов обусловлено ДНК-зависимым механизмом транс-активации. Эта схема действия GR является довольно упрощенной, тем не менее, ряд побочных эффектов действительно реализуется за счет индукции транс-активации, в частности, гипергликемия и атрофические явления в кожной и мышечной ткани. У других GC-зависимых осложнений, 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-реессию 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. Учитывая активное использование GR-зависимых препаратов при лечении онкологических заболеваний, изучение молекулярных механизмов действия существующих и новосинтезированных SEGRA является актуальным для экспериментальной онкологии.

### **Степень разработанности проблемы**

Одним из наиболее изученных препаратов класса SEGRA является CpдA (Compound A), синтетический аналог соединения, выделенного из африканского кустарника семейства амарантовых *Salsola tuberculatiformis* Botschantzev. CpдA представляет собой соединение нестероидной структуры, которое продемонстрировало аффинность к GR в условиях конкурентного связывания с использованием меченого дексаметазона. CpдA не индуцирует димеризацию GR

и последующие процессы транслокации рецептора в ядро и активации транскрипции, а избирательно подавляет активность транскрипционных факторов, в частности, NF-κB. Описаны его противовоспалительные свойства на ряде моделей *in vitro* и *in vivo*, причем с помощью молекулярно-биологических методов было доказано, что CpdA относится к классу SEGRA и способен вызывать развитие побочных эффектов в меньшей степени. Также показано, что CpdA является лигандом рецептора андрогенов (AR), однако действует как антагонист, полностью подавляя активность рецептора. В нашей лаборатории были изучены противоопухолевые свойства CpdA на моделях лейкозов и лимфом *in vitro* и *in vivo*, и показана его противоопухолевая активность, сравнимая с GC дексаметазоном (Dex), часто использующимся в протоколах химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы. Была продемонстрирована эффективность CpdA в отношении активации транс-репрессии, что поддерживает гипотезу о том, что противоопухолевая терапия с использованием аналогов GC со сниженными побочными эффектами остается достижимой целью. Однако данное соединение обладает невысокой стабильностью в водных растворах и распадается с образованием канцерогенно-опасного фенилазиридина, что ограничивает его применение.

Принимая во внимание все полученные ранее данные, CpdA не является кандидатом для дальнейшего исследования в доклинических и клинических испытаниях, однако представляет интерес в качестве инструмента для исследовательских целей, более стабильные аналоги CpdA являются перспективными молекулами для разработки и исследований *in vitro* и *in vivo*. Подобные аналоги или производные CpdA, имеющие более стабильную структуру, в литературе описаны не были. Для расширения списка SEGRA на основе CpdA было использовано два подхода: 1) синтез оптических изомеров молекулы, 2) синтез химических аналогов CpdA. Совместно с группой химиков-синтетиков ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, под рук. д.х.н. Шириняна В.З. были разработаны пути химической модификации CpdA. На химическом факультета МГУ им. М.В. Ломоносова был предложен синтез энантиомеров CpdA.

Полученные соединения были оценены по своим эффектам на функциональную активность GR и противоопухолевой активности.

Таким образом, представленное исследование основано на имеющихся данных по биологическим эффектам CpdA и направлено на получение его химических производных и исследование их биологических свойств.

В практическом аспекте на основании полученных данных о биологической активности новых химических производных CpdA было показано, что одно из соединений, CpdA-03, является более стабильным по сравнению с исходной молекулой CpdA, обладает аффинностью к GR, сопоставимой с аффинностью CpdA, а также проявляет противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo*, в связи с чем является перспективным кандидатом для дальнейшего исследования в доклинических испытаниях.

### **Основные цели и задачи исследования**

Целью данного исследования являлся сравнительный анализ биологических эффектов новосинтезированных химических производных CpdA на модельных системах лейкозов и лимфом *in vitro* и *in vivo*.

В соответствии с основной целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Провести оценку противоопухолевого эффекта *in vitro* новосинтезированных энантиомеров CpdA и химических производных CpdA:

- оценить GR-зависимый антипролиферативный эффект полученных соединений;

- проанализировать влияние полученных соединений на индукцию апоптоза на модельной системе злокачественных новообразований кроветворной системы *in vitro*.

2. Изучить влияние энантиомеров CpdA и химических производных CpdA на функционирование GR

- определить аффинность новосинтезированных химических производных CpdA к GR;



- исследовать эффект новосинтезированных химических производных CpdA на фосфорилирование GR;

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

3. Исследовать противоопухолевый эффект наиболее активных соединений *in vivo*.

### **Научная новизна исследования**

Научная новизна исследования обусловлена тем, что впервые изучены биологические свойства новосинтезированных оптических изомеров CpdA и химических производных молекулы CpdA, в частности, впервые продемонстрировано, что:

- антипролиферативные и проапоптотические эффекты оптических изомеров CpdA и химических производных молекулы CpdA сопоставимы с аналогичными эффектами исходного соединения CpdA, а также с эффектами глюкокортикоида дексаметазона (Dex), который был использован как препарат сравнения;

- противоопухолевый эффект *in vitro* энантиомеров CpdA и ряда химических производных CpdA реализуется за счет активации GR;

- энантиомеры CpdA и ряд химических производных CpdA способны, как и исходное соединение CpdA, избирательно запускать механизм транс-репрессии при подавлении индукции транс-активации; наибольшую активность в данных экспериментах продемонстрировало соединение CpdA-03;

- химические производные CpdA обладают различной степенью аффинности к GR: наиболее высокое сродство к рецептору, сопоставимое с аффинностью исходного соединения CpdA, было показано для соединений CpdA-03 и CpdA-04;

- все полученные соединения, в отличие от Dex, не способны вызывать фосфорилирование GR по остатку Ser211, что свидетельствует об отсутствии запуска механизма транс-активации;

- наиболее активное в тестах *in vitro* соединение CpдA-03 проявляет противоопухолевую активность на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей *in vivo*.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Препараты класса селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) необходимы для более безопасной и эффективной химиотерапии злокачественных новообразований кроветворной системы. В ходе выполнения диссертационной работы предложены стратегии синтеза аналогов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора, и оптимизированы методы получения промежуточных и целевых соединений. Были 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 как потенциальный препарат для терапии злокачественных новообразований кроветворной системы.

### **Методология и методы исследования**

В качестве модельной системы *in vitro* в представленной работе были использованы клетки линии Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза СЕМ и В-клеточной мантайноклеточной лимфомы Granta, а также сублинии данных клеток с подавленной с помощью короткой шпилечной РНК к гену GR экспрессией рецептора. Сублинии клеток СЕМ и Granta с подавленной экспрессией рецептора были получены с помощью трансдукции лентивирусных конструкция, несущих короткую шпилечную РНК к GR. Антипролиферативный эффект определяли с помощью прямого подсчета клеток в камере Горяева.

Уровень апоптоза был определен методом проточной цитофлуориметрии после окраски йодистым пропидием. Ядерная транслокация GR, общий уровень экспрессии рецептора и его фосфорилирование оценивали с помощью Вестерн блоттинга. Транс-репрессорный потенциал исследуемых соединений был изучен с помощью люциферазного репортерного анализа, для чего с помощью трансдукции лентивирусного вектора были получены сублинии клеток SEM и Granta, стабильно экспрессирующих люциферазу светлячка под контролем NF- $\kappa$ B-зависимого промотора; подтверждение полученных данных проведено с помощью количественной ПЦР генов, чья экспрессия регулируется NF- $\kappa$ B. Транс-активационный потенциал энантиомеров и химических производных CpдA был проанализирован с помощью люциферазного репортерного анализа, для чего с помощью трансдукции лентивирусного вектора были получены сублинии клеток SEM и Granta, стабильно экспрессирующих люциферазу светлячка под контролем GR-зависимого промотора; данные люциферазного анализа были подтверждены с помощью Вестерн блоттинга и количественной ПЦР GR-зависимых генов. Для исследования противоопухолевого эффекта исследуемых соединений *in vivo* была использована модель перевиваемой лимфомы P388 у мышей.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Новоситезированные R- и S-энантиомеры хирального соединения CpдA, являются селективными агонистами GR, действующими преимущественно по механизму активации трансрепрессии, причем их противоопухолевые и проапоптотические эффекты сопоставимы с действием рацемической смеси, они имеют близкие лигандные свойства, и их мутагенность в тесте Эймса статистически значимо не различается.
2. Противоопухолевый и проапоптотический эффекты ряда новосинтезированных химических производных CpдA преимущественно опосредованы активацией глюкокортикоидного рецептора.
3. Новосинтезированные химические производные CpдA не обладают мутагенным эффектом в тесте Эймса.

4. Основным механизмом реализации эффектов ряда новосинтезированных производных СpdA является GR-зависимая транскрепрессия транскрипционных факторов.

5. СpdA-03 обладает наиболее высокой аффинностью к глюкокортикоидному рецептору среди новосинтезированных производных СpdA, сопоставимой с СpdA

6. Среди новосинтезированных химических производных СpdA наиболее выраженным противоопухолевым действием, реализуемым по механизму GR-зависимой транскрепрессии транскрипционных факторов, обладает соединение СpdA-03.

7. На модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей *in vivo* СpdA-03 проявляет противоопухолевую активность: при внутрибрюшинном введении СpdA-03 в дозе 7,5 мг/кг наблюдали торможение роста опухолевого узла на 78%, причем наблюдалась тенденция к превышению эффективности действия Dex и СpdA

### **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 антипролиферативных и проапоптотических эффектов, экспрессии генов, активности транскрипционных факторов и противоопухолевой активности *in vivo*. Полученные в исследовании результаты обработаны с использованием адекватных методов математической статистики. По материалам диссертации опубликовано 7 статей в отечественных журналах из списка ВАК. Результаты представленного исследования были представлены и обсуждены на конференциях: всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. «Противоопухолевая терапия: от

эксперимента к клинике» (20-21 марта 2014 г., Москва), всероссийская научно-практическая конференция «Отечественные противоопухолевые препараты» (2-4 апреля 2015 г., Москва), международная конференция «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (9-12 июля 2015 г., Томск), научная школа «Сигнальные пути ядерных рецепторов в физиологии и заболевании» (23-28 августа 2015 г., о. Спетцес, Греция), конференция «Молекулярная онкология: итоги и перспективы» (16-17 декабря 2015 г., Москва), II Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (22-24 июня 2016 г., Санкт-Петербург), II всероссийская конференция по молекулярной онкологии «Молекулярная онкология», (6-8 декабря 2016 г., Москва), III Петербургский онкологический форум «Белые ночи», Санкт-Петербург, Россия, (23–24 июня, 2017 г.).

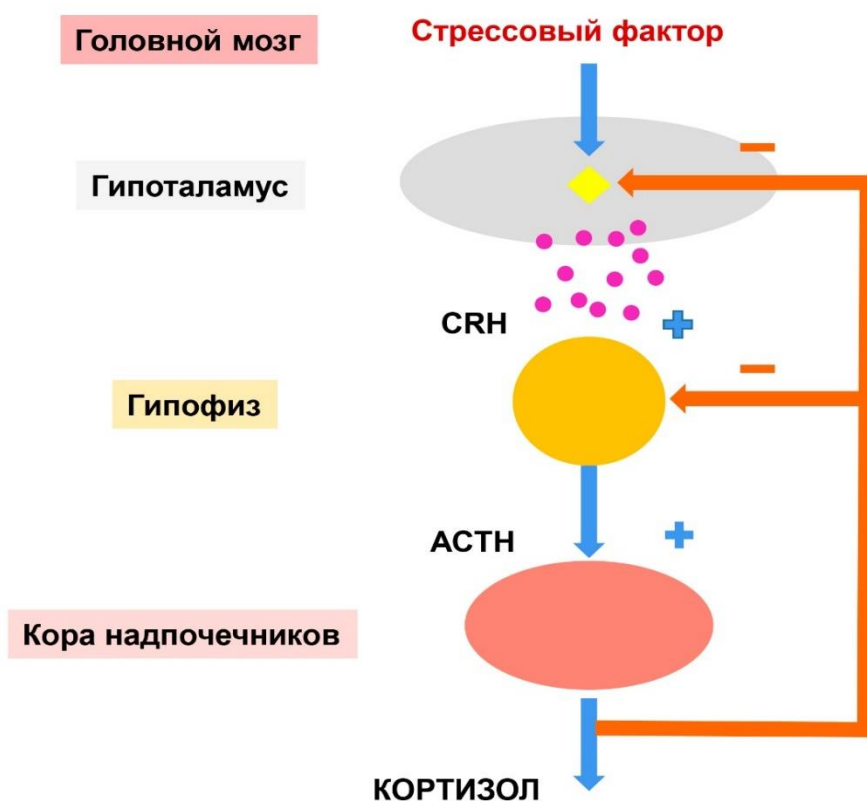
## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Молекулярные механизмы действия глюкокортикоидов в нормальных и опухолевых клетках

#### *1.1.1. Роль глюкокортикоидов в организме*

Глюкокортикоиды (GC) представляют собой стероидные гормоны, необходимые для поддержания гомеостаза в организме на разных уровнях. GC оказывают влияние на функционирование практически всех тканей и органов, являясь первичными гормонами стресса. Они участвуют во множестве физиологических процессов, включая все виды метаболических изменений (белковый, углеводный и жировой обмен), влияют на реализацию иммунного ответа, осуществляют контроль над сердечно-сосудистой системой. Синтез и высвобождение GC в коре надпочечников также подвержены циркадным ритмам, либо являются реакцией на стрессовые условия. Секрецию этих гормонов контролирует «гипоталамо-гипофизарная-надпочечниковая» ось (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, НРА) [1]. Под действием внутренних или внешних сигналов (цитокинов, гипоксии и других видах стресса) в гипоталамусе происходит высвобождение кортикотропина или кортиколиберина (corticotrophin releasing hormone, CRH), который, в свою очередь, стимулирует синтез и секрецию адренокортикотропного гормона (adrenocorticotrophic hormone, АСТН) в гипофизе. АСТН действует на кору надпочечников, что приводит к выработке и секреции глюкокортикоидов гидрокортизона и кортикостерона. Синтез GC контролируется по механизму отрицательной обратной связи: гидрокортизон и кортикостерон снижают уровень секреции CRH и АСТН (рисунок 1) [2].

## Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (ось НРА)



**Рисунок 1** - Гипоталамо-гипофизарная надпочечниковая ось

Плейотропные эффекты природных ГС обусловили создание их более активных синтетических аналогов. На сегодняшний день ГС являются одними из наиболее широко распространенных в мире лекарственных препаратов. В течение последних 70 лет синтетические ГС незаменимы для лечения воспалительных и аутоиммунных заболеваний, таких как астма, аллергия, сепсис, ревматоидный артрит, язвенный колит и рассеянный склероз. ГС назначают для предотвращения отторжения трансплантированных органов, а также за счет специфического цитотоксического действия на клетки иммунной системы в большинстве случаев злокачественных новообразований кроветворной и лимфатической систем [3]. К сожалению, при хроническом приеме ГС их терапевтический эффект связан с развитием многочисленных метаболических и атрофических осложнений. Побочные эффекты ГС включают в себя остеопороз, атрофию кожного покрова и мышечной ткани, стероидный диабет, абдоминальное ожирение, глаукому,

задержку роста у детей и гипертонию. Кроме того, у пациентов, проходящих длительный курс терапии, включающей GC часто развивается тканеспецифическая устойчивость к данным гормонам. Изучение молекулярных механизмов действия GC на клетки, ткани, органы и организм человека в целом, и, более конкретно – механизмам развития побочных эффектов GC, является важной задачей текущих исследований и необходимо для разработки аналогов GC со сниженными побочными эффектами.

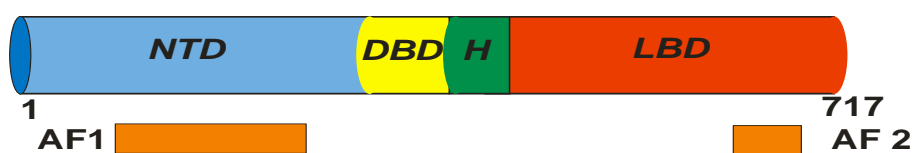
### ***1.1.2. Молекулярный механизм действия глюкокортикоидов***

Клеточный ответ на GC необычайно разнообразен в зависимости от типа экспонируемых GC клеток. В частности, GC вызывают гибель тимоцитов и остеобластов, но способствуют выживанию гепатоцитов и кардиомиоцитов. Кроме того, чувствительность к GC индивидуальна для каждого человека, а также тканеспецифична и, более того, различается между отдельными клетками на различных стадиях клеточного цикла. Как физиологическое, так и фармакологическое действие GC опосредовано активацией глюкокортикоидного рецептора (GR), также известного как 1 член группы C ядерных рецепторов подсемейства 3 (NR3C1), лиганд-зависимого фактора транскрипции. После связывания с глюкокортикоидом GR способен индуцировать или подавлять транскрипцию GC-зависимых генов-мишеней, которые составляют до 10-20% генома человека. Уровень экспрессии и активности отдельных пост-транскрипционных и пост-трансляционных изоформ GR, образующихся за счет альтернативного сплайсинга и альтернативной инициации трансляции. Эта большая когорта функционально различных рецепторных подтипов подвержена различным посттрансляционным модификациям, которые дополнительно регулируют их сигнальные свойства. Следовательно, клеточный ответ на глюкокортикоиды в значительной мере определяется выраженным дополнением и составными действиями отдельных изоформ GR [4].



## Геномный механизм действия GR

GR имеет доменную структуру и состоит из трех основных доменов: N-концевого транс-активационного домена (NTD), центральный ДНК-связывающий домен (DBD) и С-концевой лиганд-связывающий домен (LBD), а также небольшой гибкой части белка между DBD и LBD, называемой шарнирной областью (рисунок 2). DBD является наиболее консервативной областью у представителей всего семейства ядерных рецепторов и содержит два белковых мотива «цинковые пальцы», которые распознают и связывают специфические последовательности ДНК, называемые глюкокортикоид-респонсивными элементами (GRE). NTD в своем составе содержит участок, отвечающий за активацию транскрипции (AF1), который непосредственно взаимодействует с транскрипционным аппаратом и является основным сайтом для посттрансляционных модификаций. LBD, состоящий из 12  $\alpha$ -спиралей и четырех  $\beta$ -листов, образует так называемый гидрофобный карман для связывания глюкокортикоидов, а также содержит второй участок, выполняющий транс-активационную функцию (AF2) посредством взаимодействия с корегуляторами после связывания рецептора с лигандом. На стыке DBD и шарнирной области, а также внутри LBD расположены две короткие аминокислотные последовательности, обеспечивающие ядерную локализацию белков - сигналы ядерной локализации, NL1 и NL2, с которыми происходит связывание транспортных белков импортинов после связывания лиганда с GR и диссоциации его комплекса с белками-шаперонами в цитоплазме.



**Рисунок 2** - Доменная структура GR и сайты посттрансляционной модификации

В отсутствие гормона GR находится преимущественно в цитоплазме клеток как часть многокомпонентного белкового комплекса, который включает в себя белки-шапероны из семейства белков теплового шока (hsp90, hsp70) и hsp90-связывающий белок p23, а также иммунофилины из семейства белков, связывающих FK506 (FKBP51 и FKBP52). Эти белки поддерживают рецептор в неактивном состоянии, но способствуют его связыванию с высокоаффинными лигандами. Здесь необходимо отметить, что гидрокортизон самый распространенный эндогенный глюкокортикоид у человека, в большинстве случаев находится в комплексе с кортикостероид-связывающим глобулином (CBG). CBG не только способствует распределению гидрокортизона, но также играет роль в его высвобождении в ткани. Свободный от CBG гидрокортизон пассивно диффундирует через плазматическую мембрану; однако его биодоступность в клетке контролируется двумя ферментами, работающими противоположно [5].  $11\beta$ -гидроксистероид дегидрогеназа типа 2 ( $11\beta$ -HSD2) окисляет гидрокортизон в неактивный метаболит кортизона, тогда как  $11\beta$ -гидроксистероид дегидрогеназа типа 1 ( $11\beta$ -HSD1) превращает кортизон в гидрокортизон. Изменения уровня и/или активности этих ферментов могут способствовать различиям в чувствительности к GC в клетке. В отличие от гидрокортизона, большинство синтетических GC не связываются с CBG и не метаболизируются  $11\beta$ -HSD2. После связывания с глюкокортикоидами происходит изменение конформации GR, приводящее к диссоциации белкового комплекса (рисунок 3). После диссоциации участки, несущие сигналы ядерной локализации NL1 и NL2, становятся доступными для связывания с белками импортинами, которые, в свою очередь, образуют контакт с белками, формирующими ядерную пору, и происходит транслокация GR в ядро через ядерные поры [6]. Также ядерная транслокация GR может происходить без диссоциации цитоплазматического белкового комплекса, но с частичным изменением его состава. В частности, иммунофилин FKBP51 входит в состав комплекса при отсутствии связывания рецептора с гормоном.

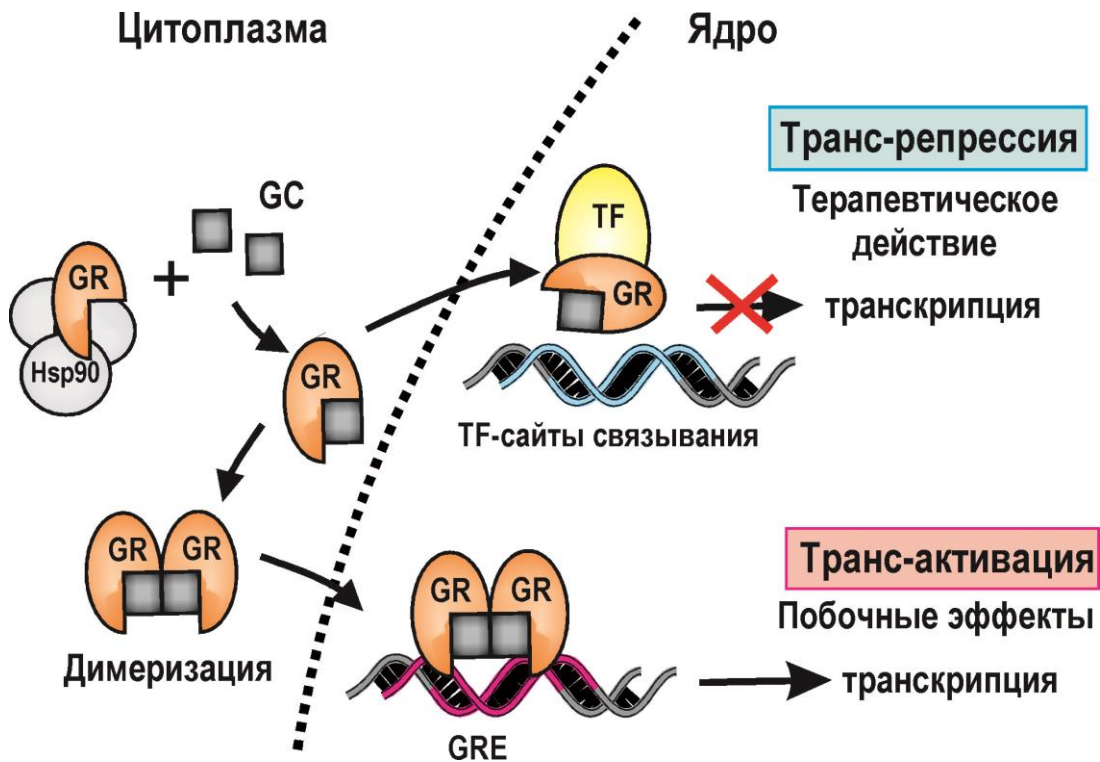


Рисунок 3 - Механизм действия глюкокортикоидов

После связывания гормона происходит замещение FKBP51 иммуофилином FKBP52, в результате чего комплекс перемещается в ядро клетки [7]. Это перемещение осуществляется за счет непосредственного контакта FKBP52 с моторным белком динеином, способным перемещаться вдоль микротрубочек цитоскелета по направлению к ядру, с использованием АТФ в качестве источника энергии. Таким образом, GR-содержащий белковый комплекс перемещается вдоль микротрубочки за счет работы динеина [8]. Также после связывания с лигандом может происходить димеризация рецептора.

В ядре GR связывается непосредственно с GRE в промоторных и энхансерных областях генов-мишеней или взаимодействует с другими белками транскрипционного комплекса, в результате чего происходит регуляция экспрессии GC-зависимых генов (рис. 3). Консенсусная последовательность GRE представляет собой несовершенный палиндром со структурой GGAACAnnnTGTTCT, состоящий из двух комплементарных шестинуклеотидных участков, разделенным варибельным линкером. GR связывается с данной последовательностью в виде гомодимера, причем одна субъединица

димеризованного рецептора связывается с одной шестинуклеотидной последовательностью. Тринуклеотидный вариабельный участок, разделяющий компоненты палиндрома, необходим для более точного и прочного связывания димера GR с ДНК. Было показано, что посредством связывания рецептора с рядом GRE реализуется GC-зависимая индукция транскрипции большого количества генов. Такой тип GRE называют активирующими или положительными GRE [9]. Однако также при анализе специфических последовательностей в геноме было продемонстрировано, что взаимодействие GR с классическими GRE может также приводить к репрессии генов-мишеней. После дальнейших исследований были описаны отрицательные или негативные GRE (nGRE), которые опосредуют GC-зависимую репрессию генов. Консенсусная последовательность nGRE, CTCC(n)<sub>0-2</sub>GGAGA, также является палиндромной, но отличается от положительных GRE вариабельным спейсером, состоящим из 0-2 нуклеотидов. За счет данных структурных особенностей с nGRE способны связываться только мономеры GR [10]. В геноме присутствует большое количество nGRE, и в настоящее время одним из актуальных направлений исследований является изучение степени подавления экспрессии GC-регулируемых генов посредством связывания рецептора с данными последовательностями. Также нерешенным остается вопрос о том, возможна ли активация генов при взаимодействии с nGRE. При анализе локализации сайтов связывания GR с ДНК и динамики взаимодействия рецептора с ними было показано, что на связывание рецептора с GRE влияет доступность хроматина, которая в свою очередь, определяется фенотипом и функциональным статусом клетки. Так, GRE отличаются по чувствительности к GC: с некоторыми GRE рецептор связывается при довольно низких концентрациях глюкокортикоидов, проявляя гиперчувствительность, в то время как взаимодействие с другими GRE требует высокой концентрации лиганда. Этот эффект обладает тканеспецифичностью. Также на чувствительность конкретных GRE влияют также наличие в непосредственной близости ДНК-связывающих белков-коактиваторов, а также доступность хроматина. В частности, чувствительность

GRE, с которым связаны белки-ко-факторы GMEB-1 и-2, может повышаться или понижаться в зависимости от присутствия других ко-факторов. При отсутствии ко-факторов GMEB-1 и-2 данный эффект не наблюдали [11-13]. Более того, в мировой литературе описан ряд генов, содержащих в своих промоторах гиперчувствительные GRE с различным уровнем клетках одного геноза, но разных линий [14]. В частности, экспрессия GC-регулируемого гена тирозин аминотрансферазы (TAT) запускается при очень низких дозах Dex в клетках гепатомы крыс FU5-5, однако индукция экспрессии данного гена в клетках гепатомы крыс HTC требует более высоких концентраций GC [15]. Было показано, что экспрессия GC-зависимого гена PER1, кодирующего основного из регуляторов циркадных ритмов у млекопитающих [16-21], запускается при воздействии низких, наномолярных концентраций Dex, что, в частности, может способствовать разработке подходов к регуляции циркадных ритмов у человека без развития негативных побочных эффектов от высоких доз экзогенных глюкокортикоидов [22, 23]. Аналогичные исследования в области гиперчувствительных GRE в GC-зависимых генах-регуляторах клеточного цикла, апоптоза, воспаления и др, также может способствовать увеличению терапевтического индекса GC.

Взаимодействие GR с ДНК очень динамично: переход GR из связанного в несвязанное состояние и обратно занимает несколько секунд [24]. После образования связи с GRE рецептор претерпевает дополнительные конформационные изменения, которые приводят к привлечению комплекса ко-регуляторов и ремоделированию хроматина в областях, смежных с областью связывания. Далее комплекс связанного с GRE GR с ко-регуляторами способен воздействовать на активность РНК-полимеразы II и увеличивать или, наоборот, снижать скорость транскрипции генов. Ко-факторы, участвующие в активации транскрипции, включают в себя белки-коактиваторы стероидных рецепторов (steroid receptor coactivator 1 SRC1-3), гистон-ацетилтрансферазы CBP (CREB-binding protein) / p300 и связанную с коактиватором аргинин метилтрансферазу (coactivator-associated arginine methyltransferase 1 CARM1)

Альтернативным механизмом, посредством которого GR может ингибировать экспрессию гена, является транс-репрессия, представляющая собой представляет собой основной механизм, с помощью которого GR ингибирует активность про-пролиферативных и провоспалительных факторов транскрипции, включая NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB, NF-AT, STAT6, IRF3, STAT3, GATA-3 и t-Bet [25].

Так, было показано, что образование комплекса GR с рядом белков семейства STAT (signal transducer and activator of transcription), вне зависимости от связывания рецептора с GRE, улучшает транскрипцию GR-зависимых генов. В то же время, было продемонстрировано, что взаимодействие GR с провоспалительными факторами транскрипции AP-1 и NF- $\kappa$ B приводит к снижению их активности, что считается основным механизмом противовоспалительного действия GC. GR связывает субъединицу c-Jun белкового комплекса AP1 и p65 субъединицей комплекса NF- $\kappa$ B, что препятствует активации транскрипционной функции данных белков. Однако для ряда других факторов транскрипции необходимо связывание GR с ДНК, поскольку затем рецептор способен взаимодействовать с соседними факторами транскрипции. Ключевым моментом данного процесса является GR-зависимый рекрутинг белка 1, взаимодействующего с GR (GRIP1 GR Interacting Protein1), транскрипционного ко-регулятора семейства p160 [22]. Интересно отметить, что степень реализации противовоспалительного действия GC зависит от пола исследуемого объекта. Так, было показано, что у самцов крыс линии Sprague-Dawley GC способны подавлять транскрипцию большего количество воспалительных генов и, соответственно, стимулируют более выраженный противовоспалительный ответ по сравнению с самками [26]. Существует гипотеза, что в основе полового диморфизма в ответе организма на GC лежит модулирование активности AP-1 и NF- $\kappa$ B и соответствующие изменения профилей экспрессии генов. Дальнейшее изучение полового диморфизма необходимо для исследования механизмов предрасположенности женщин к аутоиммунным заболеваниям, таким как ревматоидный артрит и системная

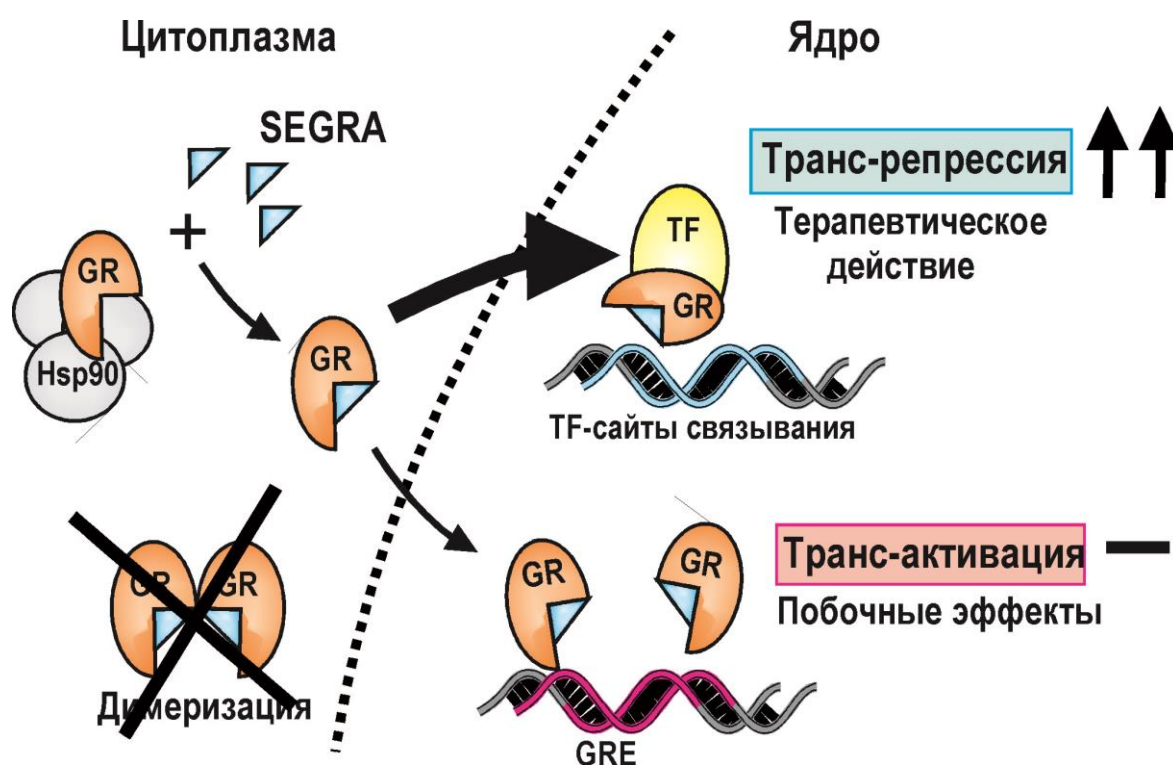
красная волчанка, а также оптимизации терапевтических доз GC согласно полу пациента.

Возраст также может влиять на чувствительность к GC. В частности, у женщин была обнаружена усиленная секреция АСТН и гидрокортизона по сравнению с мужчинами при тестировании комбинированного воздействия Dex и CRH. Несколько исследований обнаружили, что происходит снижение ингибирования отрицательной обратной связи с высвобождением АСТН гипофизом у женщин и мужчин в возрасте от 59 лет до 76 лет, которое можно объяснить увеличением биосинтеза гидрокортизона. Однако точный механизм тканеспецифического, связанного со старением, изменения чувствительности к GC еще не изучен [27].

#### Внегеномный механизм действия GR

GR может также действовать посредством активации внегеномного механизма, реализация которого в большинстве случаев очень быстрая и занимает от нескольких секунд до минут, и не включает в себя изменения в экспрессии генов путем непосредственного взаимодействия с ДНК. Описанное выше взаимодействие GR с AP-1, NF-κB и другими транскрипционными факторами приводит к изменению активности ключевых киназ сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR, MAPK и ряда других. Свой вклад могут вносить и непрямые эффекты GR, реализующиеся как следствие изменения функциональной активности GR-зависимых факторов транскрипции. В частности, GC-регулируемое высвобождение белков, связанных с неактивным GR в цитоплазме, таких как нерцепторная тирозинкиназа c-Src, может опосредовать негеномные действия глюкокортикоидов. После диссоциации комплекса c-Src активирует множественные киназные каскады, которые приводят к фосфорилированию Аннексина 1, ингибированию активности цитозольной фосфолипазы A2 и нарушению секреции арахидоновой кислоты. Было также показано, что существует мембраносвязанная форма GR (mGR), локализованная на плазматической мембране в кавеолах посредством взаимодействия с кавеолином. Активация mGR после связывания с лигандом приводит к повышению активности c-Src, MAPK-зависимому фосфорилированию коннексина-43, что в свою очередь

приводит к нарушению межклеточных щелевых контактов. Подобные косвенные негеномные эффекты GC еще более усложняют биологический эффект данных гормонов на нормальные и опухолевые клетки, в связи с чем в ряде случаев затруднительно предсказать конечный результат их действия [22]. Здесь необходимо отметить, что селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), способные активировать GR только по механизму транс-репрессии, разработке которых посвящена представленная работа, обладают соответственно более узким на процессы клеточной пролиферации и метаболизма, что в целом делает их эффект более локализованным, предсказуемым и терапевтически выгодным (рисунок 4).



**Рисунок 4** – Механизм действия SEGRA

Изменения профиля экспрессии генов при действии GC и связанные с ними изменения процессов жизнедеятельности клетки также могут зависеть от типа глюкокортикоида, который связывает и активирует рецептор, а также от уровня его экспрессии и концентрации в клетке. Различия в структуре GC приводят к различиям в аффинности связывания с рецептором и, в последующем, в конформации рецептора, связывании ДНК, ремоделировании хроматина и/или



рекрутировании ко-регуляторов, а также в непосредственном взаимодействии с белковыми молекулами. В отношении влияния концентрации стероидов на степень реализации их эффектов в клетке было показано, что, в частности, GR-зависимая транс-репрессия, опосредованная связыванием с NF-κB и последующим подавлением экспрессии провоспалительных генов происходит при гораздо более низких концентрациях GC, нежели индукция экспрессии генов.

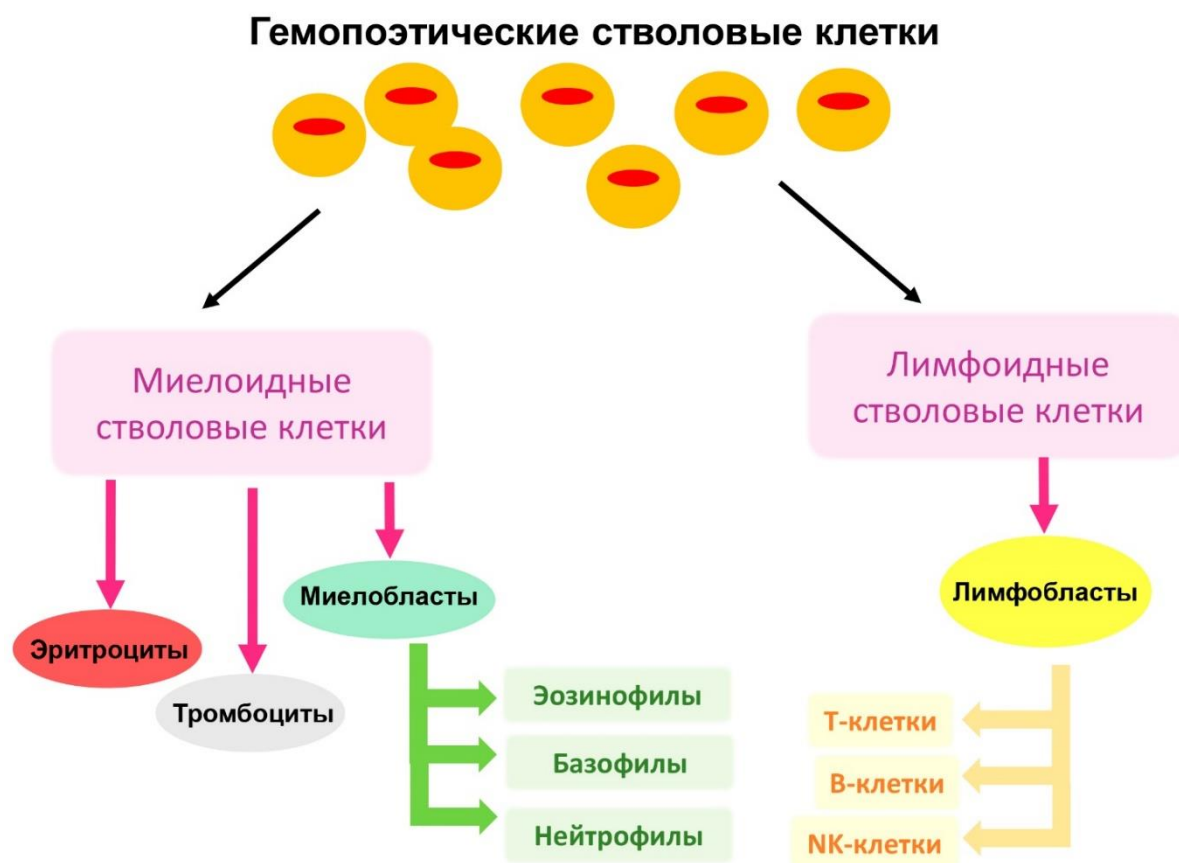
В совокупности данные исследований геномного и внегеномного механизма действия GR, а также изучение влияния различных факторов на активацию рецептора, свидетельствуют о том, что по мере выявления конкретных GR-зависимых механизмов, лежащих в основе различных патологий, тщательный подбор используемого GC и его дозы могут способствовать оптимизации терапии с использованием GC и привести к повышению терапевтического индекса (соотношения между терапевтическим и побочным действием) стероидов и снижению риска для пациентов, принимающих данные гормоны. Более того, в течение последних 15 лет были предприняты активные усилия для разработки уже упомянутых выше новых лигандов GR, называемых «диссоциированными» лигандами или селективными агонистами GR (SEGRA). При связывании SEGRA с рецептором образующийся комплекс не способен димеризоваться, что существенно ингибирует взаимодействие рецептора с позитивными GRE; способность к реализации транс-репрессии посредством связывания с факторами транскрипции или с pGRE при этом сохраняется в полном объеме. В настоящее время ряд разработанных SEGRA проходит доклинические испытания, но только малая часть данных соединений была включена в клинические исследования. В разделе 1.4.3. будут более подробно рассмотрены известные на данный момент SEGRA. Разработке подобного рода препаратов посвящена и представленная работа, что делает ее весьма актуальной не только в области молекулярной онкологии, но и в области исследования воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

### ***1.1.3. Действие глюкокортикоидов на клетки иммунной системы в норме и при опухоли***

Широкое применение GC в химиотерапии гемобластозов обусловлено их специфическим цитотоксическим эффектом на большинство клеток иммунной системы (рисунок 5). Понимание детального механизма действия на конкретные типы клеток может способствовать разработке оптимальных протоколов лечения пациентов со злокачественными новообразованиями кроветворной системы, а также воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Воспалительные и аутоиммунные заболевания схожи со злокачественными новообразованиями кроветворной системы в том отношении, что сопровождаются увеличением содержания и активности иммунных клеток, повышением продукции иммуноглобулинов, простагландинов, хемокинов и цитокинов. Для лечения воспалительных процессов GC используют с 50х гг. прошлого века, когда впервые был продемонстрирован противовоспалительный эффект гидрокортизона у пациентов с ревматоидным артритом. С тех пор GC остаются «золотым стандартом» в противовоспалительной терапии.

Лейкоциты представляют собой клетки, участвующие в защите организма от патогенов. Их формирование происходит в костном мозге из специализированных клеток-предшественников. После дифференцировки и созревания под влиянием различных цитокинов и факторов транскрипции лейкоциты разделяются на классы гранулоцитов или агранулоцитов. Гранулоциты характеризуются сегментированным ядром и в свою очередь подразделяются на нейтрофилы, базофилы, эозинофилы и тучные клетки. Каждый тип гранулоцитов имеет определенную роль во время ответа на стресс: травму, инфекцию или воспаление. В частности, нейтрофилы обладают фагоцитарной и микробицидной активностью, которая реализуется после привлечения нейтрофилов в очаг воспаления и характеризуется индукцией активности миелопероксидазы, фермента лизосом, чья функция заключается в образовании гипохлорит-аниона и реализации окислительных бактерицидных процессов. Эозинофилы обладают антипаразитарным действием за счет разрушающего

гистамин фермента гистаминазы, содержащегося в эозинофильных гранулах в цитоплазме клетки. Тучные клетки опосредуют аллергические реакции также за счет гистаминаз, гепариназ, триптаз и химаз, содержащихся в цитоплазматических гранулах клеток данного типа. При активации аллергенами происходит дегрануляция тучных клеток и высвобождение содержимого описанных цитоплазматических гранул, что приводит к развитию аллергической реакции немедленного типа. При этом также увеличивается экспрессия генов провоспалительных цитокинов. Второй основной класс иммунных клеток состоит из агранулоцитов, которые разделяются на моноциты и лимфоциты. Моноциты в дальнейшем дифференцируются либо в макрофаги, либо в дендритные клетки. Макрофаги представляют собой крупные клетки неправильной формы, содержащие многочисленные вакуоли, предназначенные для фагоцитоза остатков некротических тканей и патогенных микроорганизмов. Дендритные клетки представляют собой клетки круглой, овальной или полигональной формы, основная функция которых состоит в презентации антигенов В и Т-лимфоцитам. В-лимфоциты участвуют в продукции антиген-специфических антител, в то время как Т-лимфоциты участвуют в клеточно-опосредованном иммунитете и продукции цитокинов. Почти все иммунные клетки чувствительны к действию GC. При этом опухоли кроветворной системы могут происходить из любых ее клеток. Действие GC на отдельные типы клеток иммунной системы рассмотрено ниже.



**Рисунок 5** - Клетки, входящие в состав иммунной системы человека

### ***1) Макрофаги***

Макрофаги или фагоциты активируются компонентами бактериальных клеток, такими как липополисахарид (ЛПС) или эндотоксин, которые связываются с Toll-подобными рецепторами (Toll-like receptors, TLR), расположенными на поверхности макрофагов. Активация TLR приводит к запуску сигнальных путей MAP-киназ (p38-MAPK, ERK и JNK) и усилению транскрипции генов, соответствующим провоспалительным цитокинам. GC способны ослаблять воспалительные реакции за счет эффектов GR на компоненты данных сигнальных путей. В частности, предварительная обработка макрофагов, выделенных из костного мозга, синтетическим глюкокортикоидом дексаметазоном, после активации TLR с помощью ЛПС приводила к подавлению фосфорилирования JNK и MAP-киназы p38. В то же время снижения степени фосфорилирования ERK не наблюдали, что свидетельствует о дифференциальном действии GC на MAP-киназный каскад в этих клетках [28]. Кроме того, отмечали

подавление экспрессии провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как интерферон-гамма ( $IFN\gamma$ ), интерлейкин  $1\alpha$  и интерлейкин  $1\beta$  ( $IL-1\alpha$  и  $IL-1\beta$ ), как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Данные процессы опосредованы взаимодействием GR в комплексе со своим ко-регулятором GRIP1 с пролиферативными и провоспалительными транскрипционными факторами, такими как AP-1 и NF $\kappa$ B и подавлением их активности. Повышение экспрессии GR-зависимого гена, кодирующего фосфатазу 1 двойной специфичности (DUSP1), также вносит свой вклад в реализацию противовоспалительного действия GC в макрофагах за счет подавления активности MAP-киназ [29].

Активированный GR также отрицательно регулирует экспрессию провоспалительных генов путем взаимодействия с TF, такими как AP-1 и NF- $\kappa$ B у промотора генов-мишеней. Одним из таких TF является белок-коактиватор GR, корегулятор GRIP1, который несет в себе специфический участок, который, при связывании с ДНК, ингибирует экспрессию целевых генов [30]. У мышей с нокаутом GRIP1 были обнаружены дефекты развития надпочечников и секреции GC, а также нарушения метаболизма и репродуктивной функции. Роль GRIP1 в противоопухолевом действии GC изучали на мышях с нокаутом GRIP1 в макрофагах. После проведения геномного анализа транскриптома данных макрофагов было показано, что экспрессия порядка 40% процентов ЛПС-индуцированных и затем подавляемых GC генов у животных дикого типа не была подавлена у животных с нокаутом GRIP1. Среди подобных генов отмечали цитокины  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $TNF\alpha$  и CCL4. Таким образом, было подтверждено, что GRIP1 действительно является важным медиатором эффектов GR в макрофагах. Роль макрофагов как мишеней для противовоспалительного действия GC также была исследована на моделях заболеваний, связанных с развитием хронического воспаления *in vivo*. В частности, у мышей с нокаутом GR в макрофагах, в отличие от животных с GR дикого типа, не наблюдали снижение гиперчувствительности кожного покрова, индуцируемого на ушах агентами местнораздражающего действия 2,4-динитрофторбензолом или оксазолоном [31].

## ***2) Дендритные клетки***

Дендритные клетки представляют собой антиген-представляющие клетки, которые существуют либо в виде недифференцированных незрелых клеток, либо полностью дифференцированных клеток в селезенке и в лимфатических узлах. Функция незрелых дендритных клеток заключается в захвате патогена, его расщепления и последующей презентации антигена цитотоксическим Т-лимфоцитам. Зрелые дендритные клетки характеризуются низкой способностью к фагоцитозу, но при этом презентуют антиген на поверхности в значительном количестве и эффективно стимулируют активность Т-клеток. При исследовании эффектов GC на дендритные клетки было показано, что дексаметазон подавляет созревание дендритных клеток и значительно снижает экспрессию ко-стимулирующих молекул, таких как МНС I, МНС II (major histocompatibility complex 1,2- главный комплекс гистосовместимости) и CD80 (cluster of differentiation 80, кластер дифференцировки 80), а также продукцию провоспалительных цитокинов, что, в свою очередь, к подавлению пролиферации Т-клеток [31].

## ***3) Т-лимфоциты***

Т-лимфоциты представляют собой небольшие клетки, которые циркулируют в кровеносном русле в незрелом состоянии и погибают в отсутствие активации антигеном. Однако при активации Т-клетки дифференцируются в эффекторные Т-лимфоциты различных типов (клетки Т-helper Th1, Th2, Th17 и Tregs). Th усиливают адаптивный иммунитет посредством активации клеток иммунного ответа, обладая способностью распознавания фрагментов чужеродных антигенов, а также выделяя различные цитокины. Th распознают антигены при взаимодействии их Т-клеточного рецептора с антигеном, связанным с молекулами МНС-II. Th1-клетки продуцируют IL-2, IFN- $\gamma$  и TNF $\alpha$ , Th2-клетки продуцируют IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13 и участвуют в гуморальных и аллергических реакциях. GC ингибируют выработку цитокинов Th1 и Th2. В то же время было показано, что у человека GC ингибируют синтез IL-12 (что способствует

выживанию Th1), в то время как производство ИЛ-10 остается относительно устойчивым, что благоприятно отражается на развитии Th2 [32].

#### 4) *Нейтрофилы*

Основными функциями нейтрофилов являются разрушение патогенов, в частности, бактерий, в очаге воспаления и дальнейшего фагоцитоза остатков. После фагоцитоза в нейтрофилах запускается индукция апоптоза, а макрофаги элиминируют образовавшиеся апоптотические тельца из тканей, что способствует возвращению к тканевому гомеостазу. Однако при сохранении активности нейтрофилов в течение длительного времени, в них происходит накопление и секреция цитотоксических сериновых протеаз, такие как нейтрофильная эластаза и металлопротеиназы, которые еще более усугубляют инфекционный процесс.

Во многих исследованиях сообщалось о антиапоптотическом эффекте *in vitro* глюкокортикоидов на нейтрофилах человека. GC, в том числе и дексаметазон (Dex), ингибируют спонтанный апоптоз нейтрофилов, антиапоптотический эффект Dex отменяется ингибиторами транскрипции / трансляции и опосредуется через GR [33]. Dex не действует путем уменьшения проапоптотических факторов, но вместо этого увеличивает антиапоптотические факторы, такие как Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1) и IAP (Inhibitor of apoptosis proteins), посредством трансактивации. Повышение регуляции этих молекул коррелирует с подавлением различных нисходящих путей апоптоза. Эти механизмы могут инициироваться GR-опосредованной трансактивацией антиапоптотических генов независимо от внутриклеточных сигнальных молекул и факторов транскрипции или в сочетании с ними. Также GC предотвращают миграцию нейтрофилов в воспаленные ткани посредством регуляции GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) и аннексина A1 [34].

#### 5) *Тучные клетки*

Тучные клетки являются эффекторными клетками аллергических и воспалительных реакций. Они экспрессируют на поверхности рецептор к

иммуноглобулину E (IgE), так называемый рецептор Fc (FcRI), Toll-подобный рецептор TLR, рецептор фактора роста стволовых клеток (SCFR) и рецептор к иммуноглобулину G (IgG), участвующие в системе активации клеток иммунной системы. Основным сигнальным путем, отвечающим за функциональную активность тучных клеток, является каскад, запускаемый FcRI. GC ингибируют активацию тучных клеток за счет воздействия на различные сигнальные каскады. В частности, было показано, что GC снижают активность киназ Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase) в тучных клетках, что впоследствии подавляет продукцию арахидоновой кислоты и цитокинов. Действия GC происходят за счет увеличения FcRI-зависимого фосфорилирования Erk1 и 2 [31]

#### **6) Базофилы**

Базофилы относятся к наименее представленной циркулирующей лейкоцитарной популяции, ответственные за продукцию медиаторов воспаления, молекул IgE. Посредством продукции IgE базофилы наряду с базофилами активно участвуют в патогенезе аллергической реакции. GC сокращают продолжительность жизни базофилов путем индукции в них апоптоза, ингибируют их дегрануляцию и продукцию цитокинов, препятствуют миграционным реакциям [35].

#### **7) В-лимфоциты**

Развитие В-клеток начинается в костном мозге, где гемопоэтические стволовые клетки дифференцируются в В-клетки-предшественники. Роль GC на развитие Т-клеток довольно широко изучена, однако мало данных существует в мировой литературе о влиянии GC на развитие и процессы жизнедеятельности В-клеток. В частности, известно, что GC изменяют продукцию антител и модулируют уровни маркеров клеточной поверхности. Было показано, что при обработке Dex моноядерных клеток периферической крови человека наиболее высокую продукцию IgG наблюдали в В-клетках. Применение Dex вызывает снижение уровня экспрессии МНСII в В-клетках *ex vivo* и *in vivo*. В ряде



исследований было также показано, что длительное применение GC снижает количество В-клеток *in vivo*. Терапия мышей преднизолоном приводит к уменьшению массы селезенки, а также к уменьшению количества В-клеток в костном мозге. Было также продемонстрировано, что Dex вызывает гибель клеток-предшественников в костном мозге. Однако, несмотря на то, что в подобных исследованиях показано, что GC способны модулировать функциональную активность В-клеток, это не объясняет способность GR индуцировать апоптоз во время развития В-клеток [36]. Здесь необходимо отметить, что незрелые В-клетки более чувствительны к GC-индуцированному апоптозу, чем зрелые. При этом терапия антагонистом GR мифепристоном приводит к увеличению популяции незрелых В-клеток в костном мозге. Механизм действия GC в В-клетках может заключаться в том, что GR влияет на несколько факторов транскрипции, в свою очередь влияющих на активность сигнального пути В-клеточного рецептора (BCR), в частности, AP-1, NF-κB и NFAT. На мышях, нокаутных по гену-мишени GC, GILZ, было показано, что в ответ на активацию BCR происходит усиление пролиферации GILZ-дефицитных В-клетки и развитие волчаночноподобного синдрома [37].

## 1.2. Глюкокортикоиды в лечении лейкозов и лимфом

Цитотоксический эффект синтетических GC на клетки иммунной системы, в особенности лимфоциты, объясняет дальнейший интерес к данным агентам как химиопрепаратам для лечения онкологических заболеваний кроветворной системы. В первых экспериментах по противоопухолевому действию GC было показано, что кортизон вызывает регрессию опухоли перевиваемой лимфосаркомы у мышей. В дальнейшем было продемонстрировано, что GC подавляют жизнеспособность большого числа опухолей лимфоидного происхождения. Было подтверждено *in vitro* и *in vivo*, что лимфоидные клетки наиболее чувствительны к GC: в них наблюдали значительное снижение синтеза нуклеиновых кислот и белков, за которым следовала гибель клеток. Изначально было высказано предположение, что механизм снижения жизнеспособности

лимфоидных трансформированных клеток вызван нарушением энергетического обмена за счет снижения транспорта и/или фосфорилирования глюкозы. Однако затем было продемонстрировано, что GC индуцируют апоптоз в популяциях лимфоидных клеток. В настоящее время GC также используются в терапии других эндокринно-чувствительных видов рака, являются эффективными при лечении побочных эффектов химиотерапевтических препаратов и широко используются для общей паллиативной терапии.

### ***1.2.1. Механизм глюкокортикоид-индуцируемого апоптоза при злокачественных новообразованиях кроветворной системы***

GC были одними из первых препаратов, которые стали применять в терапии острого лимфобластного лейкоза, которые и в настоящее время продолжают оставаться основным ее компонентом. Цитотоксический эффект GC основан на активации GR, который либо может образовывать димер, транслоцироваться в ядро и запускать экспрессию генов, либо в виде мономера подавлять активность транскрипционных факторов за счет непосредственного взаимодействия с ними. Оба процесса могут как приводить к ингибированию продукции цитокинов, онкогенов и индукции остановки клеточного цикла и апоптоза, так и, напротив, к повышению жизнеспособности клетки

При использовании GC в качестве химиопрепарата при лечении лейкозов и лимфом преимущественным результатом их действия является апоптоз опухолевых клеток. В этом заключены большая терапевтическая ценность GC, поскольку гибель клеток по апоптотическому механизму не приводит к накоплению погибших клеток в органах или тканях за счет элиминации макрофагами апоптотических телец с интактной мембраной, и, соответственно, не вызывает системного иммунного ответа. Механизм GC-индуцируемого апоптоза включает в себя большое количество процессов, которые могут протекать параллельно. Один из процессов – это инициация апоптотического каскада посредством активации транскрипции проапоптотических генов при связывании с GRE в их промоторах и энсансерах. Однако до настоящего времени

проапоптотические гены не были идентифицированы как мишень GC-опосредованной транскрипции. По современным данным, GC-регулируемые гены в большей части отвечают за развитие побочных эффектов, а не за цитотоксическое и иммунодепрессивное действие. Вторым механизмом развития GC-опосредованного апоптоза является снижение экспрессии провоспалительных цитокинов, дальнейшей остановке клеточного цикла и, как следствие, индукции апоптоза.

Как известно, запуск апоптоза может инициироваться по двум основным механизмам. Первый механизм, называемый инструктивным апоптозом или сигнальным путем «рецептора смерти», основан на связывании специфических молекулы, таких как Fas-лиганд (FasL или CD95L) и TNF, с «рецепторами смерти» (рецепторы Fas и TNF) и запуска сигнального каскада, приводящего к активации каспазы-8. Митохондриальный или внутренний путь запуска апоптоза основан на высвобождении цитохрома C из митохондрий, активации адапторных белков: фактора, активирующего апоптотические протеазы (Apoptotic protease activating factor 1, APAF-1) и фактора, индуцирующего апоптоз (apoptosis inducing factor, AIF) и перехода инициаторной каспазы 9 в активную форму. Отдельно выделяют каспаз-независимые типы апоптоза: в частности, в нескольких исследованиях было показано участие комплекса протеасом в GC-индуцированном апоптозе тимоцитов. Ингибирование протеасом предотвращает нарушение мембранного потенциала митохондрий и ядерную фрагментацию в тимоцитах. Протеасомная деградация вызывает ингибирование с-IAP1 и XIAP, что ведет к GC-индуцированному апоптозу. При лечении GC происходит увеличение внутриклеточного уровня перекиси водорода в тимоцитах. Это предшествует потере мембранного потенциала митохондрий, выделению цитохрома C и активации каспазы-3 [38].

Как было показано, основным сигнальным путем апоптоза, индуцируемым GC, является каспаз-зависимый апоптоз. Было продемонстрировано участие в GC-опосредованном апоптозе эффекторных каспаз, каспазы-3, каспазы-6 и каспазы-7 [39]. Активацию каспазы 3 наблюдали в клетках В-клеточного лейкоза человека

при обработке их GC. На клетках лимфомы мыши также была показана ключевая роль каспазы 3 в апоптозе, индуцированном Dex. Однако в ряде других исследований участие каспазы 3 в GC-опосредованном апоптозе подвергалось сомнению. Так, в экспериментах на модельной системе Casp3-дефицитных мышей с нокаутом каспазы 3 отмечали развитие Dex-индуцированного апоптоза. Более того, было высказано предположение, что каспаза 6, а не каспаза 3, является основной эффекторной каспазой GC-индуцированного апоптоза, которое было подтверждено с использованием клеточной линии острого лимфобластного пре-B-клеточного лейкоза 697, где было показано расщепление и активация каспазы 6 во время GC-опосредованного апоптоза [40].

В дальнейших исследованиях были изучены другие механизмы GC-индуцируемого апоптоза и показано, что преимущественно данные гормоны запускают митохондриальный апоптоз. В частности, в экспериментах *in vivo* на мышцах, нокаутированных по гену каспазы 8, основной эффекторной каспазы инструктивного апоптоза, было показано развитие GC-индуцированного апоптоза в полном объеме, что подтверждает реализацию апоптоза, вызванного GC, по митохондриальному пути. GC также могут влиять на запуск инструктивного апоптоза. Более того, существует ряд данных, свидетельствующих о способности GC препятствовать запуску инструктивного апоптоза так, было продемонстрировано, что GC могут предотвращать повышение экспрессии FasL, подавляя тем самым индукцию программируемой гибели клетки [41, 42]. На модели лимфомы у мышей WEN17.2 было показано также, что GC снижают протеолитическую активность каспазы 8. Более того, в литературе описано, что GC способны препятствовать передаче сигнала при инструктивном апоптозе путем ингибирования экспрессии CD95-L в T-лимфоцитах [43]. Однако в этой области к настоящему времени недостаточно литературных данных о влиянии GC на запуск инструктивного апоптоза.

Белки семейства Bcl-2 являются ключевыми компонентами запуска и одновременно ингибирования митохондриального апоптоза, поскольку данное семейство включает в себя как антиапоптотические, так и проапоптотические

белки. Антиапоптотический белок Bcl-2 является структурным и функциональным гомологом с антиапоптотическим геном нематоды *Caenorhabditis elegans* *ced-9*. Bcl-2 был впервые обнаружен как продукт хромосомной транслокации в фолликулярной лимфоме. Транслокация t (14; 18) включает в себя эффекторную часть гена Bcl-2, обычно расположенного на хромосоме 18q21, с энхансерными элементами локуса тяжелой цепи иммуноглобулина на хромосоме 14q23, что приводит к гиперэкспрессии данного гена. Данная транслокация наблюдается при многих типах гемобластозов [44]. Потенциальным механизмом, посредством которого Bcl-2 подавляет запуск апоптоза, является ингибирование каспаз-активирующих белков, таких как Araf-1. Существуют также данные о том, что Bcl-2 препятствует высвобождению цитохрома C из митохондрий за счет физического взаимодействия с порами в митохондриальной мембране, а также посредством влияния на транспорт ионов Ca<sup>2+</sup> [40, 45].

Большое количество экспериментов было проведено для определения про- и антиапоптотических эффектов членов семейства Bcl-2 в индуцированном GC апоптозе. Исследования, проведенные на клетках мышинной T-гибридомы, показывают, что гиперэкспрессия Bcl-2 блокирует высвобождение как цитохрома C, как и AIF в ответ на GC. Ключевая роль Bcl-2 в подавлении GC-индуцированного апоптоза также была подтверждена с использованием мышей, дефицитных по гену Bcl-2, в лимфоцитах и тимоцитах которых наблюдали мгновенное развитие апоптоза после обработки животных GC. Таким образом, эти данные свидетельствуют о том, что уровень Bcl-2 определяет чувствительность клеток к GC. Важную роль в индуцированном GC апоптозе играет функциональная активность митохондрий и эндоплазматического ретикулума, поскольку данные органеллы представляют собой основные участки локализации белка Bcl-2 [46].

Роль антиапоптотического белка Bcl-xL в данном процессе менее ясна. Известно, что Bcl-xL транслоцируется в митохондрии после обработки GC. Показано, что гиперэкспрессия Bcl-xL в клеточной линии T-гибридомы блокирует

индуцированный GC апоптоз, а устойчивая экспрессия Bcl-xL в тимоцитах является была ассоциирована с их резистентностью к индуцированному GC апоптозу *in vivo*. Таким образом, Bcl-xL способствует снижению чувствительности лимфоцитов к индуцированному GC апоптозу.

Проапоптотические члены семейства Bcl-2 также вовлечены в развитие GC-индуцированного апоптоза. В то время как у тимоцитов от мышей с нокаутом Bax или Bak не выявили различий в чувствительности к GC-индуцированному апоптозу, в клетках, полученных от животных с двойным нокаутом, наблюдали резистентность к GC-опосредованной гибели. Однако точный механизм действия данных белков к настоящему времени не изучен. Роль еще одного проапоптотического белка данного семейства Bad, который посттрансляционно регулируется Akt/ПКВ-зависимым фосфорилированием также до конца не изучена [38].

GC влияют и на другие эффекторные и сигнальные молекулы, участвующие в развитии апоптоза. К таким эффекторным молекулам относится белок SMAC/DIABLO, основной функцией которого при запуске апоптоза является GC связывание белков семейства ингибиторов апоптоза (inhibition of apoptosis protein, IAP) и соответствующее подавление их активности [47]. В нормальных клетках члены семейства белков IAP предотвращают развитие случайного апоптоза за счет ингибирования ферментативной активности зрелых каспаз. Однако в опухолевых клетках белки семейства IAP зачастую гиперэкспрессированы. Ингибирование IAP приводит к высвобождению SMAC, который в неактивном состоянии находится в митохондриях. Из митохондрий совместно со SMAC высвобождается в цитоплазму и цитохром С. В то время, как цитохром С взаимодействует с Araf-1, активируя его, что приводит к дальнейшей активации каспазы-9, SMAC связывается с XIAP, с-IAP1, с-IAP2 и сурвивином, препятствуя им ингибировать каспазу-9 и каспазу-3. В отношении влияния GC на активность SMAC было показано, что в клетках, обработанных Dex, SMAC высвобождается в цитозоль, где он активирует каспазу-9 без одновременного высвобождения цитохрома С и олигомеризации Araf-1. Эти наблюдения подтверждались

данными о том, что при апоптотической гибели клеток под действием GC активация каспазы-3 происходила без цитохрома C. В дальнейших исследованиях наблюдали накопление SMAC в цитозоле и специфическую активацию каспазы-9 при обработке клеток Dex [40, 48].

В клетках нервной ткани GR-опосредованный апоптоз сопровождается увеличенным уровнем экспрессии p53 и проапоптотического гена Bax. Было описано повышение уровня экспрессии других проапоптотических генов Bim и Bad, что приводит к транслокации Bax в митохондрии, высвобождению цитохрома C и развитию митохондриального апоптоза. В ряде исследований GC-зависимый апоптоз сопровождается снижением экспрессии Bcl-2 и дефосфорилированием Bad, что способствует его внедрению в мембрану митохондрий, ее деполяризации, разрушению и высвобождению цитохрома C [49]. В отношении p53 большое количество исследований свидетельствует о том, что данный опухолевый супрессор не участвует напрямую в GC-опосредованном апоптозе. Более того, было показано, что индуцированный GC-апоптоз значительно повышается у мышей, лишенных одного или обоих функциональных аллелей p53. Эти данные свидетельствуют о том, что p53 подавляет гормонально-зависимую транскрипционную активность GC и, более того, что активация p53 может быть вовлечена в механизм резистентности к GC [50].

### ***1.2.2. Глюкокортикоид-опосредованное подавление пролиферативной активности клетки***

Апоптоз и пролиферация представляют собой две составляющие клеточного и тканевого гомеостаза. Остановка клеточного цикла сама по себе может служить апоптотическим сигналом, особенно в активно пролиферирующих опухолевых клетках. Многие GR-зависимые гены играют важную роль в прогрессии клеточного цикла, особенно при переходе из фазы G1 в фазу S, с чем связана большая часть их действия в качестве химиотерапевтического препарата. Так, было продемонстрировано, что GC приводят к остановке клеточного цикла в фазе G1 в клетках T-клеточного лейкоза человека, а также трансформированных

лимфоидных клетках, сопровождающейся снижением экспрессии онкогена *c-myc* и регулятора клеточного цикла циклина D3, а также индукцией экспрессии ингибитора циклин-зависимых киназ p21/Waf1. Другие негативные регуляторы фазы G1, такие как E2F, p53 и Rb, также участвуют в апоптозе, что дополнительно приводит от остановки клеточного цикла к запрограммированной гибели клеток [51].

Снижение пролиферативной активности клетки также достигается за счет взаимодействия GR с про-пролиферативными факторами транскрипции. Одним из наиболее известных факторов такого рода является NF-κB, гетеродимерный транскрипционный фактор, запускающий транскрипцию генов, кодирующих цитокины и их рецепторы, хемотаксические белки и молекулы адгезии. В неактивной форме NF-κB находится в цитоплазме в комплексе со своим ингибитором, белком IκB. Активация NF-κB может происходить через множество внеклеточных сигналов, которые индуцируют фосфорилирование и убиквитинирование IκB-α, что приводит к его протеолитической деградации. Затем NF-κB перемещается в ядро, где он активирует транскрипцию генов. Одним из таких генов является ген, кодирующий сам IκB-α, который ресинтезируется и запускает формирование транскрипционно-неактивных комплексов NF-κB, функционируя таким образом по механизму отрицательной обратной связи. Существует два основных механизма ингибирования активности NF-κB при действии GC. Согласно одному механизму, GC могут индуцировать синтез IκBα, который ингибирует NF-κB за счет блокировки его участков ядерной локализации и препятствуя тем самым его транслокации в ядро, а также за счет подавления связывания NF-κB с ДНК. Второй механизм подразумевает активацию транс-репрессии: белок-белковое взаимодействие GR и NF-κB и подавление активности последнего. Существуют также данные о том, что GR и NF-κB конкурируют за связывание с белками ко-активаторами, которые опосредуют транскрипционную активность как ядерных рецепторов, так и многих факторов транскрипции. Более того, было показано, что в клетках аденокарциномы легких A549 активированный



GR препятствует фосфорилированию остатка серина 2 РНК-полимеразы II, являющейся компонентом NF-κB-зависимого транскрипционного комплекса.

Другой мишенью GR-опосредованной транс-репрессии является транскрипционный фактор AP-1. Экспериментально доказано, что GR напрямую взаимодействует с AP-1. GR и AP-1 взаимно блокируют способность друг друга к транс-активации, что предотвращает последующую транскрипцию и AP-1-, и GR-зависимых пропролиферативных генов. По ряду данных, взаимодействие с GR приводит к конформационному изменению гетеродимера AP-1, что, в свою очередь, ингибирует его транскрипционную активность, поскольку в подобном конформационном состоянии AP-1 не способен связываться с респонсивными элементами GC.

Протоонкоген *c-myc* играет важную роль в контроле нормального роста и дифференцировки клеток. Гиперэкспрессия *c-myc* была обнаружена в различных типах опухолей, включая лейкозы, лимфомы и мелкоклеточную аденокарциному лёгких. Механизм действия белка *c-Myc* известен не полностью, однако существует корреляция между клеточной пролиферацией и геном *c-myc*. Кроме того, уровни мРНК *c-myc* снижаются в дифференцирующих и покоящихся клетках по сравнению с пролиферирующими клетками, что также указывает на определенную роль *c-myc* в выживании клеток. В отношении GC, в клетках острого лимфобластного лейкоза SEM-C7 было показано, что одновременно с развитием GC-индуцированного апоптоза, наблюдается повышение экспрессии *c-myc*, что способствовало в ряде экспериментов уходу данных клеток от апоптоза. Однако в других сериях экспериментов при обработке клеток Т-клеточного лейкоза различными стероидами наблюдали подавление экспрессии *c-myc*. Аналогичные данные были получены при обработке GC первичных нормальных и трансформированных клеток кроветворной системы, полученных от пациентов с гемобластозами или от здоровых добровольцев.

Многофункциональный цитокин IL-6 является плеiotропным фактором роста, отвечающим за регулирование различных аспектов роста, дифференцировки и пролиферации в тканях. Было продемонстрировано, что IL-6

запускает антиапоптотические сигналы посредством активации сигнального пути киназы PI3K/Akt. В частности, IL-6 индуцирует фосфорилирование Akt, что приводит к фосфорилированию и инактивации проапоптотических молекул, таких как Bad, каспаза 9, киназа гликогенсинтазы-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), а также транскрипционных факторов семейства Forkhead, отвечающих за синтез ингибитора циклин-зависимых киназ p27/KIP1. Также известно, что IL-6 активирует фосфатазу SHP2, которая активирует запуск MAP-киназного каскада. Было показано, что Dex подавляет экспрессию гена *IL-6* [52]. Промотор гена *IL-6* содержит множество сайтов связывания для известных факторов транскрипции, которые могут взаимодействовать друг с другом, проявляя синергические и антагонистические эффекты в отношении индукции транскрипции. Основным TF для ответа на воспалительные цитокины является NF- $\kappa$ B. Были проведены исследования молекулярного механизма снижения экспрессии IL-6 при действии GC в фибробластах и эндотелиальных клетках, которые являются основными продуцентами IL-6. Как было показано, подавление экспрессии IL-6 являлось результатом непосредственного GR-опосредованного снижения активности NF- $\kappa$ B, но не повышения активности I $\kappa$ B- $\alpha$  [53].

Тирозинкиназа, связанная с фокальной адгезией (related adhesion focal tyrosine kinase, RAFTK), также известная как Fyn2, является членом подсемейства киназ фокальной адгезии и активируется стрессовыми факторами, такими как TNF $\alpha$ , УФ-излучение и увеличение внутриклеточного уровня ионов Ca<sup>2+</sup>. Гемопозитические клетки характеризуются высоким уровнем экспрессии RAFTK. При активации RAFTK происходит ее фосфорилирование по остаткам тирозина. Функции RAFTK до конца не изучены. Описана позитивная регуляция RAFTK киназ p38-MAPK, JNK и Src. По данным литературы, Dex-индуцированный апоптоз, в отличие от инструктивного апоптоза, инициированного FasL, активирует RAFTK в чувствительных к стероидам клетках множественной миеломы человека линии MM.1S [54]. Введение экзогенной RAFTK дикого типа в данные клетки способствовало индукции апоптоза, в то время как гиперэкспрессия мутантной RAFTK подавляла апоптоз, вызванный GC. Таким

образом, было показано, что RAFTK играет значительную роль в GC-индуцированном апоптозе.

Еще одним регулятором пролиферативной активности клеток является концентрация внутриклеточных ионов  $Ca^{2+}$ . В нормальных В-лимфоцитах повышение уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$  служит сигналом дифференцировки и клеточной пролиферации. Было показано, что GC регулируют содержание  $Ca^{2+}$  в лимфобластах человека [55]. GC вызывают повышение экспрессии генов пуриnergического рецептора (P2X<sub>1</sub>) и инозитолтрифосфатного рецептора (IP3R), которые отвечают за корректное функционирование кальциевых каналов в клетке, что приводит к снижению внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  и затем к снижению пролиферативной активности клетки.

Таким образом, способность GC индуцировать апоптоз остается главным преимуществом данного класса соединений для лечения злокачественных новообразований кроветворной системы. Также остается актуальным вопрос SEGRA в аспекте их применения в терапии и сравнения эффективности данных соединений с классическими GC.

### **1.3. Современные подходы к совершенствованию терапии глюкокортикоидами**

#### ***1.3.1. Оптимизация систем доставки глюкокортикоидов***

Современная противоопухолевая фармакология на данный момент насчитывает сотни препаратов. Однако проблема селективной гибели опухолевых клеток в отсутствие токсического действия на нормальные клетки организма по-прежнему остается актуальной. Как химиотерапия, так и радиотерапия, и хирургия нарушают корректную работу нормальных тканей. Помимо токсических побочных эффектов и низкой специфичности к недостаткам химиопрепаратов относятся также проблемы направленной доставки даже таргетных препаратов к опухолевым клеткам, и биодegradация препаратов в процессе доставки [56]. Одним из наиболее перспективных и интенсивно изучаемых способов доставки лекарственных препаратов в настоящее время является использование

наночастиц, основными преимуществами которых является возможность повышения таргетной доставки препарата и его контролируемого высвобождения в органе мишени за счет варьирования физико-химических свойств, показателей растворимости и выведения из организма, направленное высвобождение [57-61]. Интенсивные исследования проводят в области липосомных, полимерных, дендримерных наночастиц, а также наночастиц золота и др. [61-64]. Также перспективным подходом для оптимизации доставки лекарственных препаратов является использование аптамеров, олигонуклеотидов, которые связываются с молекулами-мишенями с высокой аффинностью и специфичностью [65]. Получение аптамеров, комбинированных с GC, обладающих специфичностью к определенному типу тканей или клеток либо к белкам, кодируемым GR-регулируемыми генами, в мировой литературе не описаны. В то же время модификация систем доставки GC с помощью липосом, а также ряд других подходов к оптимизации доставки, активно применяются в клинической практике или исследуются в настоящее время, и подробно описана ниже.

Глюкокортикоиды (GC) являются одними из самых долго используемых синтетических препаратов в современной медицине. На протяжении всего времени их использования проводится работа по получению их химически модифицированных аналогов с различными GC биофармацевтическими свойствами. Также исследовали способы введения GC для подбора оптимального в случае конкретных заболеваний. Основной проблемой GC является развитие серьезных побочных эффектов, затрагивающих большую часть тканей, органов и систем организма, особенно при введении в высоких дозах и / или после длительного использования GC. Кроме того, длительное применение GC ограничено развитием резистентности к GC у большинства пациентов. Таким образом, оптимизация терапевтических режимов введения GC и систем их доставки является в настоящий момент актуальной задачей медицины, фармакологии и молекулярной биологии. Первые подходы к разработке более селективных систем доставки GC в орган-мишень включали в себя создание нитростероидов, конъюгированные с оксидом азота, которые *in vivo* быстро

распадаются с высвобождением обоих активных компонентов. Оксид азота (II) проявляет противовоспалительные эффекты, включающих в себя уменьшение адгезии лейкоцитов, снижение выработки провоспалительных цитокинов [66]. Еще одним из ранних способов повышения селективного терапевтического действия ГС и снижения побочных эффектов было использование комбинации ГС и дипиридамола, противотромбозного препарата, способного также подавлять высвобождение провоспалительных цитокинов, который демонстрирует противовоспалительную активность на моделях острого и хронического воспаления. В комбинации с дипиридамолом использовали суб-терапевтическую дозу преднизолона, и было показано, что комбинация преднизолона и дипиридамола, проявила более выраженное терапевтическое действие по сравнению с каждым из компонентов индивидуально [67]. Недавно FDA было одобрено использование хронотерапевтических ГС, которые дают возможность ограниченного высвобождения лекарственного средства. Однако, несмотря на значительные успехи в оптимизации ГС-терапии, побочные эффекты по-прежнему являются серьезной проблемой.

Для преодоления побочных эффектов и резистентности, которые зачастую связаны с распределением ГС по всем тканям организма и их коротким периодом полураспада в биологических жидкостях, были разработаны новые транспортные средства доставки на основе липосом. Исследования проводили с использованием ПЭГ-илированных липосом, полимерных мицелл, конъюгатов полимерных лекарств, неорганических каркасов и гибридных наночастиц. У каждой из упомянутых наноструктур есть свои недостатки, но тем не менее по эффективности препараты подобного рода зачастую превосходят стандартные ГС при тестировании на культурах клеток или на моделях нейровоспалительных заболеваний, рака, ревматоидного артрита и ряда других расстройств *in vivo*. ГС представляют собой гидрофобные молекулы с малой молекулярной массой, что является неблагоприятным фактором для фармакологического действия препарата. Растворимость оказывает значительное влияние на фармакокинетику, поэтому введение ГС в свободной форме характеризуется коротким периодом

полураспада в крови и быстрому выведению через систему почечных канальцев. Другим недостатком GC является их равномерное и неспецифическое распределение по органам и тканям в организме человека, что приводит к развитию побочных эффектов и ограниченной концентрации препарата в тканемишени. Таким образом, основной задачей дальнейших исследований являлось увеличение периода полувыведения GC и повышения специфичности их действия.

Для решения этих проблем были использованы липосомы различных типов. Их использовали для направленной доставки GC как в доклинических исследованиях, так и в клинических испытаниях. Другим типом наночастиц, используемых для доставки GC, являются полимерные мицеллы, которые являются сферическими коллоидными наночастицами с диаметром 10-100 нм [68].

Фармакологически активные соединения могут быть ковалентно связаны с макромолекулярными носителями с использованием линкеров с получением конъюгатов, которые стабильны в кровотоке, но лабильны в очагах воспаления, опухолевых клетках и тканях или некоторых внутриклеточных компартментах. Используя эту стратегию, можно получить конструкции длительного циркулирования, которые подходят как для пассивного, так и для активного транспорта лекарств. Наиболее популярным примером этого класса препаратов являются сополимеры N-(2-гидроксипропил) метакриламида (HPMA), использованные для конъюгации различных низкомолекулярных лекарств, например, дексаметазона (Dex), доксорубицина или гемцитабина. Конъюгат полимера с дексаметазоном, несущий также в своем составе инфракрасный или флуоресцентный краситель, можно использовать для визуализации его доставки и распределения *in vivo* [69]. При исследовании способности подобного конъюгата к развитию побочных эффектов было отмечено снижение атрофических явлений в костной ткани при сохранении противовоспалительной активности GC. Таким образом, специфичность GC может быть увеличена с использованием такого подхода. Недостатком подобной полимерной конструкции является то, что

основная полимерная цепь не подвергается биодegradации, что стимулирует дальнейшие исследования в данной области.

Еще одним методом доставки GC является доставка с помощью неорганических систем. Так, для доставки GC был использован крупнопористый полидиметилсилоксановый носитель (PDMS); в дальнейшем такой препарат был испытан на модели стероидного диабета у мышей. Использование небольшие дисков из PDMS в качестве 3D платформы локальной доставки Dex, что привело к увеличению противоопухолевого эффекта *in vivo* на модели ксенографтов у бестимусных мышей [70]. Также в качестве носителя могут быть использованы не только диски, но и наночастицы неорганического происхождения. Примеров такого носителя является минерал лапонит, образующий прозрачные коллоидные дисперсии в воде. Гидрофобные GC могут быть связаны с поверхностью посредством водородных связей, а поскольку лапонит прозрачен, это делает его подходящим для создания глазных капель и внутриглазных инъекций. Другим примером являются наночастицы из гидроксиапатита. GC могут быть прикреплены к поверхности данных частиц, образуя наночастицы небольшого размера. В целом, неорганические GC-содержащие наночастицы являются перспективным материалом для дальнейших исследований. GC

Еще одним классом наночастиц, используемых для улучшения доставки GC, являются неорганно–органические наночастицы, в которых функциональные органические молекулы пассивно добавлены в неорганический носитель путем адсорбции. Эффективность таких наночастиц для доставки GC была подтверждена как *in vitro*, так и *in vivo*. Хотя потенциально токсическое действие неорганического носителя в составе наночастиц не исключено, их использование в качестве средства доставки лекарств является весьма перспективным, поскольку в них сочетается возможность высокого уровня лекарственной загрузки и высокой специфичности.

Непосредственно в терапии онкологических заболеваний GC используются для следующих целей: снятия побочных эффектов химиотерапии, GC усиление противоопухолевых эффектов цитостатиков и противоопухолевых препаратов

других классов, а также реализации собственного противоопухолевого потенциала при терапии ряда злокачественных новообразований. Наиболее распространенным применением GC является лечение онкологических заболеваний кроветворной системы, сопровождающееся индукцией апоптоза в трансформированных клетках. Терапия данных заболеваний требует длительного введения GC, что повышает риск развития осложнений [71]. В связи с этим, более направленная доставка GC к злокачественным клеткам является желательной для повышения локальной концентрации лекарственного средства и одновременного уменьшения его содержания в других органах. В этом отношении высокая эффективность и более устойчивая активность на моделях меланомы, рака толстой кишки, В-клеточного лейкоза и метастатического рака предстательной железы *in vitro* и *in vivo* была показана для длительно циркулирующих липосом с инкапсулированными GC. На тех же моделях проводили сравнительный анализ эффективности доставки долгоживущих липосом с полимерными мицеллами, и было показано, что мицеллы менее эффективны, чем липосомы, при схожей скорости высвобождения препаратов. Для создания системы с активным нацеливанием липосомы с инкапсулированным дексаметазоном, конъюгировали с CD74-специфическим антителом и тестировали на первичных культурах, полученных от пациентов с хроническим лимфолейкозом *in vitro* и модели ксенографтов у бестимусных мышей *in vivo*. Было показано повышение терапевтической эффективности по сравнению со свободным лекарственным средством и липосомами, не конъюгированными с антителом [72]. Более эффективной, чем липосомы с отдельными препаратами, оказалась липосомальная система для совместной доставки дексаметазона и доксорубицина в экспериментах на модели саркомы у мышей *in vivo*. Аналогичные результаты были продемонстрированы для системы совместной доставки митоксантрона и преднизолона с использованием липосом, конъюгированных с низкомолекулярным гепарин-дезоксихолатом натрия для улучшения связывания. В испытаниях эмульсии наночастиц, состоящей из нанокристаллов оксида железа для возможности детекции с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ),



флуоресцентного красителя и преднизолон на моделирака толстой кишки у мышей была продемонстрирована высокая эффективность.

Было высказано предположение, что локальная доставка ГС будет более эффективна в отношении опухоль-ассоциированных макрофагов (ТАМ), которые стимулируют ангиогенез и рост опухоли. В дальнейшем было показано, что ПЭГиловые липосомы, содержащие преднизолон, имели более сильное антипролиферативное и противовоспалительное действие, чем свободный стероид, при этом значительно уменьшалась экспрессия проангиогенных белков. В отличие от липосом, эмульсия наночастиц, содержащая преднизолон, усиливала инфильтрацию макрофагов, что объясняли вовлечением других механизмов, в частности, ингибированием инфильтрации моноцитов, в реализацию противоопухолевого эффекта данного препарата [73].

Таким образом, современные системы доставки ГС являются перспективными для дальнейших исследований: в большинстве случаев клиническая эффективность ГС в составе наноконструкции для доставки превосходила свободный препарат. Однако клеточные и молекулярные механизмы действия такого рода препаратов остаются недостаточно изученными. Необходимо также принимать во внимание, что наноматериалы могут обладать токсическими свойствами в зависимости от их концентрации, растворимости, формы и размера.

### ***1.3.2. Современные тенденции в разработке новых препаратов – аналогов глюкокортикоидов***

Несмотря на обилие уже зарегистрированных лекарственных препаратов, использующихся в клинической практике, улучшение их терапевтического эффекта не всегда можно достичь, изменяя дозировки, режим введения и способ доставки. В связи с этим по-прежнему остается актуальным рациональное конструирование лекарственных препаратов с заранее заданной фармакологической активностью. Часто дизайн структуры препарата и стратегию синтеза выбирают интуитивно, на основании исходной молекулы и данных о

взаимодействии отдельных ее участков с белком-мишенью. В настоящее время для разработки новых лекарственных средств активно используют комбинаторную химию, на основе которой создают химические библиотеки. Комбинаторная химия представляет собой подход, при котором возможен одновременный синтез большого количества структурно различающихся соединений в однокровных реакционных условиях, и тестирование их биологической и фармакологической активности. [74-76]. Более того, многие химические библиотеки моделируют виртуально, *in silico*, а соединения для синтеза отбирают после компьютерного скрининга интенсивности взаимодействия соединения с молекулой-мишенью [77]. Связывание лиганда с рецептором является основой практически всех процессов в молекулярной и клеточной биологии, включая распознавание рецепторами и их взаимодействия с такими молекулами как гормоны и различные ксенобиотики. Аффинность является наиболее важным количественным показателем для описания межмолекулярных взаимодействий и часто используется в качестве показателя эффективности лекарственного средства *in vivo*.

Разработка модифицированных GC и поиск препаратов, обладающих GC-подобной активностью, но со сниженными побочными эффектами, является актуальной задачей современной молекулярной онкологии и биологии в свете множественных метаболических и атрофических осложнений, которые влечет за собой длительное применение GC. Более того, эффекты GC могут существенно различаться в зависимости от области применения: так, GC в большинстве случаев обладают противоопухолевым эффектом при злокачественных новообразованиях кроветворной системы, однако в солидных опухолях GC могут способствовать прогрессии опухоли и метастазированию. Теория о распределении терапевтических и побочных эффектов GR между механизмами транс-активации и транс-репрессии привела к разработке нового класса препаратов – селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), способных запускать только механизм транс-репрессии [78]. За основу синтеза SEGRA в первое время использовали стероиды, и были синтезированы три соединения стероидной

структуры, RU24858, RU40066 и RU24782, связывавшие GR и избирательно запускавшие транс-репрессию *in vitro*, однако не проявлявшие активности *in vivo* [79]. Ниже будут рассмотрены аналоги GC, проявляющие свойства SEGRA в той или иной степени.

**1. Тетрагидронафталин** представляет собой метаболически стабильный сильнодействующий SEGRA, смесь двух энантиомеров с одинаковыми биологическими свойствами, в том числе и противовоспалительной активностью. В экспериментах *in vivo* было показано, что при пероральном введении данное соединение значительно ингибирует воспаление, индуцированное кротоновым маслом либо тримеллитовым ангидридом (ТМА) у крыс линии Wistar21, и крыс линии Brown Norway. При чем максимальный противовоспалительный эффект превосходил эффект преднизолона. Однако биологические свойства данного соединения требует дальнейшего изучения [80].

**2. JTP-117968** или (4b'S,7'R,8a'S) -4b'-бензил-7'-гидрокси-N-(2-метилпиридин-3-ил) -7'-(трифторметил)4b',6',7',8',a',10'-гексагидро-5'H-спиро[циклопропан-1,9'-фенантрен]-2'-карбоксамид, является нестероидным SEGRA. В отличие от классических глюкокортикоидов, JTP-117968 не обладает ни агонистической, ни антагонистической активностью к рецепторам минералокортикоидов, что делает его более перспективным, так как ожидаемо уменьшение таких побочных эффектов как гипертония и электролитный дисбаланс и др. при его применении. JTP-117968 способен запускать механизм транс-репрессии, но его способность инициировать транс-активацию очень низка. Максимальная эффективность данного соединения по степени запуска транс-репрессии была сопоставима с его структурным аналогом PF-802, или (4bS, 7R, 8aR) -4b-бензил-7-гидрокси-N-(2-метилпиридин-3-ил)7-(трифторметил)-4b,5,6,7,8,8a,9,10-октагидрофенантрен-2-карбоксамид, активной формой фосдагрокората, первого клинически одобренного SEGRA для перорального применения. В то же время было показано, что индукция транс-активации была значительно менее выражена у JTP-117968, чем у PF-802 в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [81].

3. **RU24858** связывается с GR с аффинностью, схожей с аффинностью дексаметазона. Было экспериментально доказано, что RU24858 способен предотвратить воспалительные процессы, вызванные местнораздражающим агентом 4-форбол-12-мирилат-13-ацетатом (ТРА), в частности, гиперплазию эпидермиса и усиление пролиферации. Кроме того, RU24858 также подавлял экспрессию ТРА-индуцированных провоспалительных генов c-Jun, COX-2 и iNOS. Аналогично классическим GCs, RU24858 эффективно ингибировал транскрипция TNF-индуцированных и NF-κB-зависимых провоспалительных генов (например, IL-6, IL-8, E-селектин). Однако, необходимо отметить, что антипролиферативные и антигиперпластические эффекты RU24858 у мышей были выражены слабее, чем у классических GC [82].

4. **Авицин D** является тритерпеноидным сапонином, полученным из пустынных кактусов *Acacia victoriae*, обнаруженного в Австралии [83], с доказанными GR-зависимым противовоспалительным эффектом. Для данного соединения также была продемонстрирована индукция апоптоза при обработке опухолевых клеток человека различных линий, в том числе, клеток острого лимфобластного T-клеточного лейкоза Jurkat, положительных по рецептору HER2 клеток рака молочной железы MDA-MB-453, клеток рака предстательной железы PC3 и клеток кожной T-клеточной лимфомы. Однако в данных исследованиях было показано, что, в отличие от противовоспалительных эффектов, цитотоксичность авицина D не является GR-зависимой. Основным механизмом индукции апоптоза при воздействии на клетки авицина D является изменение функционирования митохондрий [82].

5. **21ОН-6,19ОР** является селективным агонистом GR, который не содержит объемного заместителя при атоме углерода в 11 положении, который обычно обнаруживают в активных антагонистах GR. Для данного соединения было показано, что оно способно запускать сигнальные пути AP-1 и NF-κB в фибробластоподобных клетках почки африканской зеленой мартышки COS-1, в макрофаговых, трансформированных вирусом лейкоза Абелсона, мышечных клетках RAW 264.7 и в фибробластах почек детеныша хомяка ВНК, однако для

клеток аденокарциномы легкого A549 было продемонстрировано обратный эффект: GC наблюдали подавление базальной и TNF $\alpha$ -индуцированной экспрессии NF-kB-зависимых провоспалительных генов COX2 и IL-8. Кроме того, было показано, что **21ОН-6,19ОР** не способен индуцировать транскрипцию GRE-регулируемых генов, а при инкубации в комбинации с дексаметазоном он действует как антагонист GR. Описанные данные свидетельствуют о том, что 21ОН-6,19ОР является селективным агонистом GR, специфичным к типу клеток. Более того, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* было показано, что 21ОН-6,19ОР не препятствует гибели клеток, вызванной доксорубицином в клетках рака молочной железы, в отличие от классического GC дексаметазона. Более того, 21ОН-6,19ОР не подавляет способность паклитаксела активировать каспазу-3 и не стимулирует экспрессию антиапоптотического гена BCL-XL [82].

**6. ZK-216348 и ZK-245186 (BOL-303242-X)** были охарактеризованы Bayer Schering Pharma AG (Berlin-Wedding, Германия) как соединения, способные селективно запускать только механизм транс-репрессии *in vivo*. ZK-216348 снижал воспалительные процессы в коже мышей, индуцированных кротовым маслом, а также демонстрировал подавление развития побочных эффектов, в частности, снижение гипергликемии и атрофии кожного покрова, по сравнению с преднизолоном. В настоящее время для ZK-245186 была продемонстрирована противовоспалительная активность на моделях дерматита у животных одновременно со сниженными побочными эффектами; данный препарат находится во II фазе клинических испытаний по лечению атопического дерматита [84].

**7. AL-438** представляет собой высокоаффинное к GR соединение класса SEGRA [85, 86]. Данное соединение в экспериментах *in vitro* продемонстрировало снижение продукции фактора некроза опухоли (TNF $\alpha$ ), IL-1 $\alpha$ , IL-6 и E-селектина, а также незначительную активность по индукции экспрессии GR-зависимого гена. По сравнению с дексаметазоном или преднизолоном, для AL-438 не было показано снижения пролиферации или синтеза протеогликана в мышечной хондрогенной клеточной линии ATDC5, а также уменьшение экспрессии мРНК

остеокальцина, маркера GC-опосредованного остеопороза, что указывает на снижение побочных эффектов, связанных с атрофией костной ткани. На моделях острого или хронического воспаления у крыс *in vivo* была показана терапевтическая эффективность AL-438, аналогичная преднизолону. Однако также было отмечено негативное воздействие на метаболизм глюкозы и костную ткань.

**8. ORG 214007-0** лиганд GR, проявляющий аффинность и эффективность сходную преднизолону. Соединение действует как частичный агонист GR, но с меньшей эффективностью. В мышинной модели острого и хронического воспаления **Org 214007-0** проявлял терапевтический эффект подобно преднизолону, уменьшая экспрессию провоспалительных генов. При этом Org 214007-0 показал меньшее влияние на метаболизм глюкозы [84]. Было показано, что и **Org 214007-0** индуцирует экспрессию GILZ, хотя и на гораздо более низком уровне, чем классические GC [86].

**9. LGD-5552** является высокоаффинным лигандом GR, однако в то же время проявляет антагонистическую активность по отношению к рецептору минералокортикоидов. На модели коллаген-индуцированного артрита (CIA) у мышей была показана высокая, схожая с преднизолоном, противовоспалительная активность **LGD-5552** и сниженное развитие таких побочных эффектов, как процентное увеличение содержания жира в организме и затруднения в формировании костной ткани. Однако его антагонизм к минералокортикоидному рецептору может вызвать нарушения в регуляции натрий-калиевого баланса [84].

**10. Compound A (CpdA)** представляет собой SEGRA растительного происхождения, для которого на большом количестве моделей как воспалительных и аутоиммунных заболеваний, так и на моделях онкологических заболеваний был показан селективный запуск транс-репрессии GR без индукции транс-активации. CpdA индуцирует апоптоз в клетках множественной миеломы, лейкозах, лимфомах, раке предстательной железы, о чем судили по увеличению активности каспазы 3 и расщеплению PARP. В ряде случаев цитостатический и апоптотический эффект CpdA был более выражен по сравнению с классическими

GC. В отличие от *авицина D*, его проапоптотические и цитотоксические эффекты являются GR-зависимыми. CpdA ингибировал экспрессию про-пролиферативных и антиапоптотических генов, в то же время стимулируя синтез проапоптотического белка Vim и опухолевого супрессора p53 в клетках лимфом и лейкозов *in vitro*. Более того, было продемонстрировано противоопухолевое действие данного соединения *in vivo* [87-89]. CpdA является также антагонистом андрогенового рецептора (AR). Было показано, что CpdA индуцирует ядерную транслокацию AR, но ингибирует его связывание с ДНК и прочие проявления транскрипционной активности. При раке предстательной железы активация AR является онкогенным фактором, тогда как активация GR индуцирует противоопухолевое действие CpdA [82, 89]. Однако CpdA обладает двумя недостатками, которые являются препятствиями к переходу к доклиническим исследованиям и регистрации препарата в фармакологическом комитете для дальнейших испытаний. Одним из них является то, что молекула CpdA является хиральной, содержащей в своем составе ассиметрический атом углерода с 4 различными заместителями. Хиральная молекула существует в двух изомерных формах, связанных как предмет и его зеркальное отражение и несовместимых в пространстве. При таком виде структурной изомерии физико-химические свойства энантиомеров сходны, однако взаимодействие с биологическими молекулами и биологические свойства могут различаться. Требования безопасности запрещают реализацию хиральных препаратов в форме рацемической смеси, разрешено использование только оптически чистых изомеров CpdA. Данные требования были введены в правила реализации лекарственных препаратов после выявления побочных эффектов препарата 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. Использование данного препарата беременными женщинами привело к рождению в Европе и США детей с врожденными физическими дефектами [90, 91]. Таким образом, синтез чистых энантиомеров CpdA является актуальной задачей

современной молекулярной онкологии. Вторым недостатком CpдA является низкая стабильность данной молекулы: в водных растворах она распадается до фенилазиридина, обладающего мутагенными свойствами [92]. В связи с этим, синтез более стабильных производных CpдA также является актуальным.

Приведенные в обзоре литературы данные свидетельствуют о множественности эффектов GC и их широкого использования в терапии злокачественных новообразований кроветворной системы, а также ряда других заболеваний. Развитие побочных эффектов при хроническом применении глюкокортикоидов является ключевой проблемой, затрудняющей длительную терапию GC и снижающей ее эффективность. Перспективным решением данной проблемы в настоящее время представляется создание новых селективных агонистов GR. Определенные успехи в исследовании новых SEGRA описаны в литературе, наработаны методы и подходы к разработке новых химических соединений, оптимизации их доставки и определению эффективности терапевтического действия. В представленной работе предложены пути повышения эффективности терапии злокачественных новообразований кроветворной системы путем селективной активации транс-репрессорных механизмов действия GR с использованием энантиомеров CpдA и его более стабильных химических производных.



## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Список реактивов, использованных в работе

1. Агар-агар бактериологический, «Диаэм», Россия
2. Агароза, «Fisher Biotech», Испания
3. Азид натрия, «Sigma», США
4. 2-аминофлуорен (2-АФ), «Sigma», США
5. Аммония сульфат, «Химмед», Россия
6. Ампициллин, «ПанЭко», Россия
7. Бенз(а)пирен, «Fluka», Англия
8. Биотин, «Sigma», США
9. Борная кислота, «Sigma-Aldrich», США
10. Бромистый этидий, «Sigma-Aldrich», США
11. Гентамицин, «ПанЭко», Россия
12. Гистидин, «Sigma», США
13. Глицерин, «Serva», Германия
14. Глюкоза, «Биостим», Россия
15. Глюкозо-6-фосфат, «Reanal», Венгрия
16. (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), «ПанЭко», Россия
17. Дексаметазон, «Sigma-Aldrich», США
18. Диметилсульфоксид (ДМСО), «ПанЭко», Россия
19. 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), «ПанЭко», Россия
20. Дитиотрейтол, «ThermoFischer Scientific», США
21. Диэтиловый эфир, «Химмед», Россия
22. Дрожжевой экстракт, «ПанЭко», Россия
23. Изоамиловый спирт, «Химмед», Россия
24. Изопропиловый спирт, «Химмед», Россия
25. Йодистый пропиций, «Sigma-Aldrich», США

26. Калия гидроортофосфат, «Sigma», США
27. Калия дигидроортофосфат, «Химмед», Россия
28. Калий хлорид, «Химмед», Россия
29. Кальций хлорид, «Химмед», Россия
30. Кислота серная, «Химмед», Россия
31. Кислота соляная, «Химмед», Россия
32. Магний хлорид, «Химмед», Россия
33. Магний сульфат, «Химмед», Россия
34. Маркер молекулярного веса белков Page Ruler Plus, 10-250 kDa «ThermoFischer Scientific», США США)
35. Метилен хлористый, «Химмед», Россия
36. Набор реактивов для выделения РНК RNAeasy kit, «Qiagen», США
37. Набор реактивов для выделения плазмидной ДНК QIAprep Spin Miniprep Kit, «Qiagen», США
38. Набор реактивов для определения активности люциферазы Luciferase Assay System, «Promega», США
39. Набор для определения аффинности препаратов к глюкокортикоидному рецептору PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor (GR) Competitor Assay, Green, «ThermoFischer Scientific», США
40. Набор реактивов для ПЦР, «Синтол», Россия
41. Набор реактивов для проведения трансфекции TransIT®-293, «Mirus-Bio», США, США
42. Натрий ацетат, «Химмед», Россия
43. Натрий боргидрид, «Химмед», Россия
44. Натрий гидроксид, «Химмед», Россия
45. Натрий дезоксихолат, «Химмед», Россия
46. Натрий додецилсульфат (SDS), «Химмед», Россия
47. Натрий хлорид, «Химмед», Россия
48. Натрий цитрат, «Химмед», Россия
49. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), «Sigma», США

50. Обратная транскриптаза MMLV, «Синтол», Россия
51. Олигонуклеотиды, синтезированные НПФ «Синтол», Россия
52. Пируват натрия, «ПанЭко», Россия
53. Пурамицин, «Sigma-Aldrich», США
54. Реагент для определения концентрации белков Bio-Rad Protein Assay, «Bio-Rad», США
55. РНКаза А, «ThermoFischer Scientific», США
56. Триптон, «Диаэм», Россия
57. Тритон-X100, «Sigma-Aldrich», США
58. Трис-гидроксиметиламинометан, «Sigma-Aldrich», США
59. Фосфорно-солевой буфер (PBS), «Flow Laboratories», Англия
60. Хлороформ, «Химмед», Россия
61. Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (EDTA), «Sigma-Aldrich», США
62. Этиловый спирт

## **2.2. Приборы, использованные в работе**

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. Клеточные линии и обработка клеток**

В работе использовали клетки острого лимфобластного лейкоза линии СЕМ, любезно предоставленные д.б.н. Г.А. Посыпановой, МНИИМЭ, Москва, Россия, и клетки мантийноклеточной лимфомы Granta, любезно предоставленные проф. Бернштейном, университет Рочестера, Рочестер, США. Клетки культивировали в стандартной среде RPMI-1640, содержащей 5%-ную

эмбриональную сыворотку телят и гентамицин (50 ед/мл) при 37°C и в 5%-ном CO<sub>2</sub>. Клетки обрабатывали CpдA, R-CpдA, S-CpдA, CpдA-01-08 и Dex.

#### **2.4. Определение антипролиферативного эффекта**

Антипролиферативный эффект определяли путем прямого подсчета жизнеспособных клеток в камере Горяева. Клетки культивировали в 24-луночном планшете в течение 24-48 суток в присутствии Dex, CpдA или растворителя (0,1%-ного этанола или ДМСО); подсчет клеток проводили каждые 24 ч.

#### **2.5. Определение уровня апоптоза**

Уровень апоптоза определяли методом проточной цитофлуориметрии после окраски пропидием йодидом, для чего клетки центрифугировали, осадок суспендировали в 1 мл раствора, содержащего 5 мкг/мл PI, 0,1% цитрата натрия и 0,3% NP-40. Полученные образцы анализировали в цитометре. Число апоптотических клеток (в процентах) определяли как пре-G1-пик на ДНК-гистограмме.

#### **2.6. Бактериальный тест на мутагенную активность Эймса**

Изучение потенциальной мутагенной активности было проведено в соответствии с международным стандартом ISO Standard 10993-3:2003 и рекомендациями авторов теста [93, 94].

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 [95]. 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

белка фракции S9, 4 мМ НАДФ, 5 мМ глюкозо-6-фосфата, 33 мМ KCl, 8 мМ MgCl<sub>2</sub> 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 объём 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-диазапирен (ДДТДП) [96, 97]. 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.

## 2.7. Конкурентное связывание

Анализ связывания химических производных CpdA проводили с использованием набора для PolarScreen™ Glucocorticoid Receptor Competitor Assay (Invitrogen, 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.

### **2.8. Выделение РНК и обратная транскрипция**

Выделение тотальной клеточной РНК проводили с помощью набора для выделения РНК RNAeasy kit. 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 инаktivацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 мин, добавляли 80 мкл дистиллированной воды и использовали аликвоты для проведения ПЦР-амплификации со специфическими праймерами.

### **2.9. Количественная ПЦР**

Количественный ПЦР-анализ в реальном времени проводили по следующей методике: рабочие разведения кДНК, полученной 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, и по 500 нМ специфических 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  $\Delta C_t$  контроля из  $\Delta C_t$  экспериментальных образцов. Для каждого гена интереса ПЦР-анализ был проведен в трех повторах, а также были получены кривые плавления для каждой пары праймеров для подтверждения специфичности. Анализ кривых плавления проводили в течение 81 циклов, с увеличением температуры с 55°C to 95°C с шагом 0.5°C. В качестве контроля использовали ген рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Праймеры для амплификации кДНК были сконструированы с помощью базы данных Primer-Bank и пакета программ Oligo 6. Последовательности праймеров и размер продукта указаны в таблице 1.

**Таблица 1** - Последовательности используемых праймеров

Ген	Последовательность		Размер продукта
	Прямой праймер 5'-3'	Обратный праймер 5'-3'	
<i>Rpl27</i>	ACCGCTACCCCGCAAAGTG	CCCGTCGGGCCTTGCGTTTA	125
<i>FKBP5</i> <i>1</i>	GAATGGTGAGGAAACGCCGAT	TGCCAAGACTAAAGACAAA TGTT	250
<i>GILZ</i>	AACAACGAAATGTATCAGACCC	TGTCCAGCTTAACGGAAACC A	144
<i>IL1</i>	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCCGAGATTTCGTAGCTGGA	186
<i>IL6</i>	GGGAGCGATAAACACAAACTCTGC	GAGAAGGCAACTGGACCGA AG	113
<i>CCND</i> <i>1</i>	AGACSTTTGTGGCCSTCTGTG	CAGTCCGGGTACACTTGAT	135
<i>CCND</i> <i>2</i>	CTCAGACSTTCATTGCTCTGTGT	CTCAGTCAGGGCATCACAAG T	161

## 2.10. Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS

Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS проводили в соответствии с методом, описанном Лэммли [98]. 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.

## 2.11. 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% додецилсульфат натрия (SDS), 0,5% дезоксихолат натрия, 1% Тритон-X 100, 10%

глицерин); цитоплазматическую и ядерную фракции белков выделяли, используя буфер для выделения цитоплазматической (25 мМ Трис-НСl, 5 мМ КСl, 1 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 1% NP-40) и ядерной (20 мМ Трис-НСl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 400 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 0,05% NP-40, 1мМ EDTA, 10% глицерин) фракций соответственно. Концентрацию белка определяли с помощью реагента Bio-Rad Protein Assay («Bio-Rad», США). Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («LI-COR», США). Для иммуноблоттинга использовали антитела к GR- $\alpha$  и к p-GR (кроличьи антитела в разведении 1:500 производства «Santa Cruz Biotechnology», 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 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 150 мМ NaCl), затем инкубировали с первичными антителами в течение 6 ч при комнатной температуре. В качестве контроля использовали антитела к GAPDH («Santa Cruz Biotechnology», США). Мембраны отмывали и инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой, образовавшиеся комплексы проявляли хемилюминесцентным реагентом. Визуализацию сигнала проводили с помощью прибора для гель-документирования ImageQuant LAS4000. Количественный анализ изображений проводили с помощью открыто распространяемого пакета программ ImageJ.

## **2.12. Трансформация бактериальных клеток**

### **Приготовление компетентных клеток E.coli XL-10 Gold**

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



## **Трансформация**

К суспензии компетентных клеток добавляли 100 нг лигазной смеси. В качестве отрицательного контроля трансформации использовали компетентные клетки *E.coli* без добавления плазмиды. В качестве положительного контроля использовали компетентные клетки с добавлением плазмиды с известной эффективностью трансформации (pUC19). Смесь оставляли во льду на 15 мин., затем инкубировали при 42°C в течение 3 мин., а потом при 4 °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.

### **2.13. 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 бесцветном спектрофотометре NanoVue (GE Healthcare, США).

### **2.14. Приготовление сред и растворов для работы с бактериями**

#### **Жидкая среда LB, 30 мл**

Для приготовления жидкой среды LB в 30 мл H<sub>2</sub>O 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 ампицилина, 100 мг/мл**

0,5 г лиофилизированного порошка ампицилина растворяли в 2,5 мл бидистил. воды и 2,5 мл 96% этанола.

#### **Твердая среда L-агар, 100 мл**

Для приготовления жидкой среды LB в 100 мл дисциллированной воды 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.

## 2.15. Используемые генетические конструкции

Для получения трансформированных клеток с измененной экспрессией GR («System Bioscience», США) использовали лентивирусные вектора, представленные на рисунке 6А. Для получения трансформированных клеток, экспрессирующих ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора, содержащего сайты связывания NF-κB и GR, а также для получения трансформированных клеток с измененной экспрессией GR («System Bioscience», США) использовали лентивирусные вектора («System Bioscience», США), представленные на рисунке 6Б.

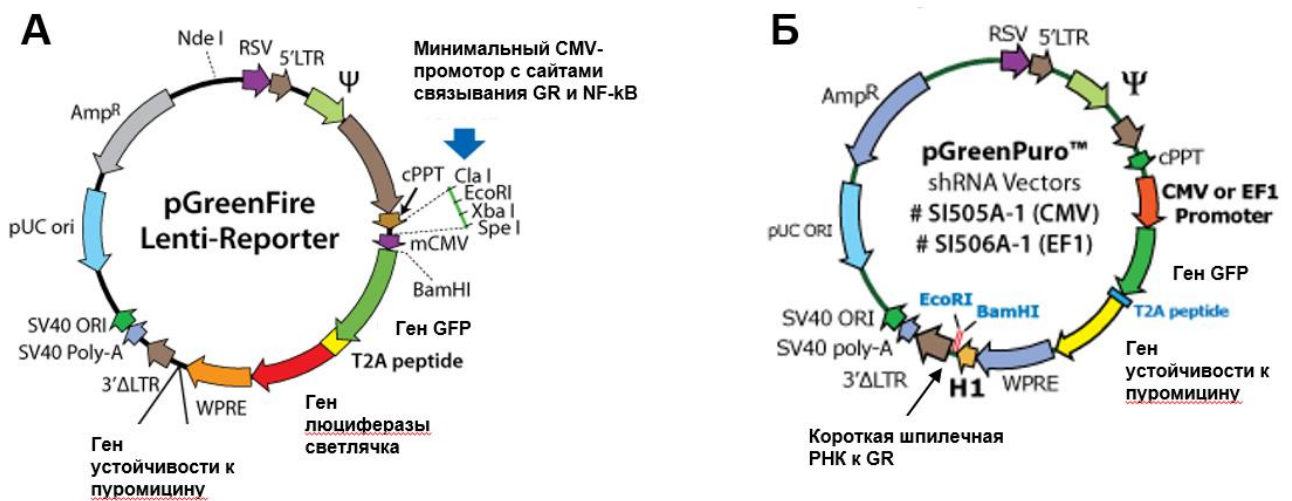


Рисунок 6 - Структура используемых генетических конструкций

## **2.16. Трансдукция клеток лентивирусными векторами**

Вирусные стоки высокого титра получали путем ко-трансфекции клеток линии 293Т лентивирусными векторами, описанными в разделе 2.15 («System Biosciences», США) совместно с упаковочной плазмидой psPAX2 (плазмида №12260) и плазмидами pCMV-VSV-G (плазмида №8454) и pMD2.G (плазмида №12259), кодирующими оболочечные гликопротеины. Трансфекцию проводили с помощью реагента TransIT®-293 по протоколу производителя. Супернатант, содержащий вирусные частицы, собирали через 24-48 ч после трансфекции, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и использовали для инфекции клеток CEM и Granta. В результате чего были получены стабильные линии клеток Granta-shGR и CEM-shGR, экспрессирующие короткую шпилечную РНК к гену GR, и контрольные линии CEM-pGIPZ и Granta-pGIPZ. Далее полученные трансформированные клетки культивировали на селективной среде, содержащей антибиотик пурамицин, в течение 14-21 суток. Об эффективности трансдукции лентивирусных конструкций судили по интенсивности пролиферации клеток в среде с пурамицином, по интенсивности флуоресценции GFP (клетки исследовали на флуоресцентном микроскопе Zeiss, с использованием фильтра для GFP-флуоресценции при 400х-кратном увеличении), а также по результатам Вестерн блоттинга и люциферазного анализа.

## **2.17. Определение активности люциферазы**

Активность люциферазы определяли, смешивая 10 мкл тотального клеточного лизата с 60 мкл буфера, содержащего субстрат для люциферазы, и измеряя люминесценцию на люцинометре «Turner Biosystems 20/20» (США).

## **2.18. Оценка противоопухолевой активности *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 внутрибрюшинное введение

растворов Dex, 1 мг/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 роста опухоли.

### **2.19. 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 достоверными при  $p < 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глюкокортикоиды (GC) широко применяются в терапии злокачественных новообразований кроветворной системы, однако их применение сопровождается развитием большого количества побочных эффектов. Известно, что механизм транс-активации глюкокортикоидного рецептора (GR) непосредственно связан с проявлением метаболических и атрофических осложнений при терапии GC. Таким образом, поиск новых селективных агонистов GR (SEGRA), избирательно запускающих только механизм транс-репрессии, является перспективным направлением повышения эффективности терапии. В нашей лаборатории ранее были исследованы свойства нестероидного лиганда GR, 2-(4-ацетофенил)-2-хлор-N-метилдиэтиламмоний хлорида или CpдA. На моделях лейкозов и лимфом *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано, что CpдA действительно проявляет свойства SEGRA, а также обладает выраженным противоопухолевым эффектом. Однако CpдA обладает двумя недостатками, которые являются препятствиями к переходу к доклиническим исследованиям и регистрации препарата в фармакологическом комитете для дальнейших испытаний. Одним из них является то, что молекула CpдA является хиральной. Требования безопасности запрещают реализацию хиральных препаратов в форме рацемической смеси, разрешено использование только оптически чистых изомеров CpдA. Таким образом, синтез чистых энантиомеров CpдA является актуальной задачей современной молекулярной онкологии. Вторым недостатком CpдA является низкая стабильность данной молекулы: в водных растворах она распадается до фенилазиридина, обладающего мутагенными свойствами. В связи с этим, синтез более стабильных производных CpдA также является актуальным.

Данное исследование направлено на получение и исследование биологических эффектов потенциальных SEGRA: энантиомеров CpдA и его химических производных. В сотрудничестве с нашими коллегами из Института органической химии им. Н.Д. Зелинского были синтезированы (R)- и (S)-энантиомеры CpдA, а также 8 его химических производных (рис. 6 и 7). Синтез

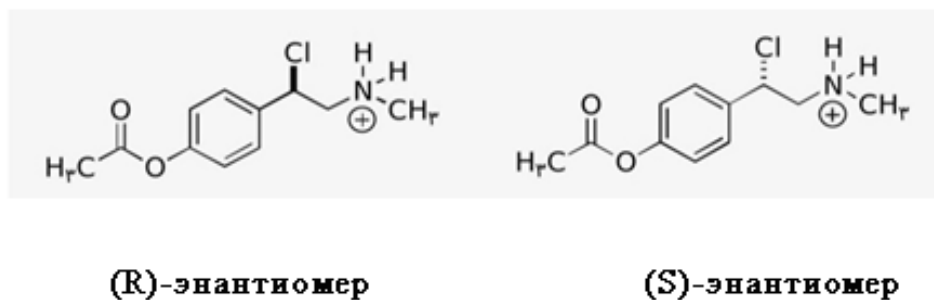
оптических изомеров был проведен с помощью стереоселективного катализатора. За основу синтеза химических производных CpдА брали алкалоид Синефрин со структурой и распределением электронной плотности, схожей с исходной молекулой, но являющимся более стабильным и инертным соединением, не способным образовывать 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 получения более стабильных соединений и исключения возможности образования азиридина, который обладает мутагенным эффектом [99]. Здесь необходимо отметить, что после синтеза химических производных CpдА на базе Института органической химии им. Н.Д. Зелинского с помощью хроматографического анализа были оценено содержание продуктов распада в водных растворах новосинтезированных соединений при инкубации в течении 4 суток при +4°C, и была показана стабильность полученных химических производных CpдА. Вторая причина выбора описанной стратегии синтеза обусловлена тем, что полученные соединения при гидролизе способны давать производные Синефрина, отличающиеся по гидрофильности и обладающие собственным антипролиферативным эффектом.

На первом этапе данного исследования на длительно пассируемых *in vitro* культурах злокачественных новообразований кроветворной системы человека: клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ и клетках мантийноклеточной лимфомы Granta, были определены противоопухолевые эффекты энантиомеров CpдА и его химических производных *in vitro*: антипролиферативные и проапоптотические эффекты данных соединений в сравнении с глюкокортикоидом дексаметазоном (Dex) и CpдА в виде рацемической смеси были оценены с помощью различных методов исследования роста и жизнеспособности клеток. На втором этапе настоящей работы были исследованы эффекты полученных соединений на функциональную активность GR: для энантиомеров оценивали интегральный эффект на запуск транс-репрессии и

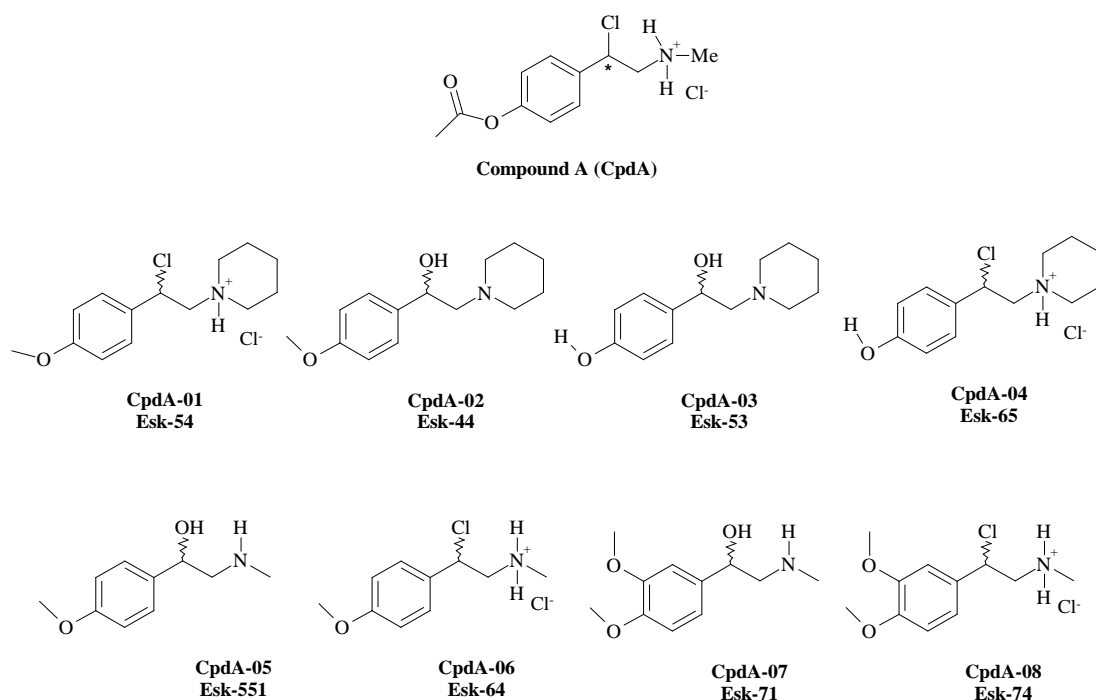
транс-активации с помощью люциферазного репортерного анализа, а также влияние на экспрессию специфических генов – маркеров транс-репрессии и транс-активации. В случае новосинтезированных производных CpдА данное исследование было дополнено анализом аффинности связывания полученных лигандов с GR с использованием теста на конкурентное связывание и флуоресцентно меченого глюкокортикоида с известной аффинностью, а также оценкой влияния исследуемых соединений на уровень фосфорилирования рецептора. Заключительный этап исследования представлял собой анализ полученных результатов *in vitro* и отбор наиболее активного соединения для тестирования его противоопухолевых эффектов *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей.

### 3.1. Противоопухолевый эффект новосинтезированных аналогов глюкокортикоидов *in vitro* и его зависимость от GR

Согласно терминологии, используемой в современной литературе, противоопухолевое действие препарата *in vitro* (то есть на клеточные культуры) включает в себя способность препарата подавлять пролиферацию и индуцировать апоптоз в клетках линии интересующей нозологической формы злокачественного новообразования. Нами были исследованы данные эффекты для двух энантиомеров CpдА (рисунок 7) и 8 новосинтезированных производных данного соединения (рисунок 8).



**Рисунок 7** - Структура энантиомеров CpдА

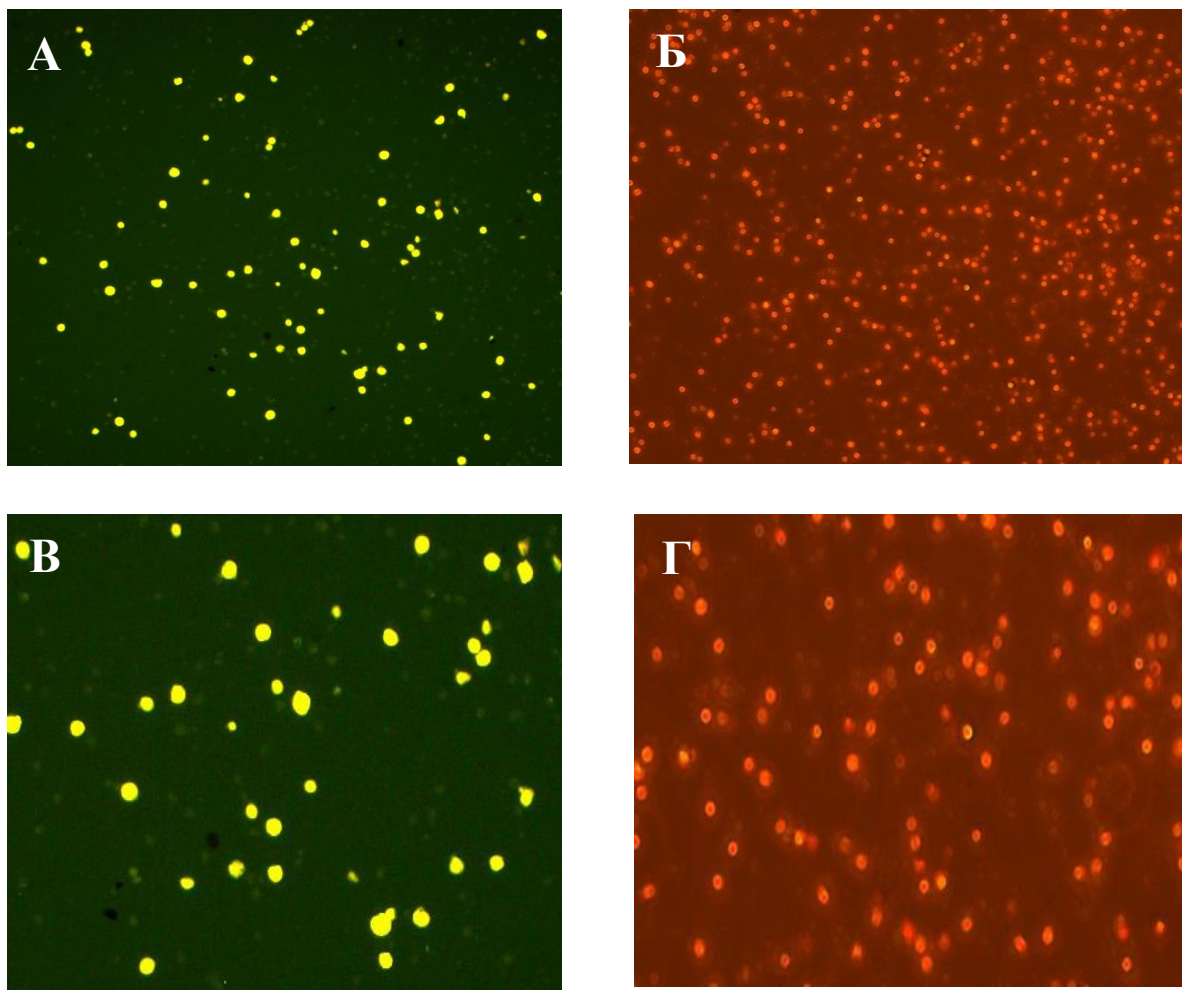


**Рисунок 8** - Структуры химических производных CpdA

### **3.1.1. Модельная система, используемая в работе**

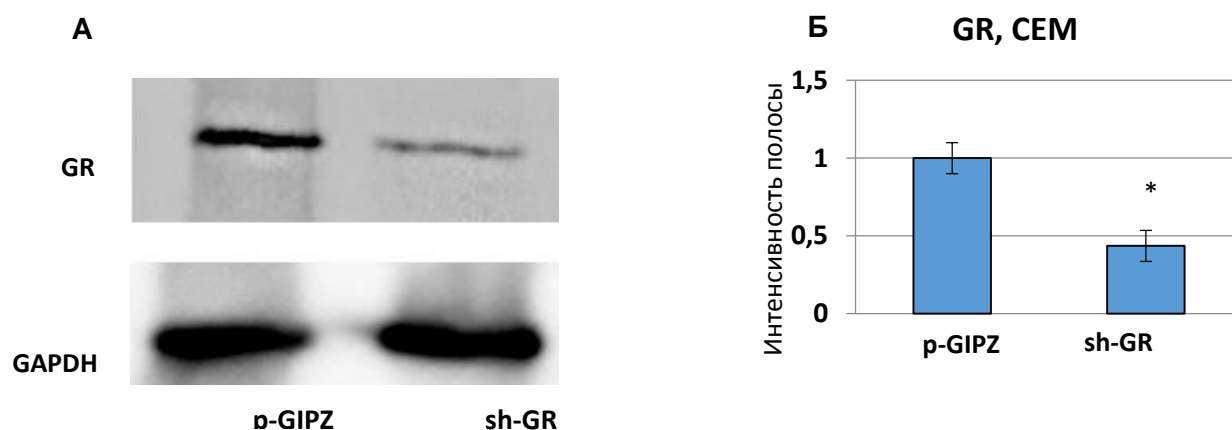
Поскольку важной частью всех дальнейших исследований было доказательство того, что все наблюдаемые эффекты изучаемого соединения являлись GR-зависимыми, коллекция используемых нами клеточных линий была дополнена рядом модифицированных клонов. Для этого мы провели инфекцию клеточной линии СЕМ лентивирусными конструкциями, экспрессирующими короткую шпилечную РНК к GR (shRNA-GR) и получили устойчивую клеточную сублинию СЕМ-shGR. Также был получен контрольный субклон линии СЕМ с аналогичной вставкой в геном, но без экспрессии shРНК к GR (субклон СЕМ-rGIPZ). После проведения нескольких раундов селекции с помощью антибиотика пурамицина было продемонстрировано, что трансдукция прошла успешно, о чем судили по экспрессии GFP. На рисунке 8 продемонстрированы снимки клеток линий СЕМ в ультрафиолетовом свете с длиной волны 395 нм (рисунок 9А) и видимом свете (рисунок 9Б). Для клеток линии СЕМ эффективность трансдукции составила около 90%. Аналогичные результаты были получены для клеток линии Granta (рисунок 9В, Г).





**Рисунок 9** - Эффективность трансдукции лентивирусных конструкций в клетки линии CEM и Granta. (А, В) Клетки CEM (А) и Granta (В) в ультрафиолетовом свете. (Б, Г) Клетки CEM (Б) и Granta (Г) в видимом свете

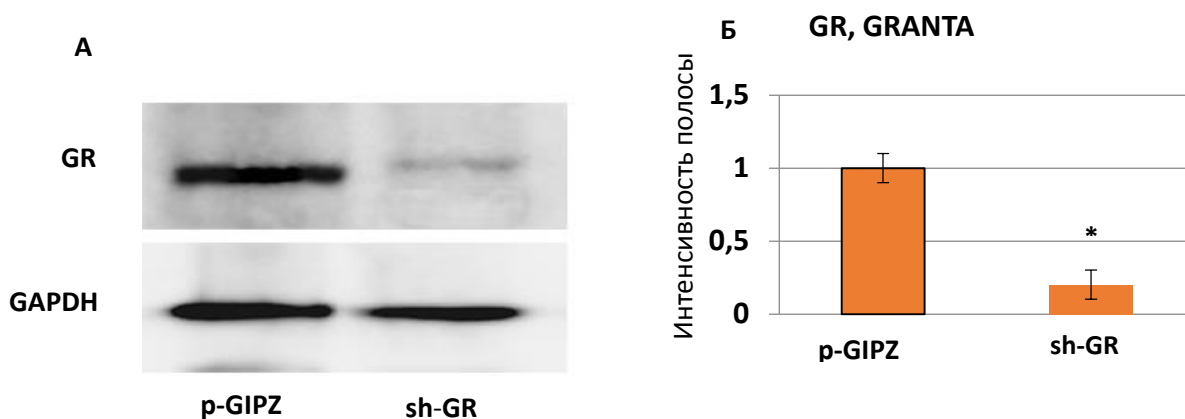
Для определения уровня экспрессии GR был проведен Вестерн блоттинг тотальных клеточных лизатов клеток острого лимфобластного лейкоза CEM. Уровень экспрессии GR в полученных клонах, инфицированных лентивирусными конструкциями, экспрессирующими короткую шпилечную РНК к GR (shRNA-GR), был заметно снижен: подавление экспрессии составило 57% от контроля (рисунок 10).



**Рисунок 10** - Экспрессия GR в клетках линии CEM-pGIPZ и CEM-shGR. (А) Уровень экспрессии GR в клетках CEM после трансдукции лентивирусного вектора pGF-shGR проводили с помощью Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали Вестерн блоттинг с антителами к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH.

Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0.05$

Также был проведен Вестерн-блоттинг тотальных клеточных лизатов на клетках лимфомы мантийной зоны селезенки Granta по определению уровня экспрессии GR в полученных клонах, инфицированных лентивирусными конструкциями, экспрессирующими shRNA-GR. В данной клеточной линии также происходило подавление синтеза белка GR по сравнению с клетками контроля. Из рисунка 11 видно, что экспрессия GR в клетках Granta снизилась на 70%.



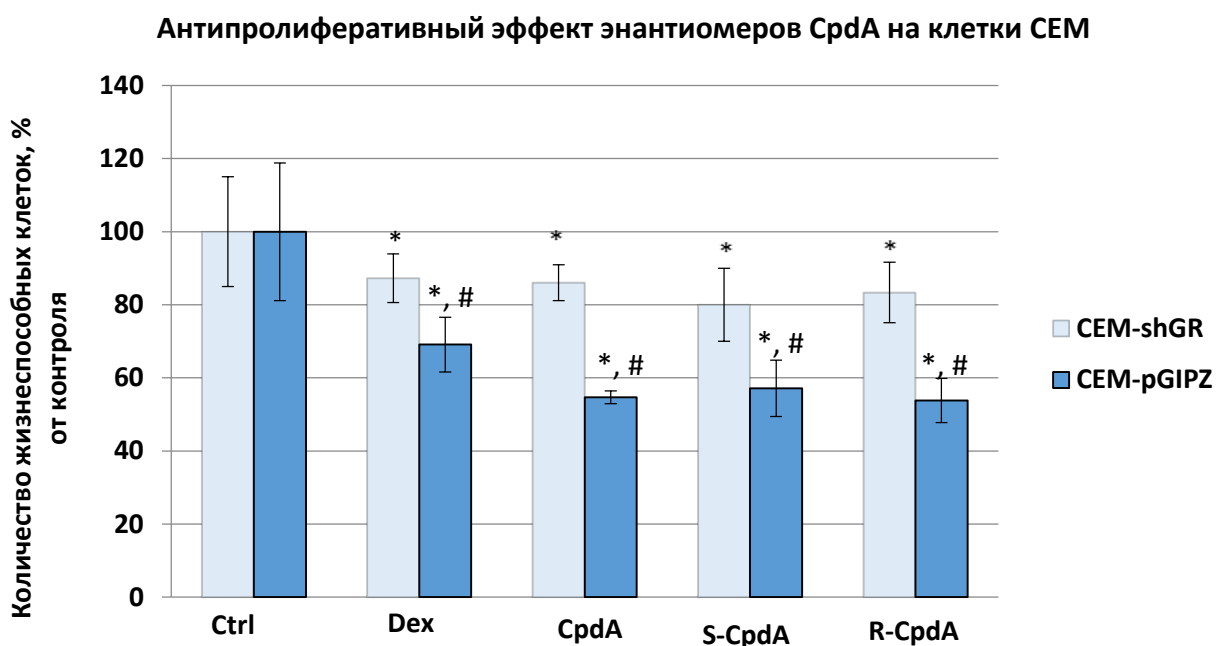
**Рисунок 11** - Экспрессия GR в клетках линии Granta-pGIPZ и Granta-shGR. (А) Уровень экспрессии GR в клетках СЕМ после трансдукции лентивирусного вектора рGF-shGR проводили с помощью Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали Вестерн блоттинг с антителами к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH.

Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0.05$

### **3.1.2. Определение антипролиферативного и проапоптотического эффектов энантиомеров CpдА**

Определение антипролиферативного эффекта проводили в течение 24-х и 48-часовой инкубации с растворителем, Dex, CpдА или энантиомерами CpдА (R, S) с помощью прямого подсчета клеток. Рабочие концентрации энантиомеров CpдА, выбранные нами для использования в работе, составили 1мкМ аналогично рабочим концентрациям рацемата CpдА и Dex. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-pGIPZ после обработки Dex в течение 24ч составило  $69,1 \pm 8,3\%$ , после обработки CpдА –  $54,7 \pm 4,2\%$ . Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-pGIPZ после обработки энантиомерами CpдА составило  $57,2 \pm 8,2\%$  после обработки S-энантиомером CpдА в течение 24-х часов, а после аналогичной обработки R-энантиомером CpдА -  $43,8 \pm 7,4\%$  (рисунок 12). В то же время

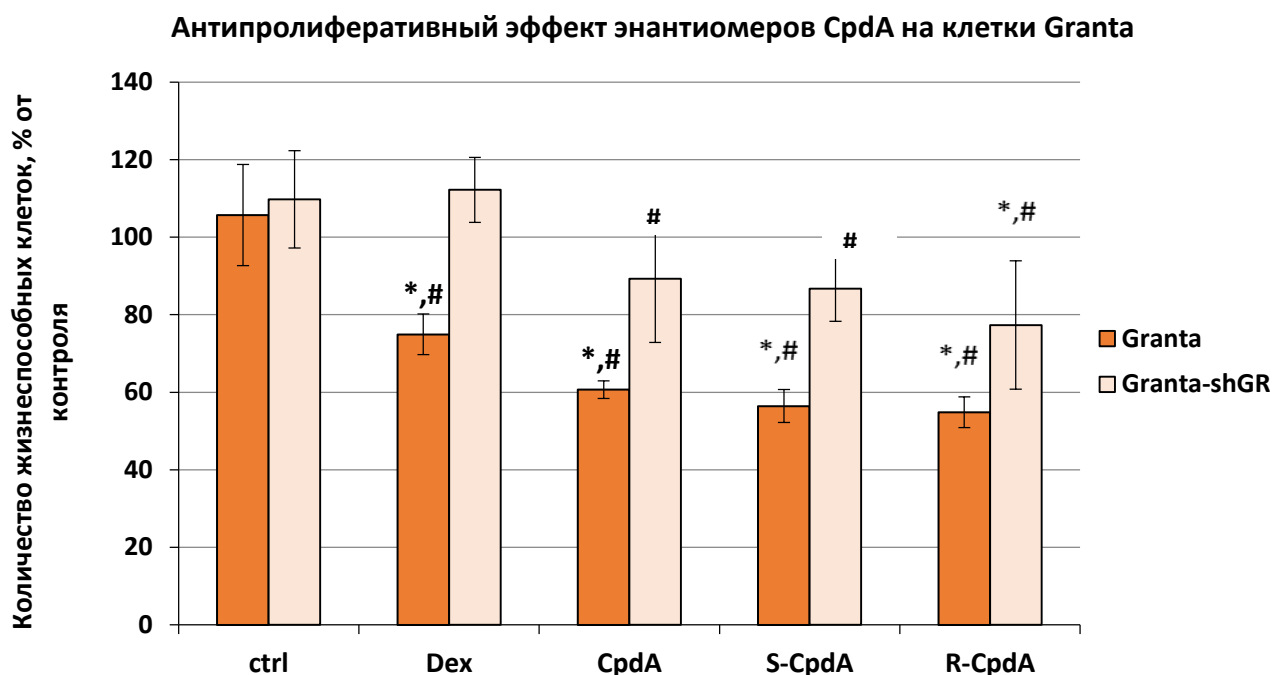
антипролиферативный эффект всех исследуемых соединений на клетки с подавленной экспрессией GR был гораздо менее выражен. Количество жизнеспособных клеток линии CEM-shGR после обработки Dex в течение 24ч составило  $87,3 \pm 7,6\%$ , после обработки CpdA –  $86,0 \pm 4,6\%$ . Количество жизнеспособных клеток линии CEM-shGR после обработки энантиомерами CpdA составило  $80,0 \pm 11,8\%$  после обработки S-энантиомером CpdA в течение 24-х часов, а после аналогичной обработки R-энантиомером CpdA -  $83,3 \pm 9,4\%$ .



**Рисунок 12** - Антипролиферативный эффект энантиомеров CpdA на клетки CEM. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантиомеров CpdA (R, S) (все соединения в концентрации 1 мкМ). Подсчет количества жизнеспособных клеток проводили с помощью прямого подсчета клеток в камере Горяева. 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 CEM-pGIPZ и CEM-shGR,  $p < 0.05$

Количество жизнеспособных клеток линии Granta-pGIPZ после обработки Dex в течение 24ч составило  $46,1 \pm 6,1\%$ , после обработки CpдA –  $59,1 \pm 7,4\%$ . Количество жизнеспособных клеток линии Granta-pGIPZ после обработки энантиомерами CpдA составило  $39,9 \pm 7,4\%$  после обработки S-энантиомером CpдA в течение 24-х часов, а после аналогичной обработки R-энантиомером CpдA –  $40,6 \pm 11,1\%$  (рисунок 13). В то же время антипролиферативный эффект всех исследуемых соединений на клетки с подавленной экспрессией GR был менее выражен. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-shGR после обработки Dex в течение 24ч составило  $57,2 \pm 11,3\%$ , после обработки CpдA –  $61,6 \pm 11,3\%$ . Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-shGR после обработки энантиомерами CpдA составило  $48,7 \pm 11,3\%$  после обработки S-энантиомером CpдA в течение 24-х часов, а после аналогичной обработки R-энантиомером CpдA –  $44,3 \pm 8,2\%$ .

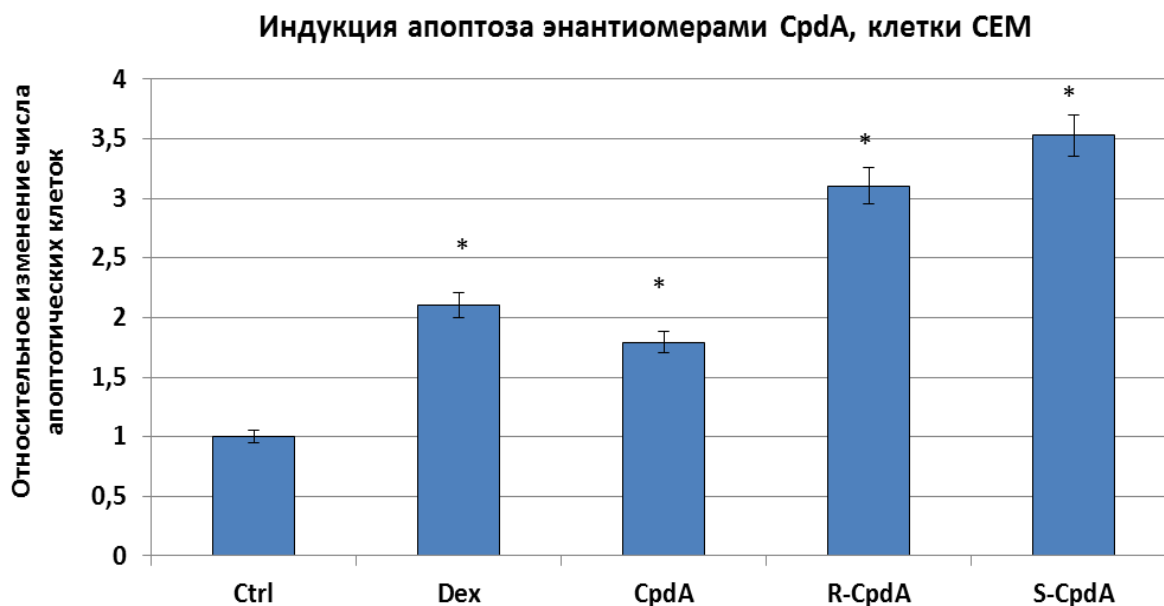


**Рисунок 13** - Антипролиферативный эффект энантиомеров CpдA на клетки В-клеточной лимфомы Granta. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или одного из энантиомеров CpдA (R, S). Подсчет количества жизнеспособных клеток проводили с помощью прямого подсчета клеток в камере Горяева. На рисунке представлено количество живых клеток после обработки Dex, CpдA или одним из энантиомеров CpдA (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 Granta-pGIPZ и Granta-shGR,  $p < 0.05$

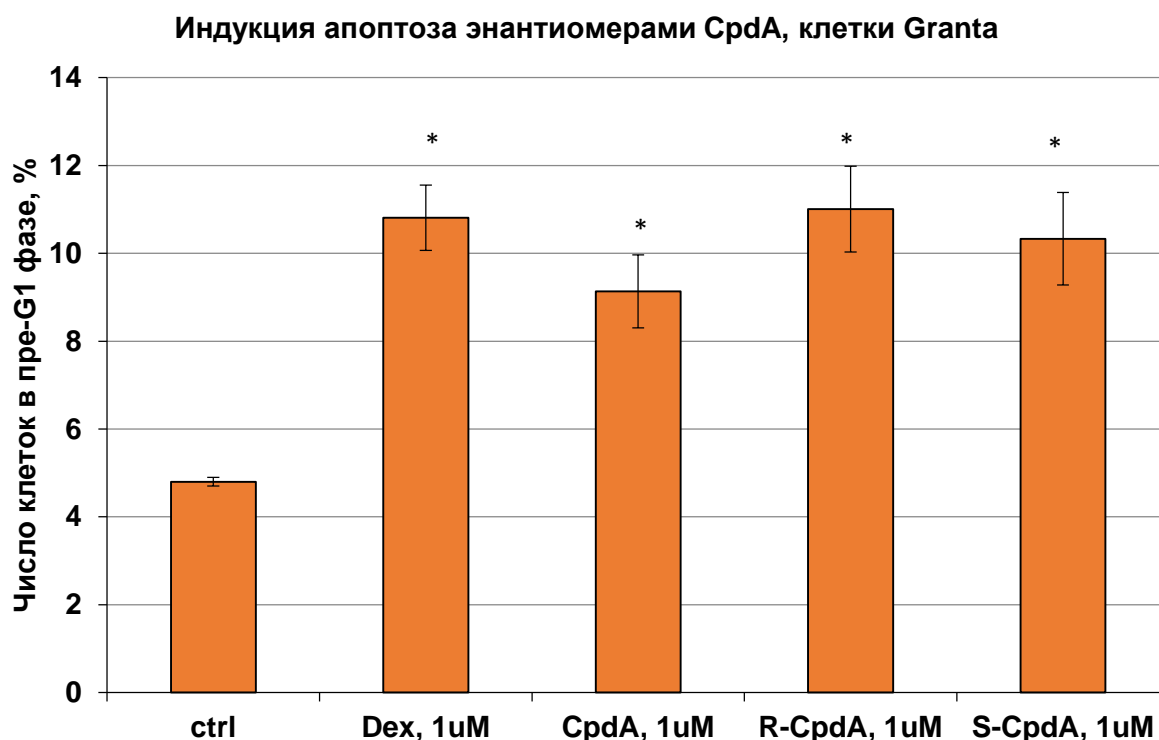
С помощью проточной цитофлуориметрии было продемонстрировано, что в клетках исследуемых линий инкубация с Dex, CpдA и с обоими энантиомерами CpдA, вызывала запуск апоптоза в клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ. Количество клеток, находящихся в пре- $G_1$  фазе, после обработки Dex в течение 24ч увеличилось в 2 раза относительно контроля, после обработки рацемической смесью CpдA – в 1,5 раза. Однако после обработки R- и S-энантиомерами количество клеток, находящихся в пре- $G_1$  фазе, увеличилось в 3 и 3,5 раза

соответственно. Таким образом, антипролиферативный эффект энантиомеров CpдA связан с запуском апоптоза, причем R- и S-энантиомеры обладают более ярко выраженным проапоптотическим эффектом, чем их рацемическая смесь или дексаметазон (рисунок 14).



**Рисунок 14** - Проапоптотический эффект GC, CpдA и энантиомеров CpдA в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, глюкокортикоида дексаметазона, CpдA, S-CpdA, R-CpdA. 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 ( $p < 0,05$ )

С помощью проточной цитофлуориметрии было продемонстрировано, что в клетках исследуемых линий инкубация с Dex, CpдA и с обоими энантиомерами CpдA, вызывала запуск апоптоза в клетках острого лимфобластного лейкоза Granta. Количество клеток, находящихся в пре-G<sub>1</sub> фазе, после обработки Dex в течение 24ч увеличилось в 1,3 раз относительно контроля, после обработки рацемической смесью CpдA – 1,4 раз. Однако после обработки R- и S-энантиомерами количество клеток, находящихся в пре-G<sub>1</sub> фазе, увеличилось примерно в 1,5 раза соответственно (рисунок 15).



**Рисунок 15** - Проапоптотический эффект GC, CpдA и энантиомеров CpдA в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, глюкокортикоида дексаметазона, CpдA, S-CpдA, R-CpдA. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по количеству клеток в пре-G1-фазе.

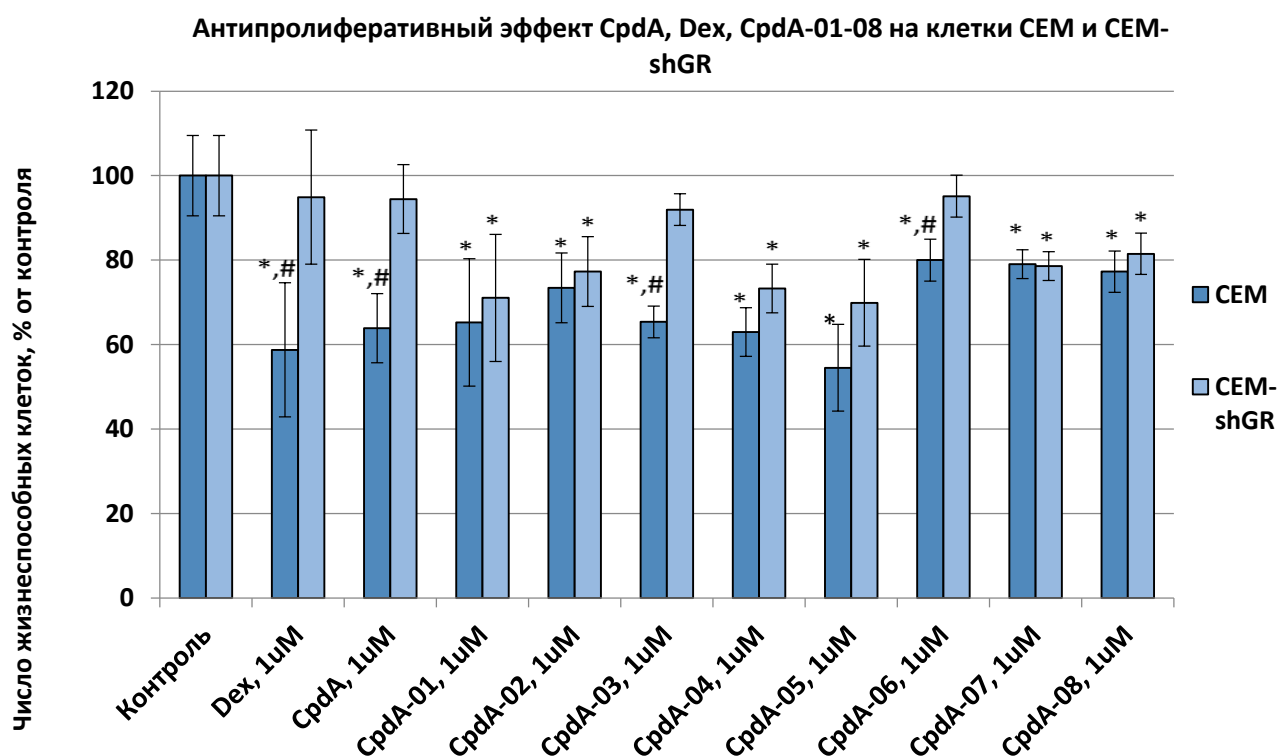
Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

### ***3.1.3. Антипролиферативные и проапоптотические эффекты новосинтезированных химических производных CpдA***

Для изучения биологических эффектов новосинтезированных производных CpдA 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 CpдA, при которых наблюдается снижение числа жизнеспособных клеток на 40-50% по сравнению с контролем после 24-часовой инкубации клеток с данными соединениями, составили 1 мкМ, что сопоставимо с рабочими, используемыми нами ранее, концентрациями дексаметазона и CpдA.

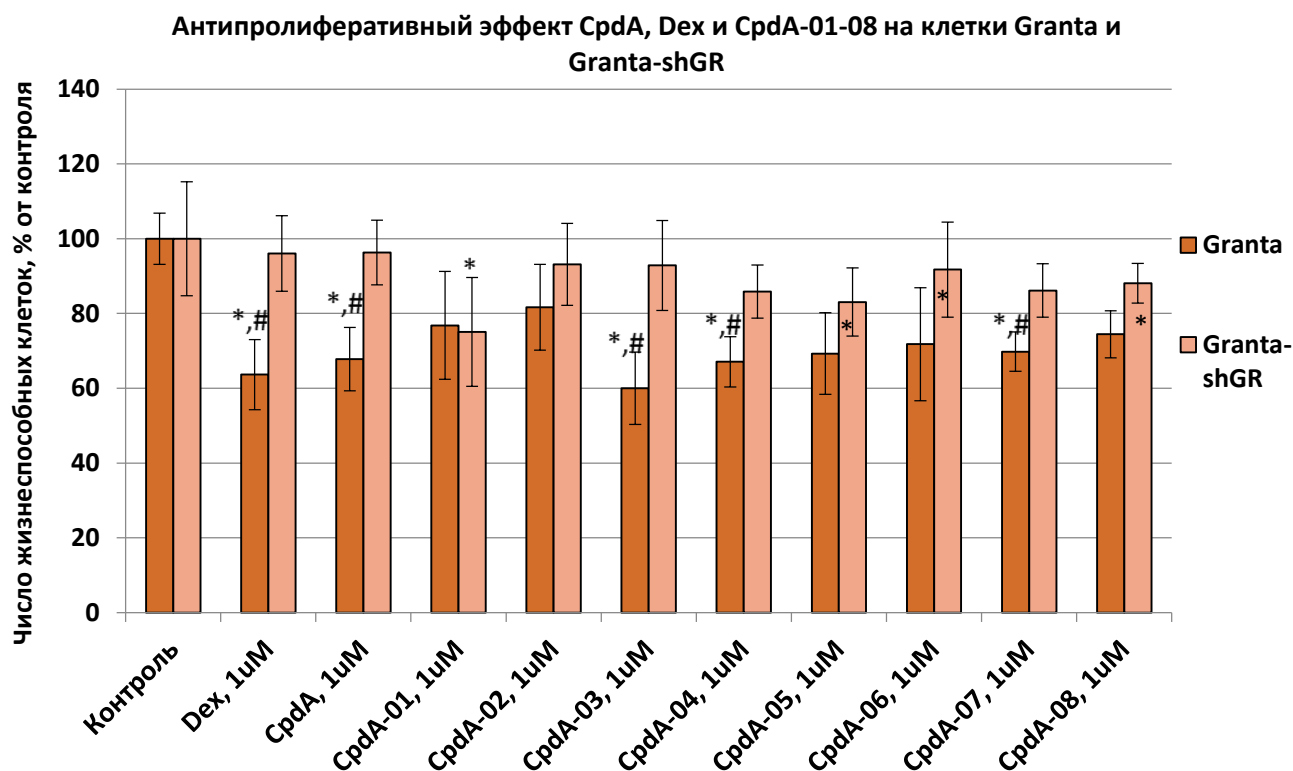


При исследовании роли GR в реализации антипролиферативного эффекта CpдA01-08 с использованием линий клеток СЕМ-shGR и Granta-shGR с подавленной экспрессией рецептора было показано, что наиболее высокой способностью подавлять пролиферацию обладают CpдA-03, -04, -05, -08. Так, при инкубации клеток СЕМ с CpдA-03 в концентрации 1 мкМ доля жизнеспособных клеток составила  $65,3 \pm 5,9\%$ , в то время как в клетках СЕМ-shGR с подавленной экспрессией гена GR количество жизнеспособных клеток составляло  $91,9 \pm 4,8\%$  после 24 ч инкубации. При инкубации с этим же соединением клеток Granta количество живых клеток составляло  $60 \pm 12,1\%$ , а в культуре Granta-shGR с подавленной экспрессией GR количество жизнеспособных клеток составляло  $92,8 \pm 8,1\%$ . Количество жизнеспособных клеток при обработке клеток СЕМ и Granta соединениями CpдA-04 и CpдA-05 было примерно в том же диапазоне, однако разница между антипролиферативным эффектом данных соединений на клетки с нормальной и подавленной экспрессией GR была менее значима (рисунки 16, 17). Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что антипролиферативный эффект новосинтезированного химического производного CpдA, CpдA-03, реализуется посредством активации GR.



**Рисунок 16** - Антипролиферативный эффект CpдA-01-08, CpдA и Dex на клетки CEM и CEM-shGR. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или химических производных CpдA (01-08). Подсчет количества жизнеспособных клеток проводили с помощью прямого подсчета клеток в камере Горяева. На рисунке представлено количество живых клеток после обработки Dex, CpдA или одним из химических производных CpдA (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 CEM-pGIPZ и CEM-shGR,  $p < 0.05$

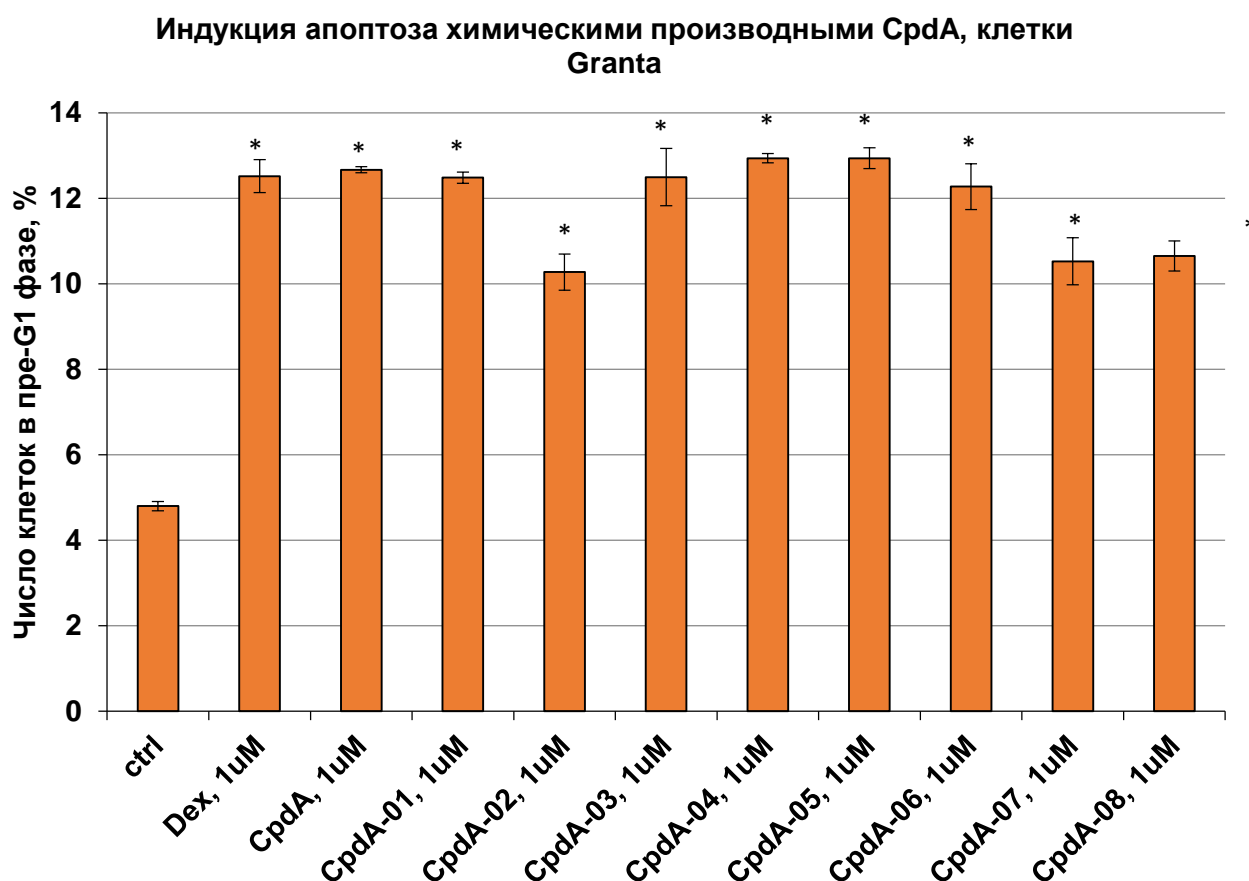


**Рисунок 17** - Антипролиферативный эффект CpdA-01-08, CpdA и Dex на клетки Granta и Granta-shGR. Клетки культивировали в течение 24ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или химических производных CpdA (01- 08). Подсчет количества жизнеспособных клеток проводили с помощью прямого подсчета клеток в камере Горяева. На рисунке представлено количество живых клеток после обработки Dex, CpdA или одним из химических производных 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 SEM-pGIPZ и SEM-shGR,  $p < 0.05$

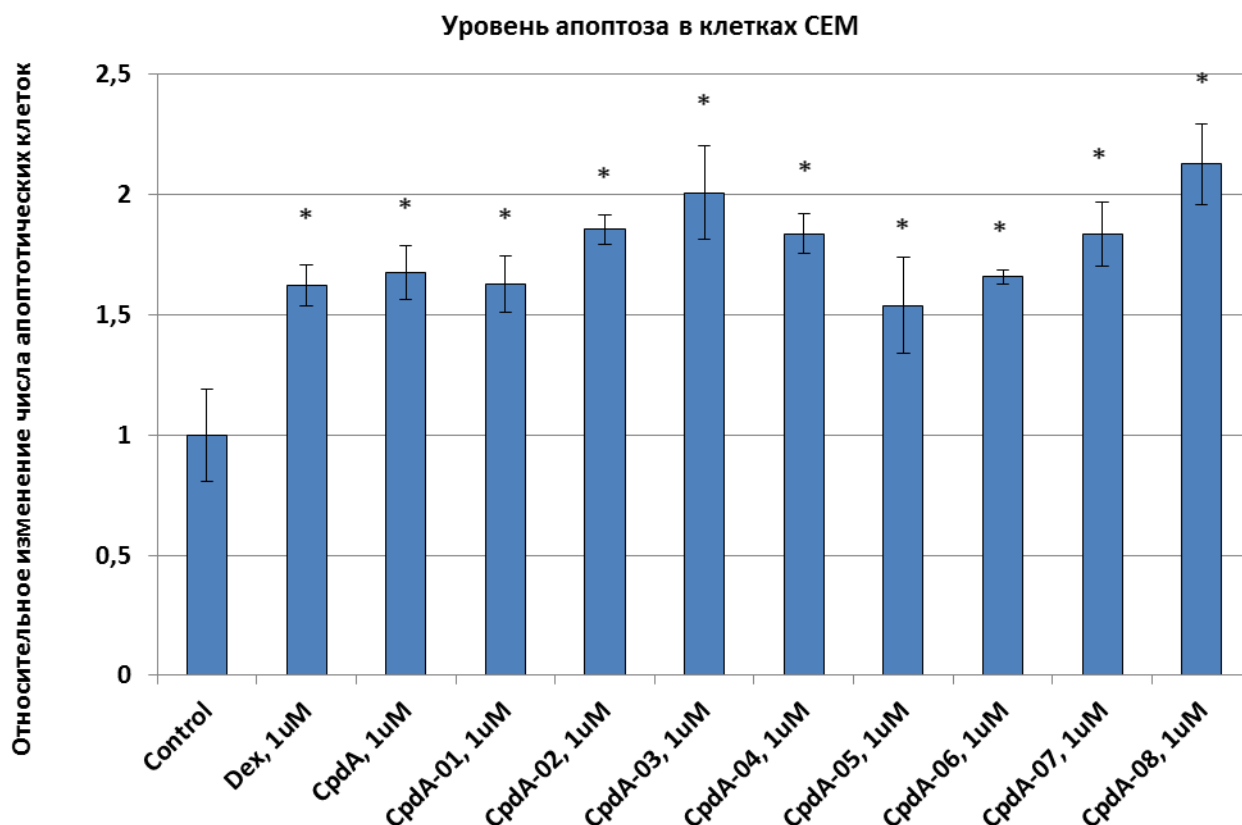
С помощью проточной цитофлуориметрии нами была изучена способность новосинтезированных соединений индуцировать апоптоз. После обработки клеток CpdA 01-08 в обеих клеточных линиях наблюдался запуск апоптоза, который был сопоставим с уровнем апоптоза в клетках после обработки дексаметазоном и CpdA. Наиболее яркий апоптотический эффект проявляют соединения CpdA02, 03, 04, 05, 08 (рисунки 18, 19). Количество клеток Granta,

находящихся в пре-G<sub>1</sub> фазе, после обработки Dex и рацемической смесью CpдA в течение 48 ч увеличилось в 1,6 раз относительно контроля. Однако после обработки аналогами CpдA количество клеток, находящихся в пре-G<sub>1</sub> фазе, увеличилось в случае их обработки CpдA-03, CpдA-04, CpдA-05 в 1,6 раз.

На клетках линии СЕМ было показано, что ряд новосинтезированных химических производных CpдA индуцировали апоптоз в большей степени, чем Dex и рацемат CpдA. Так, количество клеток СЕМ, находящихся в пре-G<sub>1</sub> фазе, после обработки Dex и CpдA в течение 48ч увеличилось в 1,6 раз относительно контроля, в то время как после обработки CpдA-03 – увеличилось в 2 раза, CpдA-04 – в 1,8 раз, и CpдA-08 – 2,1 раз соответственно.



**Рисунок 18** - Проапоптотический эффект соединений CpдA 01-08 в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или CpдA-01-08 (все соединения в концентрации 1µM). Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по количеству клеток в пре-G<sub>1</sub>-фазе. Данные представлены как M±SD (n=3), \* - статистически значимое отличие от контроля, p<0.05



**Рисунок 19** - Апоптотический эффект соединений Cpda 01-08 в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 48 ч в присутствии растворителя, Dex, Cpda или Cpda-01-08 (все соединения в концентрации 1µM). 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,  $p < 0.05$

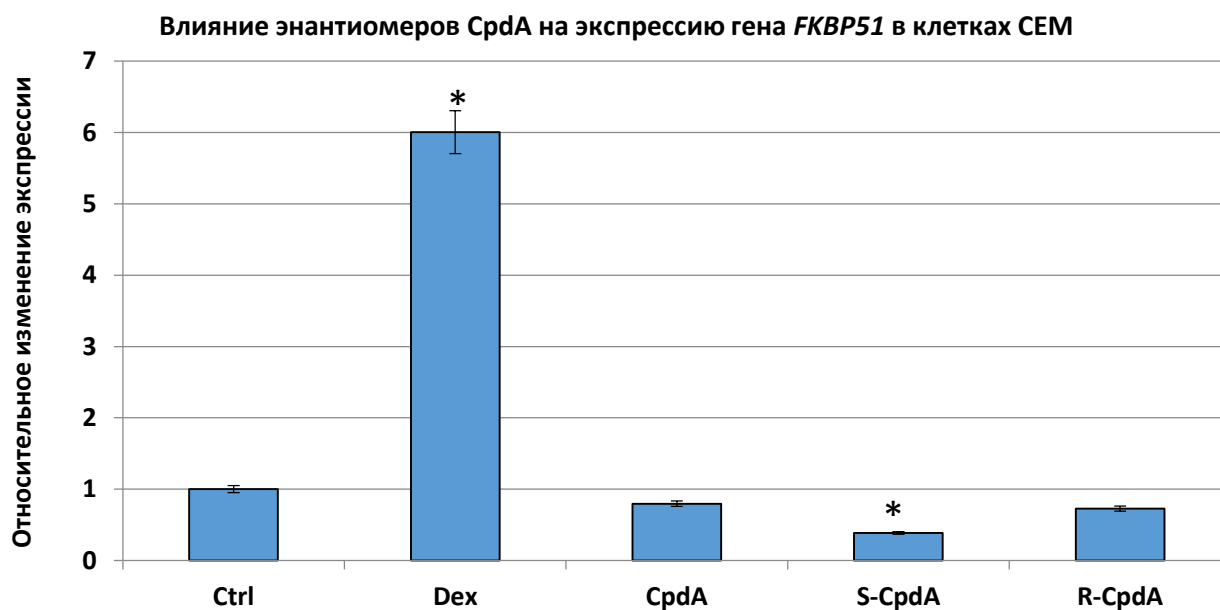
Таким образом, в данной части работы был проведен подбор оптимальных концентраций энантиомеров Cpda и его химических производных. Было показано, что новосинтезированные соединения проявляют антипролиферативный, GR-зависимый эффект на клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ и мантийноклеточной лимфомы Granta, на уровне, сравнимом с рацемической смесью Cpda и глюкокортикоидом сравнения Dex. Подавление жизнеспособности клеток указанных линий согласовалось с индукцией в них апоптоза после обработки всеми исследуемыми соединениями.

Наиболее сильным антипролиферативным и проапоптотическим эффектами обладали соединения CpдА-03, 04, 05 и CpдА-06.

### **3.2. Оценка эффектов исследуемых соединений на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора**

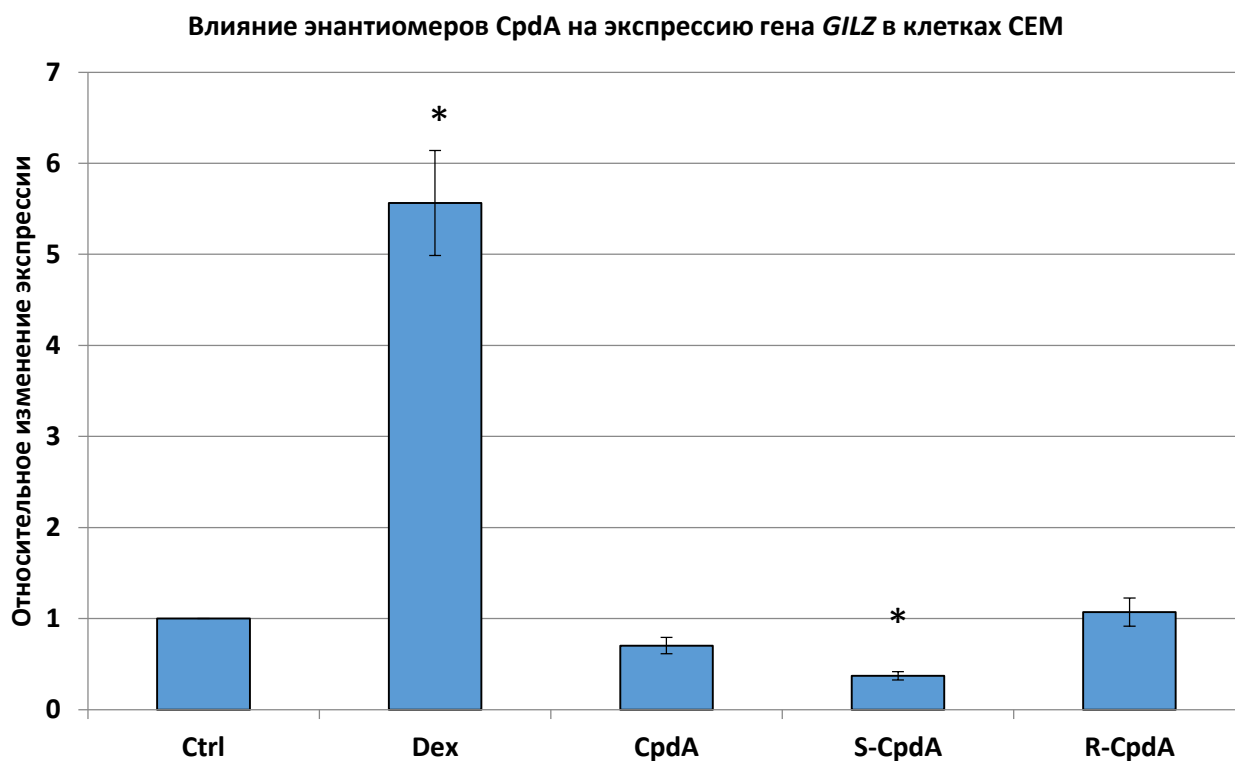
#### ***3.2.1. Исследование способности энантиомеров CpдА к запуску транс-репрессии и транс-активации***

При связывании гомодимера рецептора с респонсивными элементами глюкокортикоидов (GRE) ДНК в клетке запускается механизм транс-активации, что приводит к индукции транскрипции ряда про-пролиферативных и антиапоптотических генов. С помощью количественной ПЦР GR-зависимых генов *FKBP51* и *GILZ*, являющихся маркерами транс-активации, было продемонстрирован эффект энантиомеров CpдА на клетки лейкоза СЕМ после 24-часовой обработки. Было показано, что энантиомеры CpдА не вызывали увеличение экспрессии данных генов, как и рацемическая смесь данного соединения. В качестве положительного контроля был использован глюкокортикоид дексаметазон, который увеличивал экспрессию этих генов в 5 раз (рисунки 20, 21).



**Рисунок 20** - Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию GR-зависимого гена *FKBP51* в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантиомеров CpdA (R, S) (все соединения в концентрации 1 мкМ). Уровень экспрессии *FKBP51* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

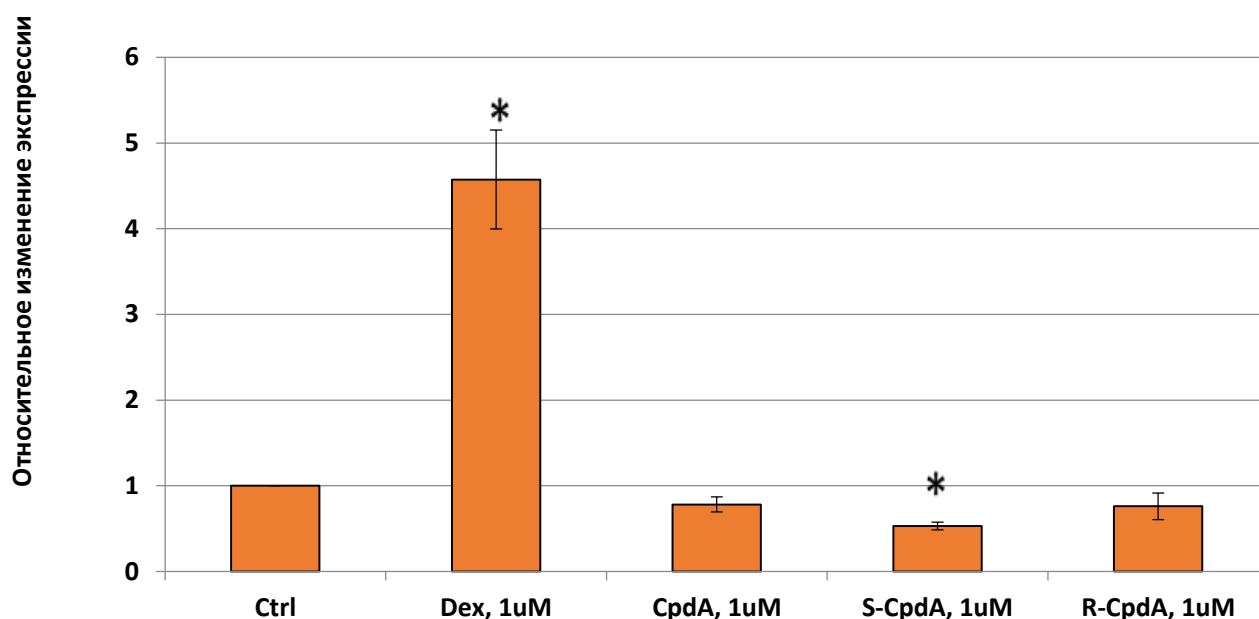
Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 21** - Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию GR-зависимого гена *GILZ* в клетках линии СЕМ. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантиомеров CpdA (R, S). Уровень экспрессии *GILZ* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ ).

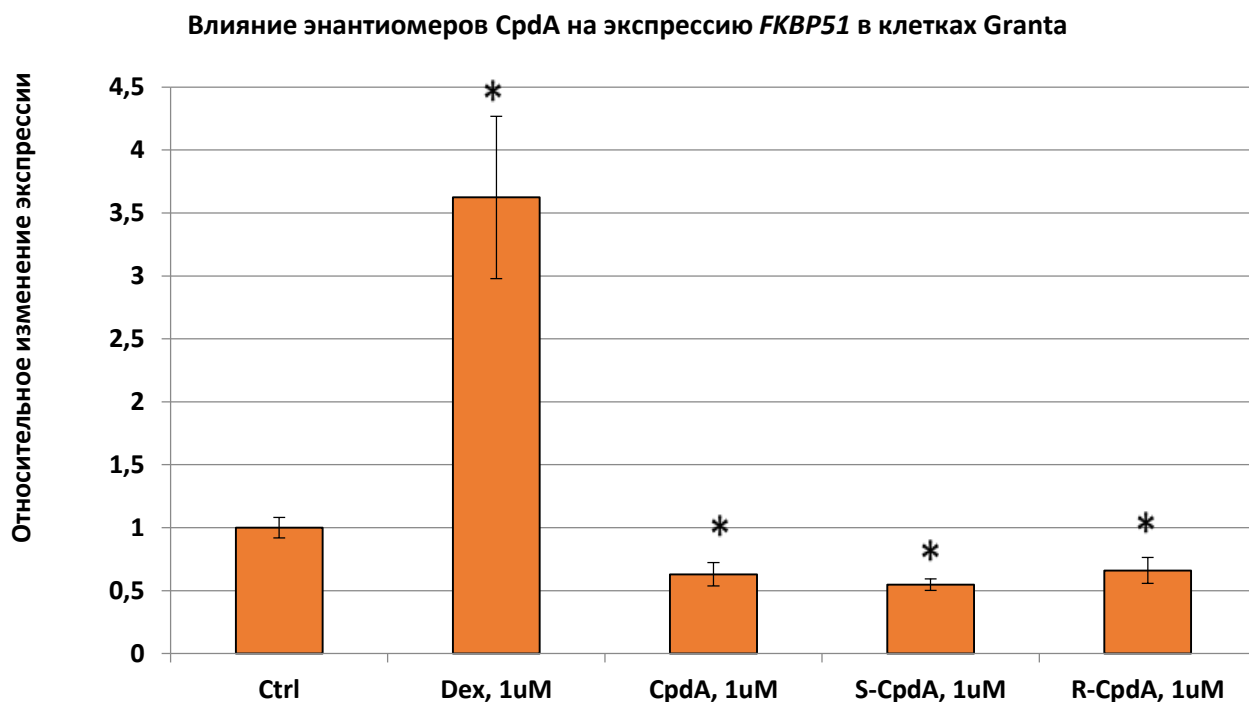
Мы исследовали изменение экспрессии генов *FKBP51* и *GILZ* при обработке Dex, CpdA и энантиомерами CpdA (R, S) клеток Granta. Для клеток Granta была показана индукция экспрессии *FKBP51* и *GILZ* после обработки Dex в 4,6 и 3,6 раза соответственно, а также незначительное снижение экспрессии этих генов при обработке CpdA на 15-25% (рисунки 22, 23).



Влияние энантимеров CpdA на экспрессию *GILZ* в клетках Granta

**Рисунок 22** - Влияние энантимеров CpdA на экспрессию GR-зависимого гена *GILZ* в клетках линии Granta. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантимеров CpdA (R, S). Уровень экспрессии *GILZ* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

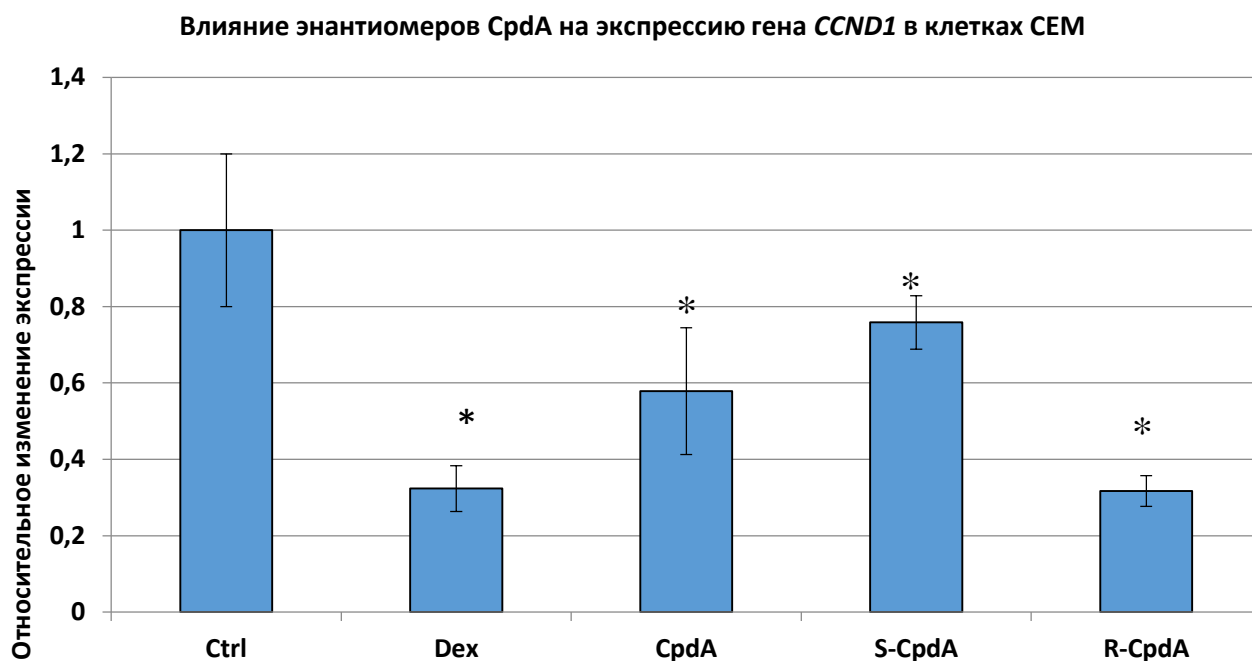
Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 23** - Влияние энантиомеров CpдA на экспрессию GR-зависимого гена *FKBP51* в клетках линии Granta. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или одного из энантиомеров CpдA (R, S). Уровень экспрессии *FKBP51* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

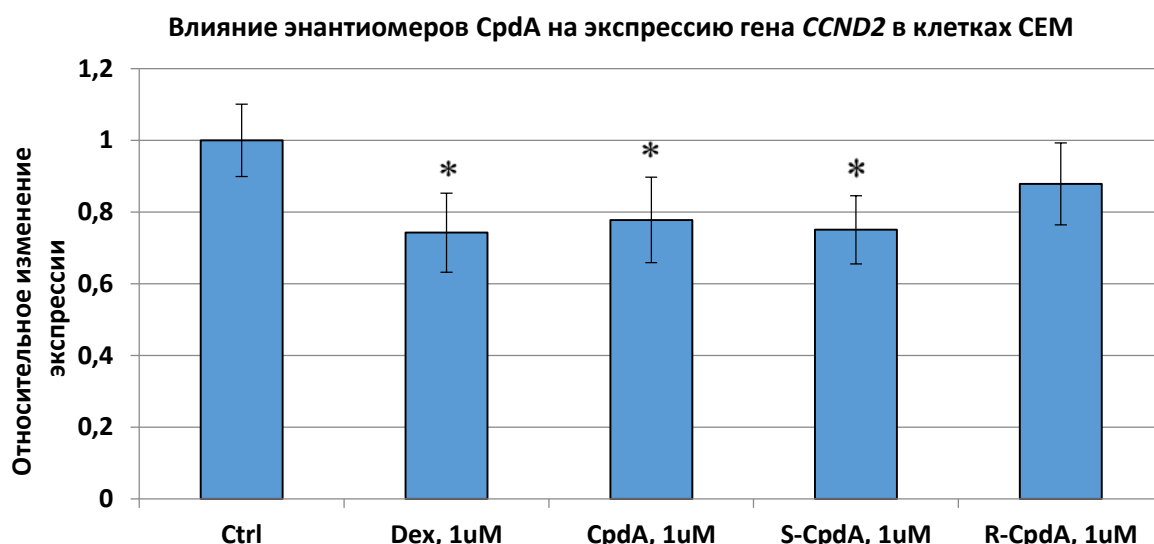
Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ ).

Для оценки транс-репрессорного потенциала энантиомеров CpдA в сравнении с рацемической смесью CpдA и глюкокортикоидом дексаметазоном с помощью количественной ПЦР была исследована экспрессия генов, содержащих в промоторной области сайты связывания NF- $\kappa$ B – регуляторов клеточного цикла циклинов D1 и D2. При обработке Dex клеток линии SEM 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 соответственно (рисунки 24-25).



**Рисунок 24** - Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию гена *CCND1* в клетках линии СЕМ. Клетки культивировали в течение 4ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или энантиомеров CpdA (R, S). Уровень экспрессии гена *CCND1* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

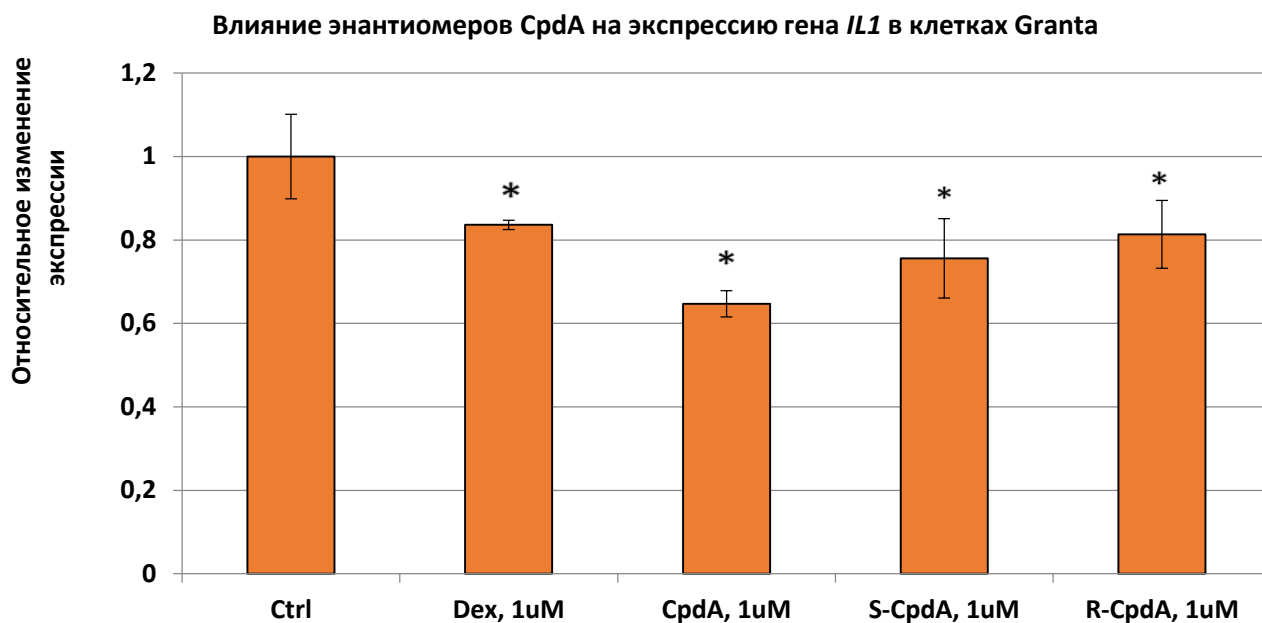
Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )



**Рисунок 25** - Влияние энантиомеров CpдA на экспрессию гена *CCND2* в клетках линии СЕМ. Клетки культивировали в течение 1ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или энантиомеров CpдA (R или S). Уровень экспрессии гена *CCND2* определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

При исследовании запуска транс-репрессии в клетках мантийноклеточной лимфомы Granta использовать циклины D1 и D2 как маркеры данного процесса нецелесообразно, как было описано выше. Хромосомная транслокация  $t(11;14)$ , затрагивающая гены иммуноглобулина H и *CCND1/D2*, является основным патогенетическим звеном развития данного заболевания; экспрессия *CCND1/D2* высока и снижение ее затруднительно регистрировать даже при обработке высокими дозами GC [44]. В случае клеток Granta в качестве маркеров транс-репрессии нами были использованы гены цитокинов *IL-1* и *IL-6*, также регулирующих развитие воспаления и контролирующих пролиферацию. На рисунках 26, 27 представлены результаты анализа экспрессии указанных генов после обработки клеток Granta энантиомерами CpдA. Как можно увидеть, экспрессия генов *IL-1* и *IL-6* снижалась после обработки всеми исследуемыми

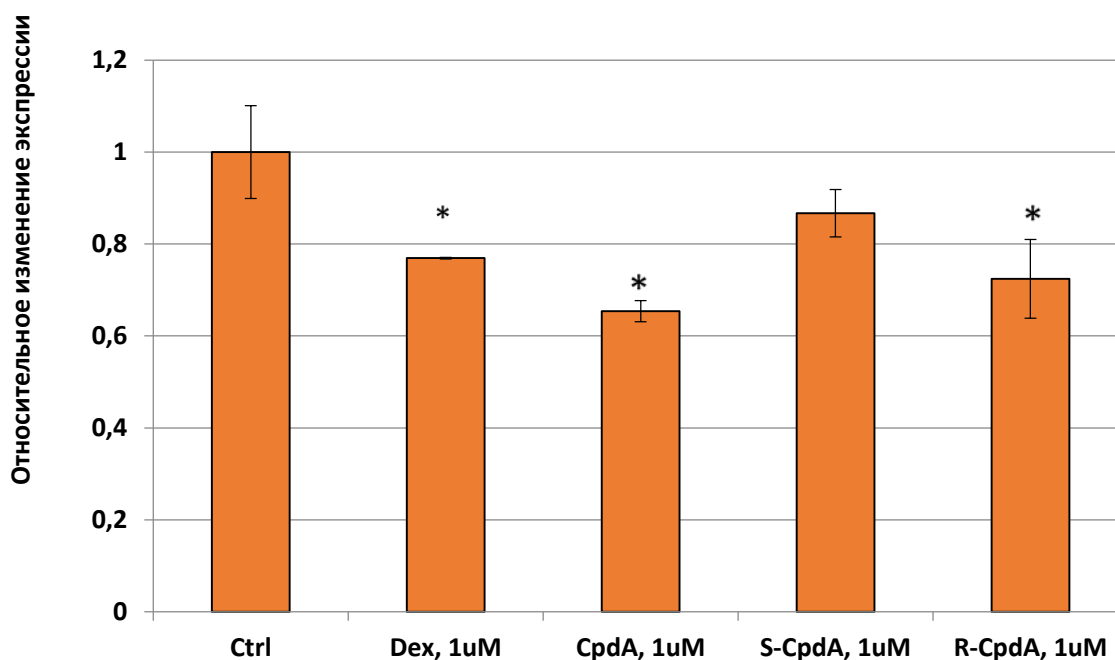
соединениями в 1,3-1,7 раза. Зависимости между снижением экспрессии генов энантиомерами CpdA не наблюдали. Так, более выраженный эффект на подавление экспрессии *IL-1* был показан для S-CpdA, а в случае анализа экспрессии гена *IL-6* было показано, что ингибирующий эффект R-CpdA выражен сильнее в клетках линии Granta.



**Рисунок 26** - Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию GR-зависимого гена *IL1* в клетках линии Granta. Анализ экспрессии *IL1* методом ОТ-ПЦР. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантиомеров CpdA (R, S). Уровень экспрессии *IL1* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

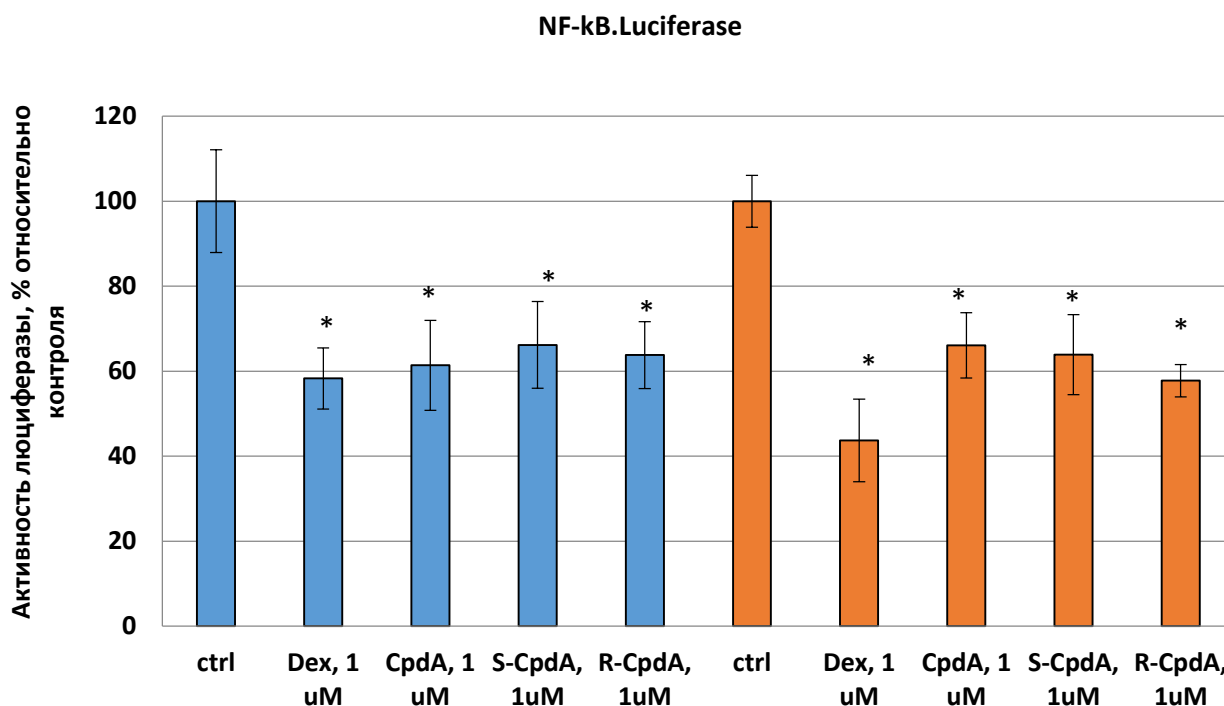
### Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию гена *IL6* в клетках Granta



**Рисунок 27** - Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию GR-зависимого гена *GILZ* в клетках линии Granta. Анализ экспрессии *IL6* методом ОТ-ПЦР. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантиомеров CpdA (R, S). Уровень экспрессии *IL6* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

Для подтверждения влияния энантиомеров CpdA на молекулярные механизмы действия GR был проведен люциферазный репортерный анализ. Полученные результаты представлены на рисунке 28. В клетках СЕМ-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, наблюдалось снижение активности NF-kB в 1,5-2,5 раза.

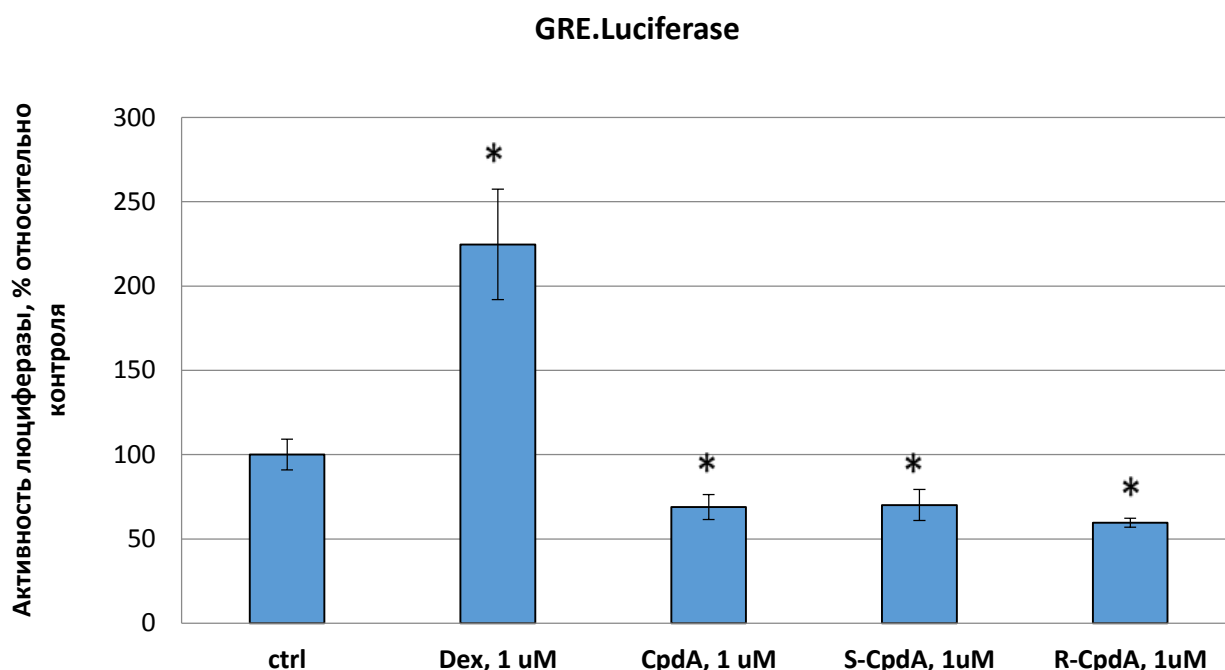


**Рисунок 28** - Влияние энантиомеров CpdA на активность NF-kB в клетках CEM (синий) и Granta (красный). После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-NF-kB клетки CEM культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из энантиомеров CpdA (R, S) (все соединения в концентрации 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,  $p < 0.05$

После обработки клеток CEM-GRE.Luc энантиомерами CpdA, Dex и рацемической смесью CpdA 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 (рисунок 29). В случае клеток лимфомы Granta наблюдали

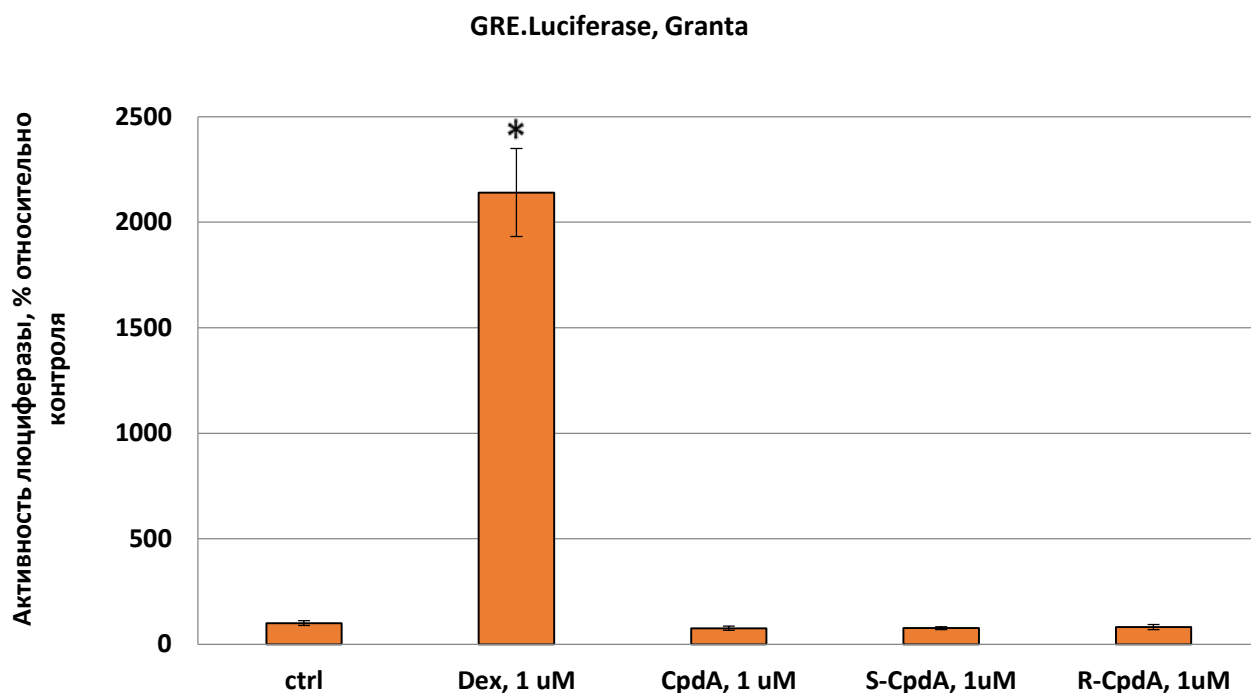
схожий эффект с тем отличием, что тенденцию к снижению активности люциферазы проявляли как оба энантиомера, так и рацемическая смесь CpdA (рисунок 30).



**Рисунок 29** - Влияние энантиомеров CpdA на активность GR в клетках СЕМ. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки СЕМ 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,  $p < 0.05$





**Рисунок 30** - Влияние химических производных CpdA на активность NF-kB в клетках СЕМ. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки Granta 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,  $p < 0.05$

### **3.2.2. Оценка влияния новосинтезированных химических производных СрдА на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора**

Первоочередным необходимым условием для описания новосинтезированных химических производных СрдА как лигандов GR являлось прямое доказательство физического взаимодействия химических производных СрдА с рецептором. Наиболее перспективным соединением, проявляющим GR-зависимый антипролиферативный эффект было химическое производное СрдА-03, аналог алкалоида Синефрина, которое также является более стабильным и инертным соединением, не способным образовывать производное азиридина из-за отсутствия протона при атоме азота. Другое активное химическое производное СрдА-04 также является аналогом Синефрина, но более гидрофильным соединением. Менее активными соединениями в тестах на апоптоз и жизнеспособность клеток являлись СрдА-01, СрдА-02, а также СрдА-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 (Asn<sup>564</sup> и Arg<sup>611</sup>) [100] и что может объяснить их низкий антипролиферативный эффект.

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

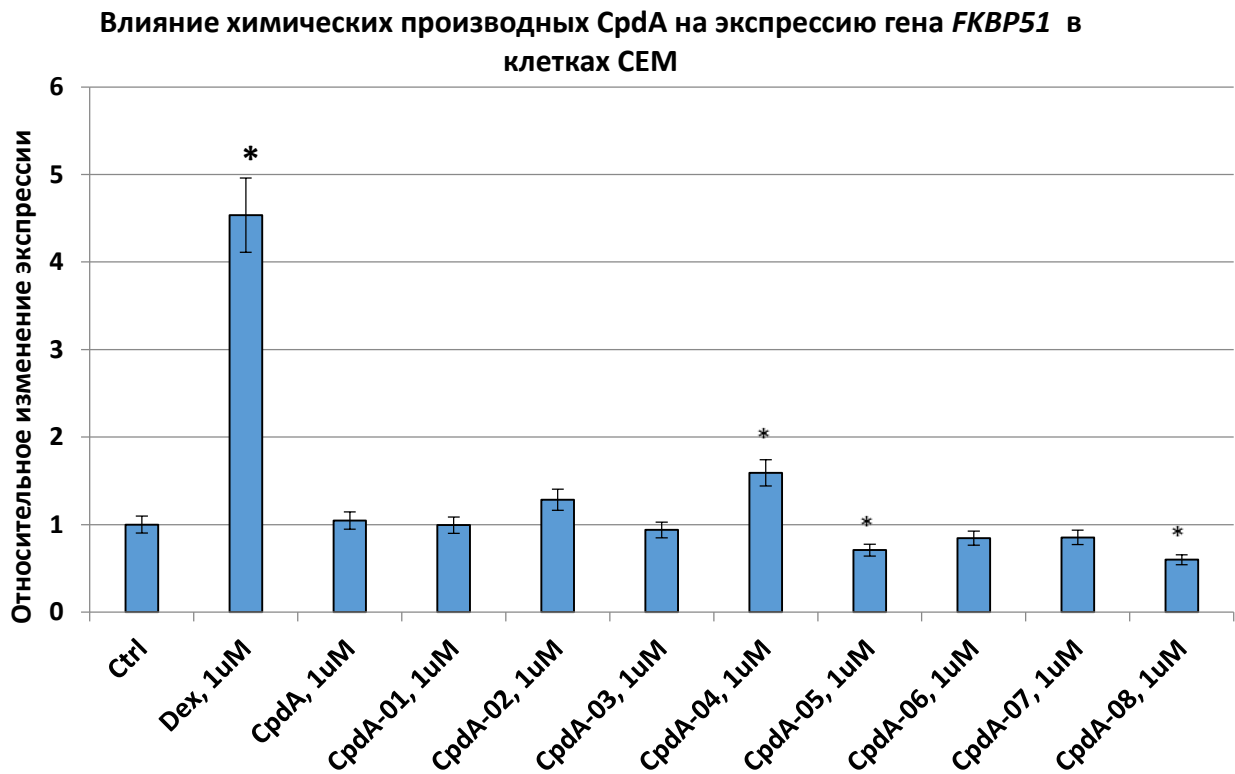
По результатам наших исследований было показано, что IC<sub>50</sub> для Dex, который использовали в качестве положительного контроля, составила 22 нМ, что совпадает с данными литературы [101]. IC<sub>50</sub> для исходного соединения СрдА составила 2,2 мкМ, что также совпадает с данными литературы [102]. IC<sub>50</sub> для СрдА-03 лежала в том же диапазоне и составила 1,8 мкМ, в отличие от СрдА-04,

IC<sub>50</sub> которого была в 10 раз выше и составила 21,3 мкМ (таблица 2). Для СpdА-05, -06 и 01 не было показано существенное изменение поляризации флуоресценции при инкубации с GR и Fluormone GS1, расчетные значения IC<sub>50</sub> для данных соединений были довольно высоки (таблица 2).

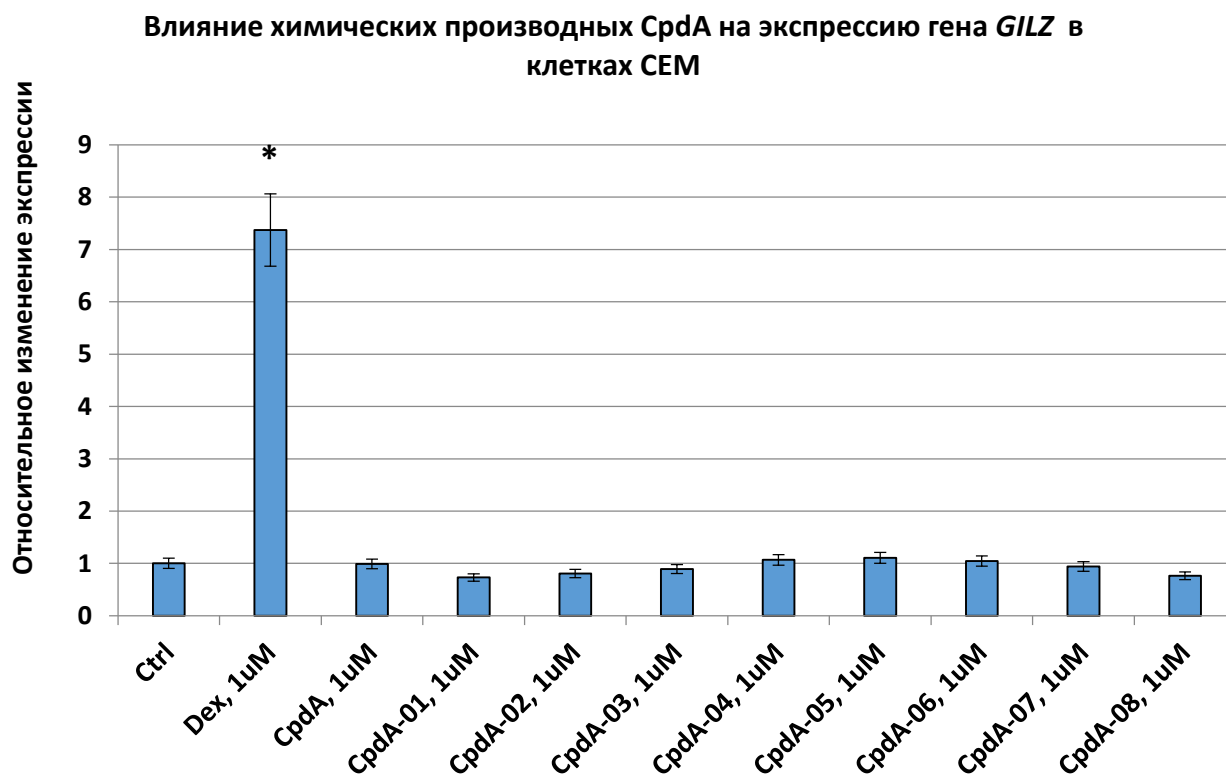
**Таблица 2** - Концентрации Dex, СpdА, СpdА-01-08, при которых наблюдали подавление связывания флуоресцентно меченого лиганда GR, Fluormone GS1, на 50%

Вещество	log IC <sub>50</sub> , нМ	±	±,%	IC <sub>50</sub> , нМ	±
Dex	1,35	0,48	3,6	22,3	7,99
СpdА	3,36	0,27	8%	2291,2 (2,3 мкМ)	184,4
СpdА-01	5,33	0,44	8%	>100мкМ	-
СpdА-02	8,34	0,71	8,5%	>100мкМ	-
СpdА-03	3,26	0,22	7%	1836,5 (1,8 мкМ)	123,1
СpdА-04	4,33	0,34	8%	21163 (21,2 мкМ)	1686
СpdА-05	5,67	0,51	9%	>100мкМ	-
СpdА-06	9,13	1,78	19%	>100мкМ	-
СpdА-07	8,61	1,62	9%	>100мкМ	-
СpdА-08	7,93	0,94	12%	>100мкМ	-

Для определения транс-активационного потенциала новых синтезированных лигандов GR с помощью количественной ПЦР была исследована их способность индуцировать транскрипцию GR-зависимых генов *FKBP51* и *GILZ*. На рисунке 31 представлены результаты изменения экспрессии гена *FKBP51* в клетках линии СЕМ после обработки клеток химическими производными СpdА, Dex и рацемической смесью СpdА. При обработке клеток СЕМ СpdА-04 экспрессия *FKBP51* повышалась в 1,4 раза, что предполагает существование альтернативных механизмов действия данного соединения. Наиболее оптимальные результаты показало соединение СpdА-03, которое стабильно не увеличивало экспрессию данных генов в обоих клеточных линиях. Сходный эффект наблюдали при оценке экспрессии гена *GILZ* (рисунок 32).



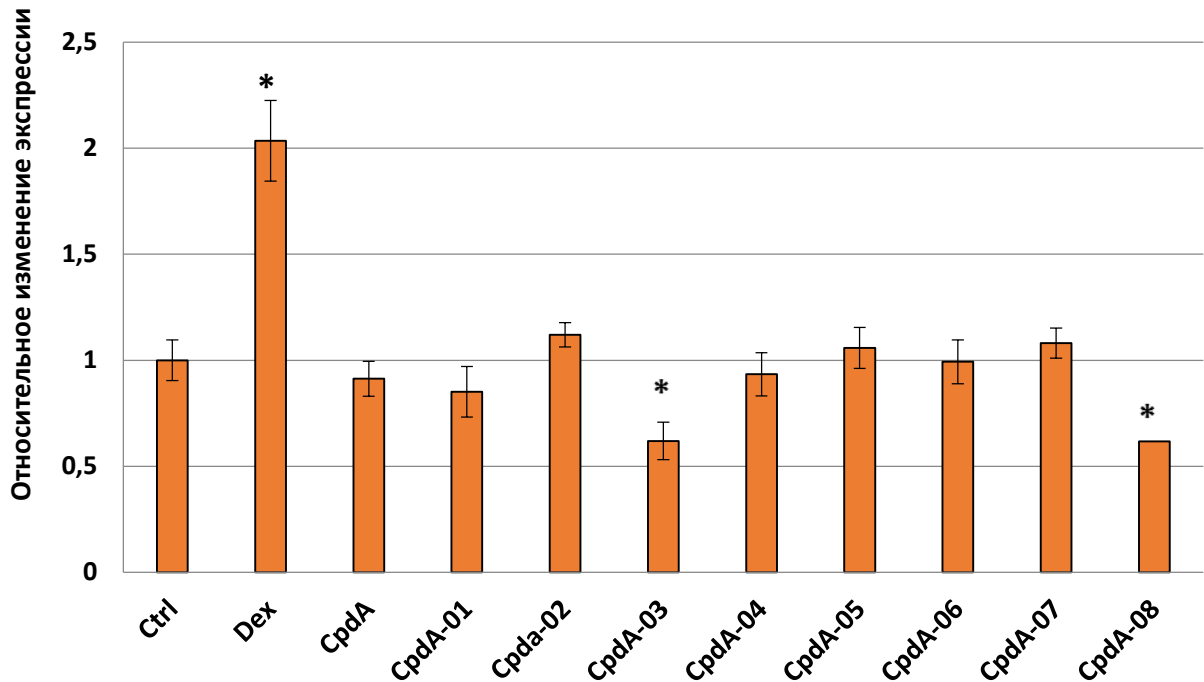
**Рисунок 31** - Влияние химических производных СрдА на экспрессию гена *FKBP51* в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, СрдА или одного из химических производных СрдА. Уровень экспрессии *FKBP51* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )



**Рисунок 32** - Влияние химических производных CpдA на экспрессию гена *GILZ* в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или одного из химических производных CpдA. Уровень экспрессии *GILZ* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

В клетках линии Granta после обработки их CpдA-03 в концентрации 1 мкМ экспрессия гена *FKBP51* падала в 1,5 раза (рисунок 33), экспрессия гена *GILZ* падала в 1,3 раза относительно контроля (рисунок 34). В качестве положительного контроля был использован глюкокортикоид дексаметазон, который увеличивал экспрессию этих генов в 4,5 и 7,5 раз в клетках СЕМ (рисунки 31-32) и в 1,5-2 раза в клетках Granta (рисунки 33-34).

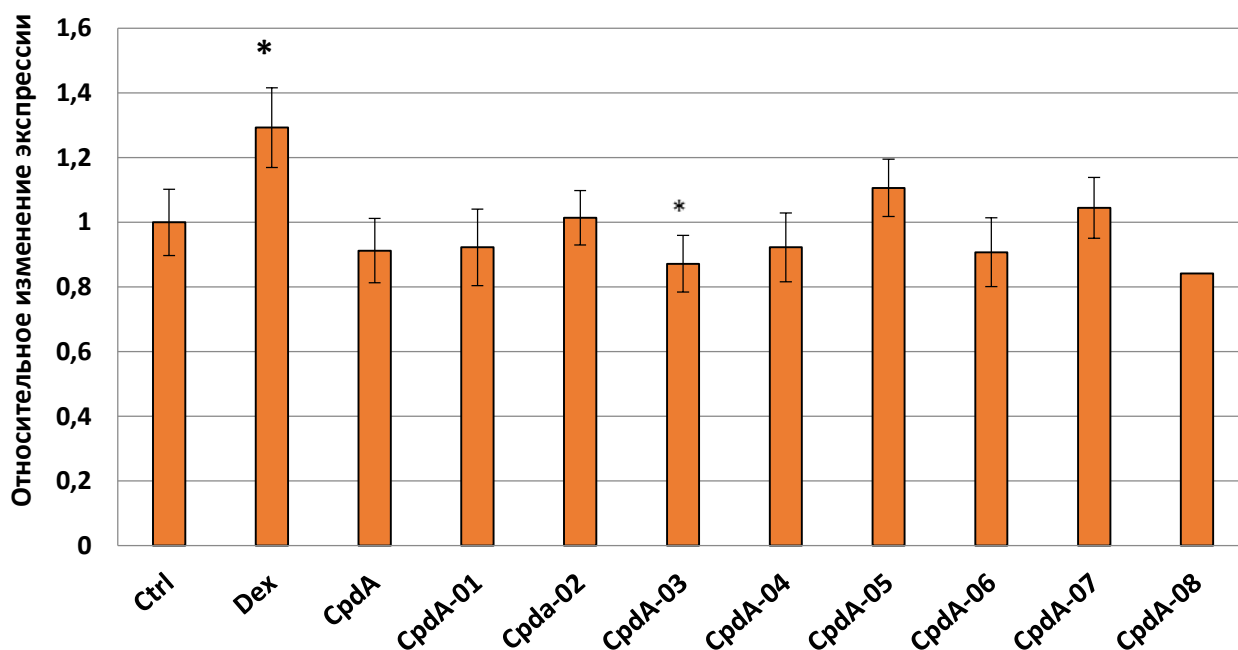
Влияние химических производных СpdА на экспрессию гена *FKBP51* в клетках Granta



**Рисунок 33** - Влияние химических производных СpdА на экспрессию гена *FKBP51* в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, СpdА или одного из химических производных СpdА. Уровень экспрессии *FKBP51* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

### Влияние химических производных CpdA на экспрессию гена *GILZ* в клетках Granta

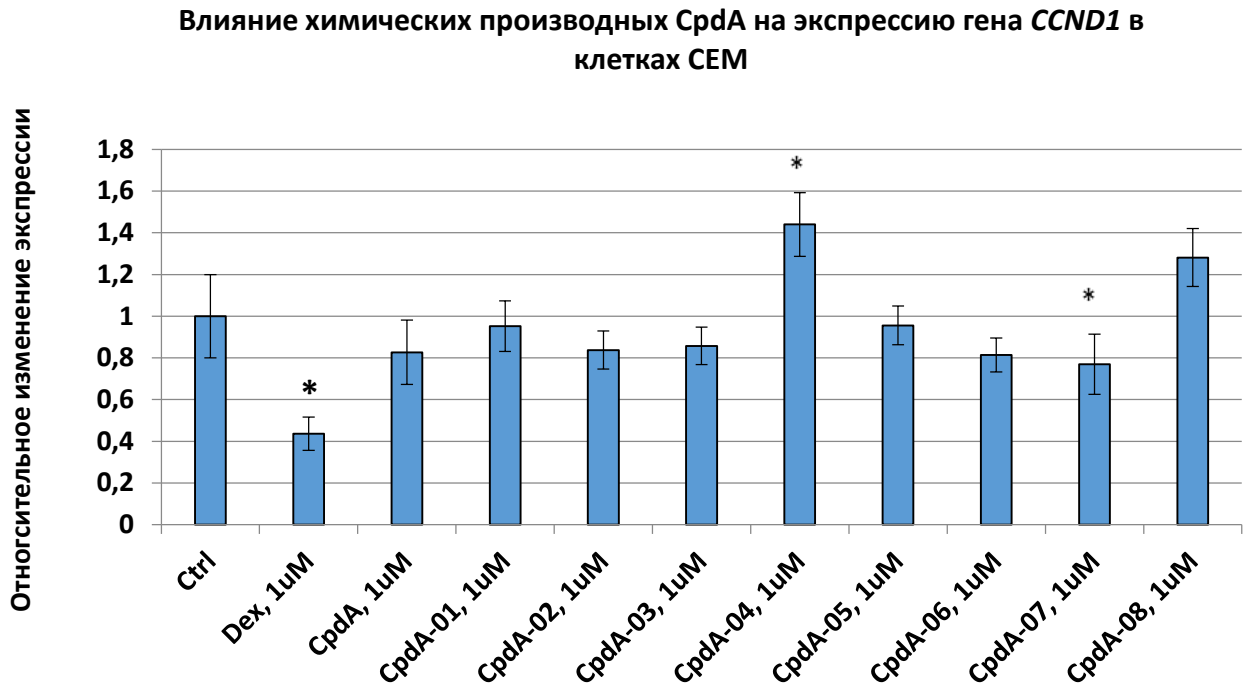


**Рисунок 34** - Влияние химических производных CpdA на экспрессию гена *GILZ* в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA или одного из химических производных CpdA. Уровень экспрессии *GILZ* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

Для оценки транс-репрессорного потенциала новых синтезированных соединений оценивали изменения экспрессии NF- $\kappa$ B-зависимых про-пролиферативных генов циклинов D1-D2 (*CCND1-D2*) в клетках СЕМ и Granta после инкубации с исследуемыми соединениями в течение 24 ч. На рисунках 35 и 36 представлены данные по изменению экспрессии данных генов в клетках СЕМ. Как и ожидалось, Dex и CpdA подавляли экспрессию обоих циклинов. В отношении химических производных CpdA преимущественно было отмечено также подавление экспрессии данных генов, за исключением CpdA-04 и CpdA-08:

так увеличение экспрессии гена *CCND1* после обработки клеток CpдA-04 было в 1,4 раза, а после обработки CpдA-08 почти в 1,3 раза.

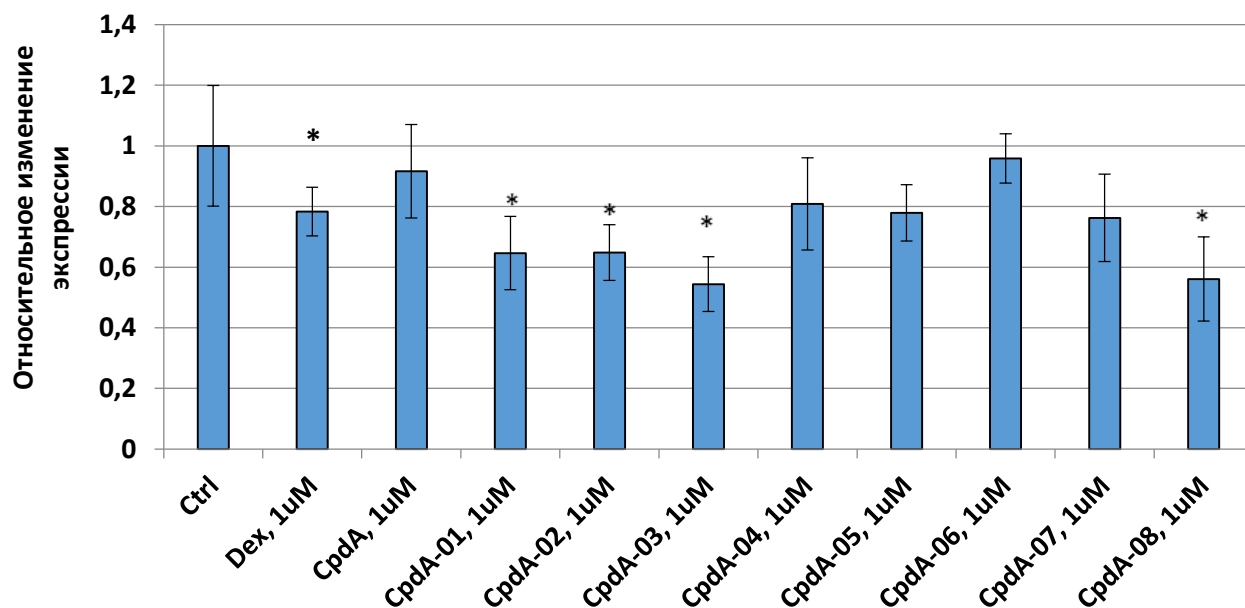


**Рисунок 35** - Влияние химических производных CpдA на экспрессию гена *CCND1* в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или одного из химических производных CpдA. Уровень экспрессии *CCND1* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )



**Влияние химических производных СрдА на экспрессию гена *CCND2* в клетках СЕМ**



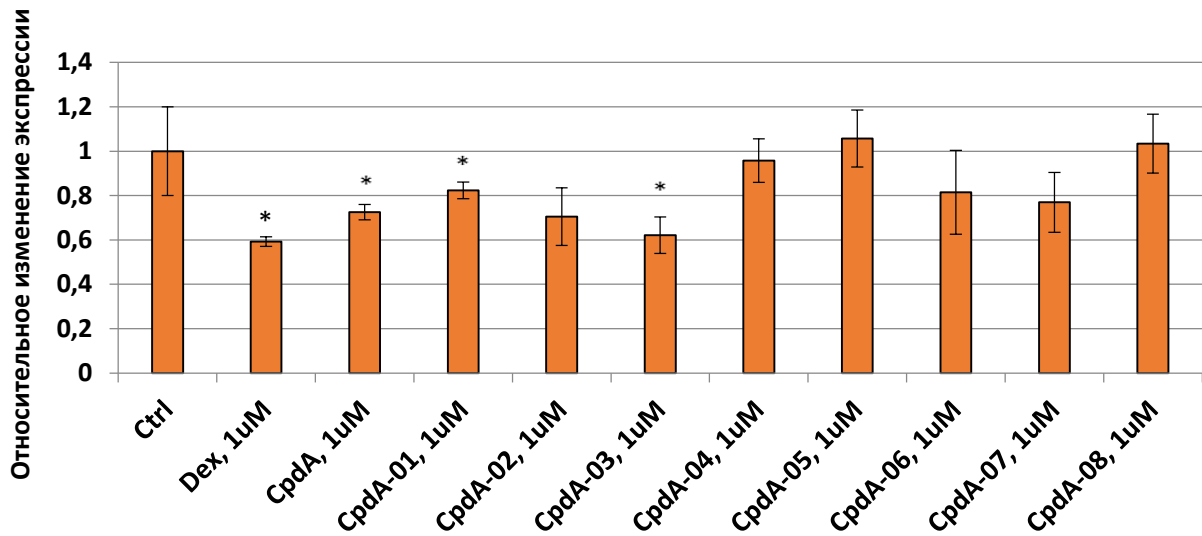
**Рисунок 36** - Влияние химических производных СрдА на экспрессию гена *CCND2* в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, СрдА или одного из химических производных СрдА. Уровень экспрессии *CCND2* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*).

Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

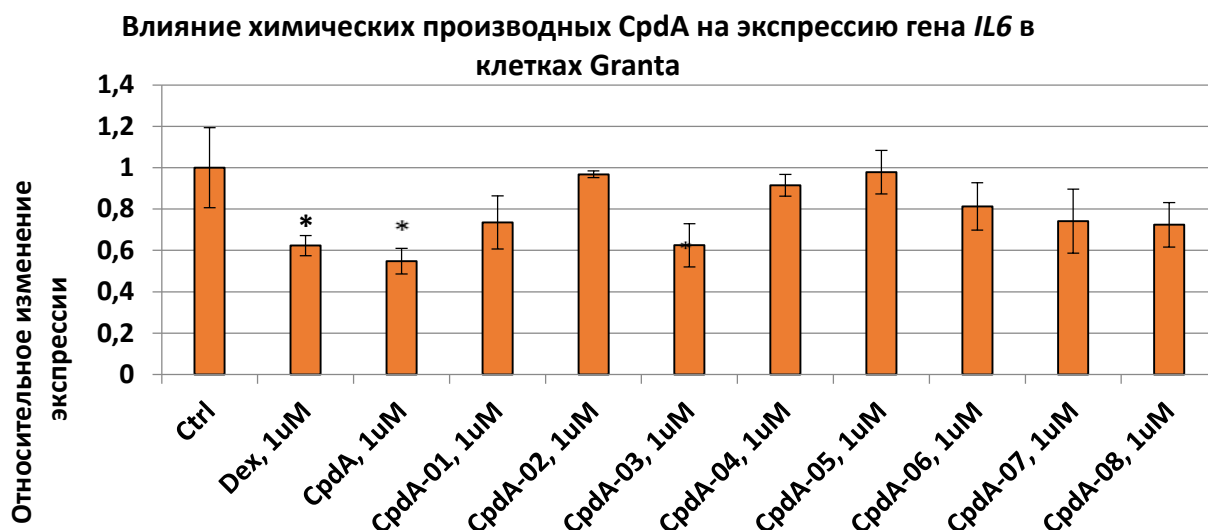
Полученные данные по изменению экспрессии исследуемых генов свидетельствовали о том, что СрдА-03 ингибировал экспрессию данных генов на уровне, сравнимом с Dex.

Как было описано выше, при исследовании запуска транс-репрессии в клетках мантийноклеточной лимфомы Granta использовать циклины D1 и D2 как маркеры данного процесса нецелесообразно, поскольку хромосомная транслокация t(11;14), затрагивающая гены иммуноглобулина H и *CCND1/D2*, является основным патогенетическим звеном развития данного заболевания, и экспрессия *CCND1/D2* высока [44]. В случае клеток Granta в качестве маркеров транс-репрессии нами были использованы гены цитокинов *IL-1* и *IL-6*, также регулирующих развитие воспаления и контролирующих пролиферацию. На рисунках 37-38 представлены результаты изменения экспрессии данных генов после 24-часовой обработки новыми синтезированными аналогами CpдA. По данным исследованиям установлено, что новосинтезированные химические производные CpдA оказывают ингибирующее действие на экспрессию данных генов, сравнимое с действием дексаметазона и CpдA. Так, в частности, на экспрессию гена *IL1* в клетках линии Granta значительно повлияли новые синтезированные соединения CpдA-01,-02,-03,-04. В частности, после обработки клеток CpдA-03 экспрессия *IL-1*, как и *IL6* снизилась 1,6 раз, что было сравнимо с эффектом Dex (рисунки 37, 38).

Влияние химических производных CpдA на экспрессию гена *IL1* в клетках Granta



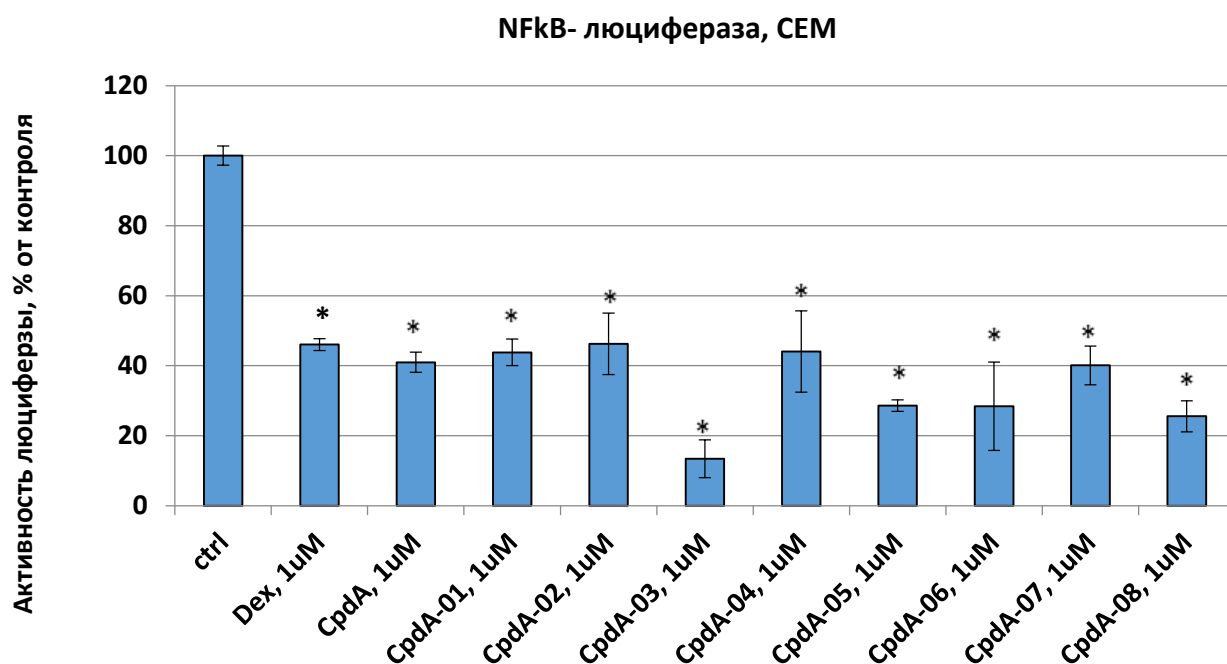
**Рисунок 37** - Влияние химических производных CpдA на экспрессию гена *IL1* в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или одного из химических производных CpдA. Уровень экспрессии *IL1* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )



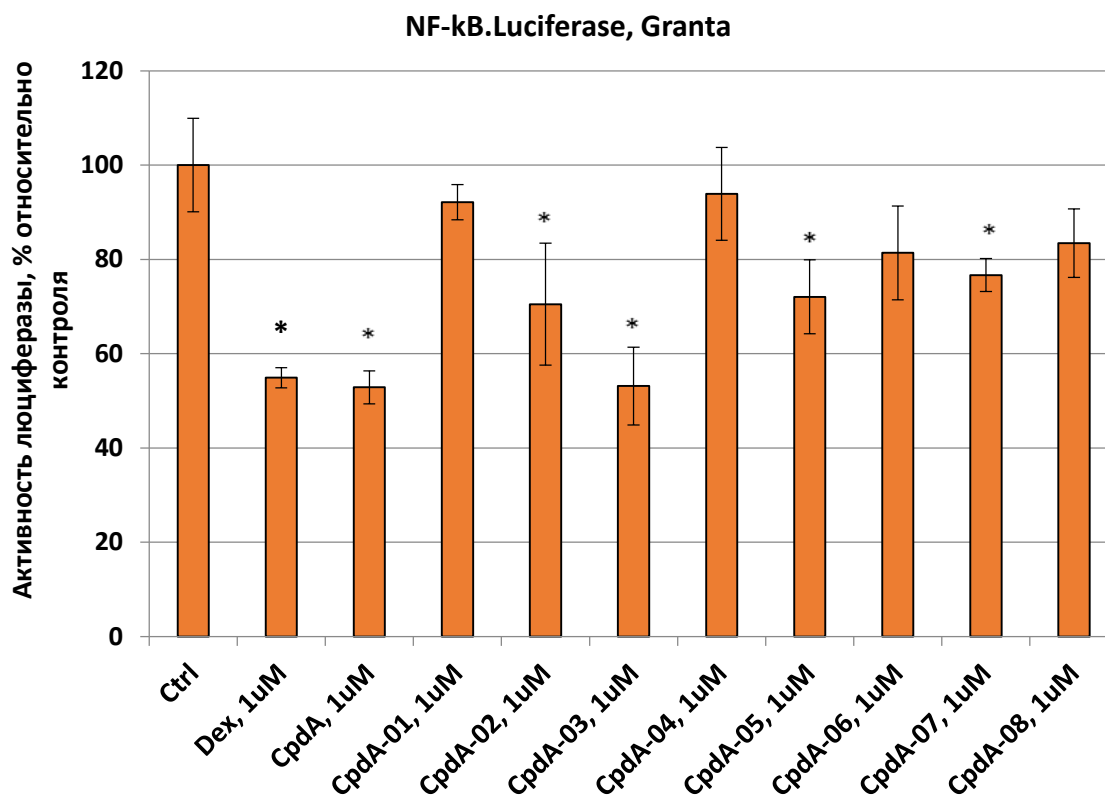
**Рисунок 38** - Влияние химических производных CpдA на экспрессию гена *IL6* в клетках Granta. Клетки культивировали в течение 24 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или одного из химических производных CpдA. Уровень экспрессии *IL6* определяли методом ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

Для определения транс-активационного и транс-репрессорного потенциала новых полученных соединений также был проведен анализ GC-индуцированной активности люциферазы при проведении репортерного анализа. Были использованы лентивирусные вектора, экспрессирующие ген люциферазы светлячка под контролем GRE- или NF-kB-содержащих промоторов. Клетки обеих линий были трансдуцированы данными векторами, были получены сублинии CEM-GRE.Luc, CEM-NF-kB.Luc, Granta-GRE.Luc, Granta-NF-kB.Luc. При исследовании транс-репрессорной активности использовали клетки CEM-NF-kB.Luc и Granta-NF-kB.Luc. Подавление активности NFkB на клетках CEM было выражено эффективнее, чем на клетках Granta (рисунки 39, 40). Наиболее активными соединениями в отношении ингибирования активности данного фактора транскрипции были соединения CpдA-03, -05, -06 и -08. В частности, на клетках CEM было показано, что активность люциферазы снижается более чем на

80% после обработки клеток CpдA- 03, более чем на 70% после обработки CpдA-05, CpдA-06 и CpдA-08. В случае с клетками Granta ингибирующий эффект новых синтезированных производных CpдA был менее выражен, однако несколько соединений оказались весьма эффективными. Так после обработки клеток Granta соединением CpдA-03 активность люциферазы снизилась почти на 50% процентов, что оказалось сравнимо с ингибирующим действием Dex.



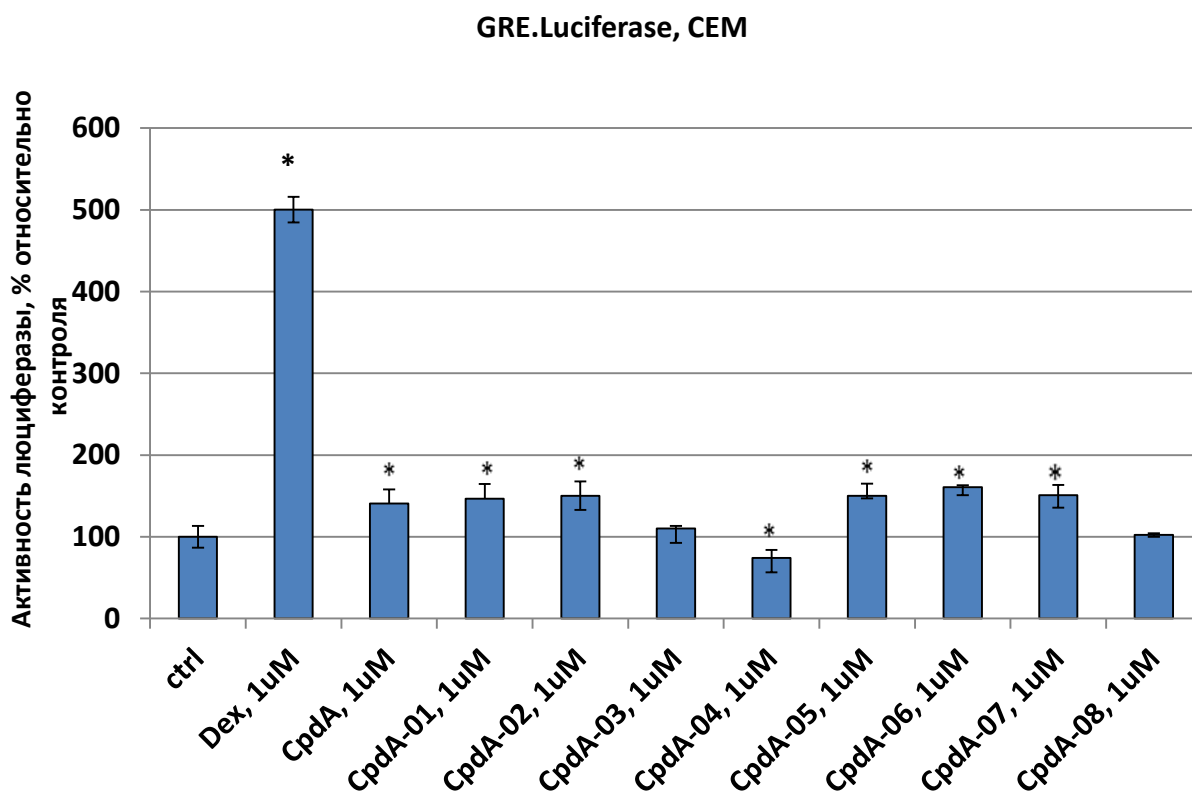
**Рисунок 39** - Влияние химических производных CpдA на активность NF-κB в клетках СЕМ. После трансдукции лентивирусного вектора рGF1-NF-κB клетки СЕМ культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA или одного из химических производных CpдA (01-08) (все соединения в концентрации 1мкМ). 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,  $p < 0.05$



**Рисунок 40** - Влияние химических производных Cpda на активность NF-kB в клетках Granta. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-NF-kB клетки СЕМ культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, Cpda или одного из химических производных 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,  $p < 0.05$ .

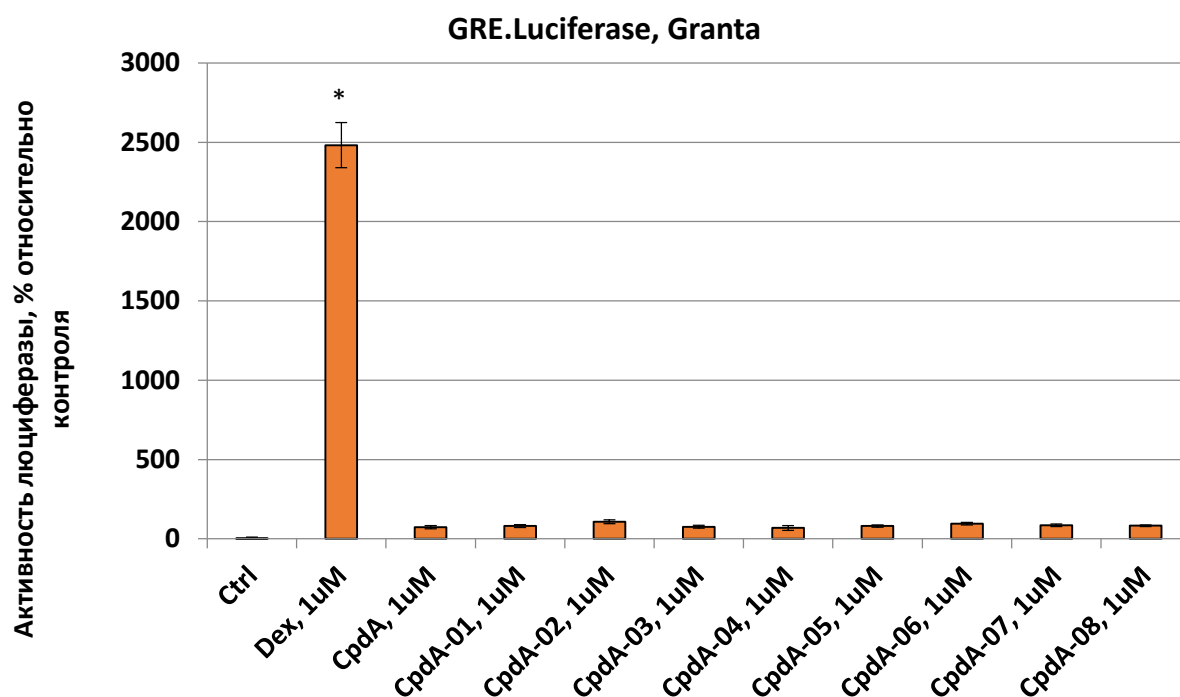
В отношении активности GR было показано, что она также была подавлена в обеих клеточных линиях после обработки их химическими производными Cpda и исходным соединением (рисунки 41, 42). В частности, при обработке клеток СЕМ химическими производными Cpda было показано, что наибольшую степень ингибирования проявляют соединения Cpda-03 и Cpda-04: наблюдали снижение

люциферазной активности в 5 и 6 раз, соответственно. О корректной работе используемой модельной системы судили по увеличению активности люциферазы после обработки клеток Dex: для клеток CEM было зарегистрировано увеличение активности люциферазы в 5 раз, для клеток Granta – в 25 раз.



**Рисунок 41** - Влияние химических производных CpдA на активность GR в клетках CEM. После трансдукции лентивирусного вектора рGF1-GRE клетки CEM культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpдA, CpдA-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,  $p < 0.05$ .

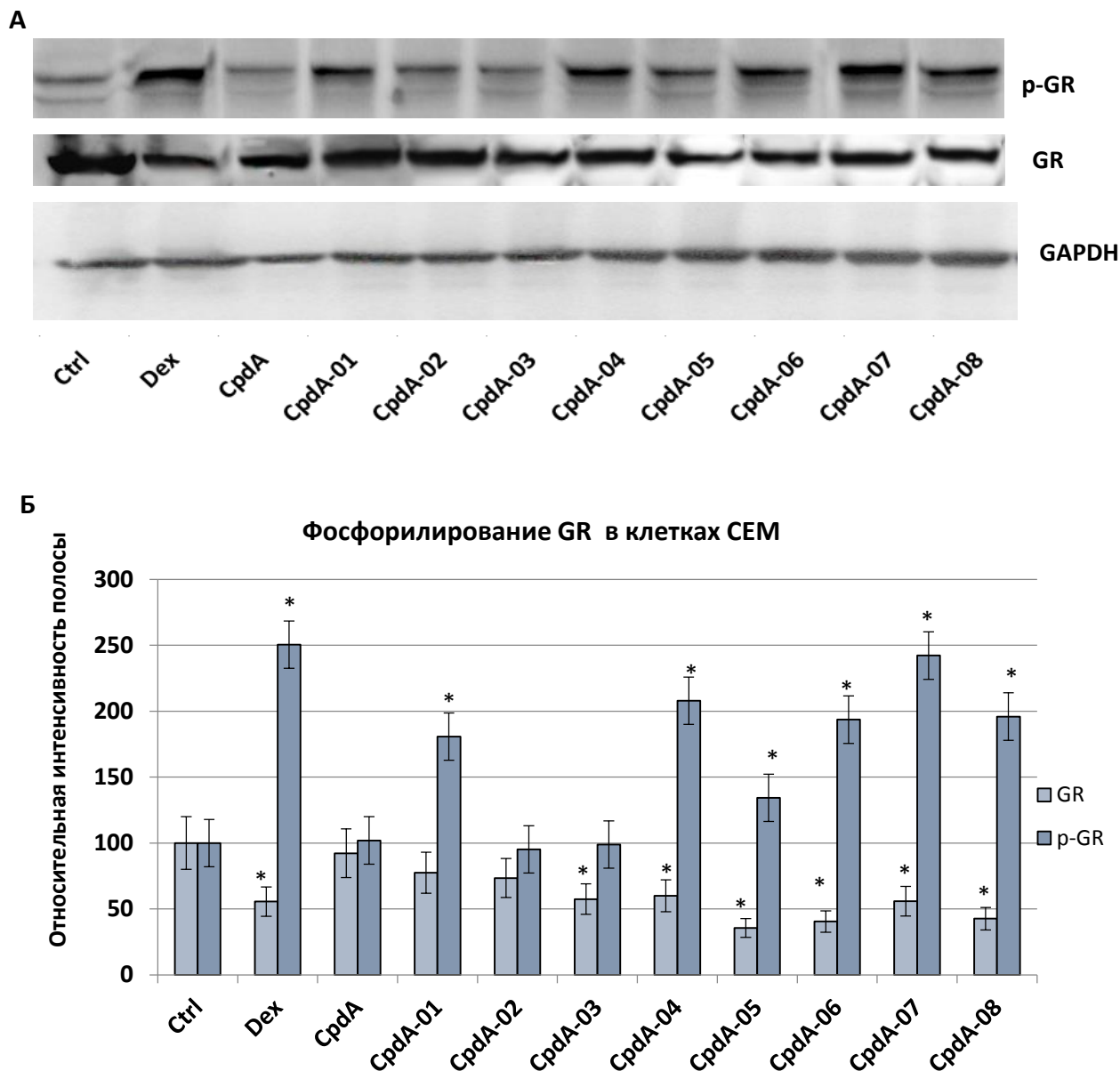


**Рисунок 42** - Влияние химических производных CpdA на активность GR в клетках Granta. После трансдукции лентивирусного вектора pGF1-GRE клетки Granta культивировали в течение 8 ч в присутствии растворителя, Dex, CpdA, CpdA-01-08 (все соединения в концентрации 1µM). Затем определяли активность люциферазы, как описано в разделе «Материалы и методы». Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора.

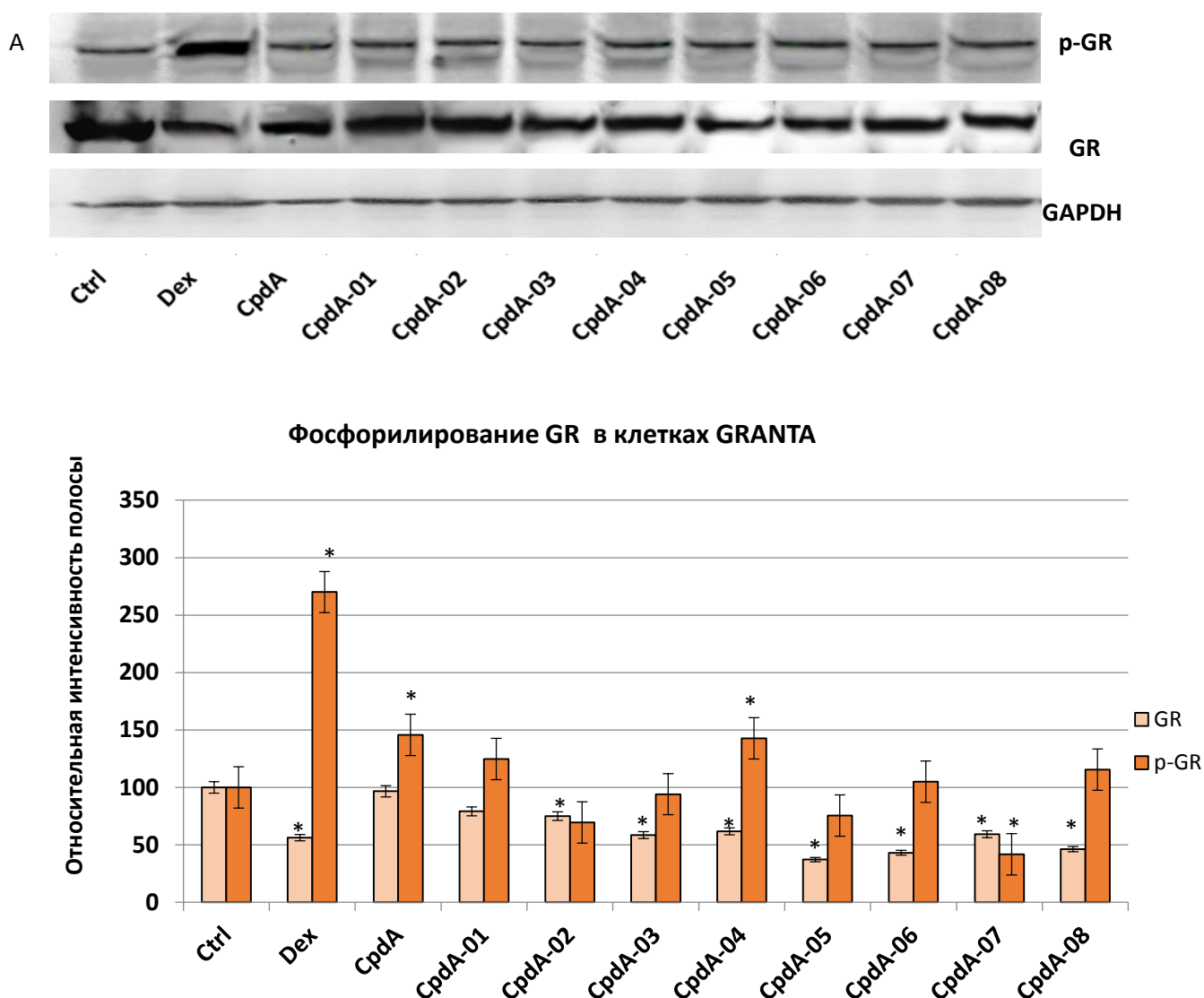
Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0.05$



Еще одним показателем индукции транс-активации является фосфорилирование GR по остатку серина Ser211, которое является основной модификацией GR для обеспечения его транслокации в ядро [89, 103]. На рисунке 43 продемонстрировано фосфорилирование белка GR после 24 часовой обработки клеток СЕМ новыми химическими производными СpdA. Как можно увидеть, ряд химических производных СpdA не запускал фосфорилирование GR, в частности, такой эффект наблюдали для СpdA-02, СpdA-03 и СpdA-05. На клетках линии Granta было продемонстрировано, что новые синтезированные агонисты GR также не запускают фосфорилирование рецептора (рисунок 44), причем на данной клеточной линии этот эффект наблюдали для всех исследуемых соединений. Наименьшее индуцирование фосфорилирования на обеих клеточных линиях продемонстрировал СpdA-03.



**Рисунок 43** – Влияние и химических производных Cpda на уровень фосфорилирования GR в клетках СЕМ. (А) Уровень экспрессии GR и p-GR в клетках СЕМ после обработки химическими производными Cpda, Cpda и Dex анализировали с помощью Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали Вестерн блоттинг с антителами к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от соответствующего контроля,  $p < 0.05$



**Рисунок 44** - Влияние и химических производных Cpda на уровень фосфорилирования GR в клетках Granta. (A) Уровень экспрессии GR и p-GR в клетках Granta после обработки химическими производными Cpda, Cpda и Dex анализировали с помощью Вестерн блоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали Вестерн блоттинг с антителами к GAPDH. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от соответствующего контроля,  $p < 0.05$

### 3.3. Исследование мутагенной активности энантиомеров CpдA, а также новых синтезированных лигандов GR

Мутационный тест на *Salmonella Typhimurium* является классическим тестом бактериальной тест- системы. Представляет собой учет мутаций к проотрофности по гистидину при действии химических соединений или их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены основания или сдвига рамки считывания в геном бактериального организма. В таблицах 3 и 4 представлены данные полученные при испытаниях на штаммах *Salmonella Typhimurium TA98* (таблица 3) чувствительным к мутагенам, индуцирующим типа сдвига рамки считывания и штамма *TA100* (таблица 4), чувствительным к мутагенам, индуцирующим мутации типа замены пар оснований. Каждый эксперимент повторен дважды, активность каждой дозы представлена в виде средних значений (три чашки Петри на дозу в каждом из экспериментов). В качестве отрицательного контроля использовали растворитель (физиологический раствор), в качестве положительного контроля использовали стандартные мутагены. Как показывают результаты экспериментов, в контрольном (фоновом) 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 новых синтезированных аналогов CpдA, а также его энантиомеров показало, что в пределах чувствительности данного метода, исследуемые соединения не вызывает мутации у бактерий в присутствии и/или отсутствии экзогенной метаболической системы, полученной от млекопитающих (фракция S9). Ни одно из новых синтезированных соединений не проявляло мутагенную активность, в отличие от CpдA, который проявлял незначительную

мутагенную активность в высоких дозах, как нами было показано ранее, причем, как надо отметить, только на штамме TA98 [104].

**Таблица 3** - Результаты тестирования мутагенной активности новых синтезированных аналогов CpдА на индикаторном штамме TA98.

Соединение	Доза на чашку	TA98					
		-S9		+S9			
		$M \pm m^a$	$M_i/M_0^b$	МА <sup>c</sup>	$M \pm m$	$M_i/M_0$	МА
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	-
CpдА- 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	-
CpдА- 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	-
CpдА- 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	-
CpдА- 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	-
CpдА- 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	-
CpдА- 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	-
CpdA- 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	-
CpdA- 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	-

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)

**Таблица 4** - Результаты тестирования мутагенной активности новых синтезированных аналогов CpdA на индикаторном штамме TA100

Соединение	Доза на чашку	TA100					
		-S9			+S9		
		$M \pm m^a$	$M_i/M_o^b$	МА <sup>c</sup>	$M \pm m$	$M_i/M_o$	МА
Контроль	0	51,0 ± 13,7	1,0	-	61,6 ± 2,5	1,0	-
Бенз(а)пирен	4,0мкМ	-	-	-	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	-
CpdA	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	-
CpdA(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	-
CpdA(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	-
CpdA- 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	-
CpdA- 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	-
CpdA- 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	-
CpdA- 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	-
CpdA- 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	-
CpdA- 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	-
CpdA- 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	-
CpdA- 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 3.1-3.3 были рассмотрены биологические свойства новосинтезированных энантиомеров CpdA и химических производных CpdA. Для удобства анализа полученные эффекты были сведены в таблицу 5.

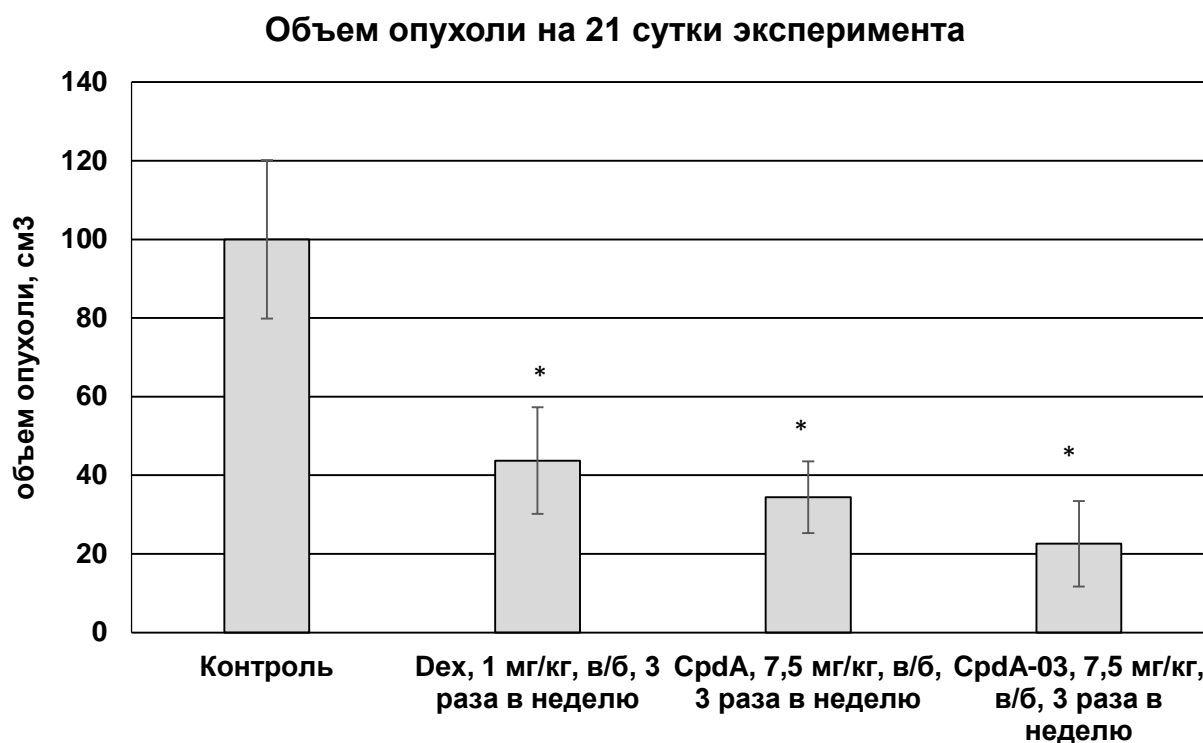
Из приведенной таблицы можно отметить, что наиболее выраженными свойствами SEGRA обладает соединение CpdA-03. В дальнейших исследованиях данного химического производного CpdA была определена его противоопухолевая активность *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы у мышей.





### 3.4. Оценка противоопухолевого эффекта наиболее активного химического производного CpdA, CpdA-03, *in vivo*

Для исследования противоопухолевого эффекта CpdA-03 *in vivo* была использована модель перевиваемой лимфомы P388 у мышей. Данный тип опухоли впервые был индуцирован в 1955 г у индуцирована у овариэктомированных мышей линии DBA<sub>2</sub> путем смазывания кожи метилхолантrenom и сохранен в депозитории Национального Института Рака США. Лимфома P388 представляет собой асцитную жидкость, содержащую клетки 2-х 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. Описано использование данной модельной системы в исследованиях эффективности комбинаций глюкокортикоидов с цитостатическими препаратами [105, 106]. В наших экспериментах мы использовали подкожную трансплантацию опухолевых клеток, поскольку тогда критерием оценки противоопухолевой активности может служить объем подкожного опухолевого узла. Инъекции CpdA-03, CpdA 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 достоверное торможение роста опухолевого узла на 57% у животных, получавших Dex, на 66% – у животных, получавших CpdA и в 78% раза – у животных, получавших CpdA-03 (рисунок 45).



**Рисунок 45** - 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 изменения роста опухоли. На рисунке представлен средний объем аллогraftов на 21 день эксперимента.

Данные представлены как  $M \pm m$ , \* - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0.05$

#### 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Глюкокортикоиды (GC) были одними из первых препаратов, применявшихся при лечении острого лимфобластного лейкоза, и оставались основными компонентами терапии. Их цитотоксический эффект реализуется за счет связывания с глюкокортикоидным рецептором (GR) и его активации. После активации рецептора в цитоплазме, он может гомодимеризоваться, транслоцироваться в ядро и взаимодействовать с респонсивными элементами GC (GRE), что запускает транскрипцию генов (механизм транс-активации). Другим вариантом реализации действия GR является непосредственное белок-белковое взаимодействие мономера рецептора с рядом транскрипционных факторов, таких как пролиферативные белковые комплексы AP-1 или NF-κB. Оба процесса приводят к подавлению продукции про-пролиферативных цитокинов, снижению экспрессии некоторых онкогенов, остановке клеточного цикла и индукции апоптоза. Действие GC индуцирует повышение регуляции GR в той или иной степени практически во всех клетках и тканях организма. Около половины генов, экспрессия которых возрастает при обработке GC, образуют три функциональных кластера, регулирующих про-пролиферативные сигнальные пути MAP-киназ, про-полиферативный и провоспалительный сигнальный каскад NF-κB, а также метаболизм глюкозы [107]. Другая часть GC-регулируемых генов, экспрессия которых падает при воздействии гормона на организм, ткань или клеточную культуру, напротив, связана с подавлением пролиферации, снижением воспаления и другими эффектами, которые в совокупности определяют терапевтическую активность GC.

Разработка лигандов GR, способных проявлять терапевтическое действие на уровне, схожем с глюкокортикоидами стандартного ряда (вызывать запуск транс-репрессии), но в то же время не индуцировать транс-активацию, связанную с развитием побочных эффектов, является актуальной задачей современной молекулярной эндокринологии и онкологии. Одним из первых подобных селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) было

соединение ZK216348, противовоспалительная активность которого была показана на моделях острого воспаления кожных покровов и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита *in vivo* у мышей [108]; а также было продемонстрировано значительное снижение запуска механизмов, приводящих к развитию побочных эффектов. Другим вариантом поиска аналогов GC было изменение и/или оптимизация способа их доставки к специфическим клеткам-мишеням. Так, в терапии GC важную роль играет непосредственное воздействие данных гормонов на Т-лимфоциты и лимфобласты, в то время как механизм их действия на макрофаги и нейтрофилы до конца не изучен. В настоящее время предпринимаются попытки по решению задач оптимизации направленной доставки GC к клеткам-мишеням при их загрузке в микровезикулы, наночастицы и др., что приводит к более контролируемому высвобождению. Направленная доставка GC также способна уменьшить побочные эффекты и сделать терапию более щадящей. [68]

Compound A (2-(4-ацетофенил)-2-хлор-N-метилдиэтиламмоний хлорид или CpdA) является одним из наиболее охарактеризованных SEGRA. Его свойства как SEGRA описаны в публикациях нашей лаборатории и других исследовательских групп [88, 89, 109, 110], показана его высокая, сравнимая с GC, противоопухолевая и противовоспалительная активность, продемонстрирован запуск механизмов, обуславливающих снижение побочных эффектов. В частности, описано отсутствие индукции димеризации GR при воздействии CpdA, показано подавление запуска транс-активации и снижение активность сигнального пути NF-κB. Помимо высокой аффинности к GR CpdA также является лигандом рецептора андрогенов (AR), однако, в отличие от GR, проявляет по отношению к нему антагонистическую активность [100, 111], что способствует его специфическому антипролиферативному действию на клетки рака предстательной железы. Однако CpdA представляет собой хиральную молекулу, в которой присутствует атом углерода, связанный с 4 различными заместителями. Это не влияет на физико-химические свойства молекул оптических изомеров CpdA и других хиральных молекул, однако биологические,

в частности, фармакодинамические и фармакокинетические свойства энантиомеров CpдA могут существенно различаться. Так, ранее был описан препарат талидомид, который является по настоящее время самым ярким примером различий биологических свойств энантиомеров. (R)-оптический изомер энантиомер талидомида обладает седативным действием на организм человека, а (S)-энантиомер обладает тератогенным эффектом, препятствуя нормальному процессу транскрипции ДНК, необходимому для деления клеток и развития зародыша [90], 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 variability метаболизма препарата в организме больного и возможности снижения у пациента терапевтически эффективной дозы препарата [91]. 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 направлением исследований.

Серьезным недостатком CpдA является его низкая химическая стабильность в водных растворах. Эта проблема не затрагивает его эффектов на организм, поскольку описана стабилизация CpдA белками сыворотки крови при внутривенном введении [112], однако является существенной для хранения водных растворов CpдA в качестве потенциального химиопрепарата [84]. В водных растворах CpдA разлагается до фенилазиридина [112], относящегося по классификации МАИР к канцерогенам класса 2Б [92]. Аналоги CpдA с более стабильной структурой в литературе не описаны. В связи с этим, 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.

Таким образом, в данной работе были протестированы два способа модифицировать/получить новые SEGRA: 1) разделение и/или синтез оптических изомеров CpдA; 2) синтез химических производных CpдA. Синтез энантимеров CpдA был проведен совместно с сотрудниками химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, синтез исследуемых в данной работе химических производных CpдA 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, и осуществлен в сотрудничестве с Институтом органической химии им. Н.Д. Зелинского.

Для обеих групп соединений, энантимеров и химических производных CpдA, в первую очередь нами был исследован противоопухолевый эффект *in vitro*, который в настоящее время принято рассматривать как совокупный антипролиферативный и проапоптотический эффекты исследуемых соединений в системе *in vitro*.

Мы наблюдали выраженный антипролиферативный эффект энантимеров и химических производных CpдA, сопоставимый в большинстве случаев с антипролиферативным действием глюкокортикоидов, а также ранее исследованным антипролиферативным эффектом рацемической смеси энантимеров CpдA [87, 88]. Более того, ранее нами была разработана модельная система, представляющей собой две клеточные линии, линию Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза СЕМ и линию В-клеточной мантийноклеточной лимфомы Granta, а также сублинии данных клеток с подавленной экспрессией GR. При исследовании на указанных моделях было показано, что существует четкая корреляция между количеством рецептора в клетке и антипролиферативным эффектом энантимеров CpдA, что свидетельствует о их сходной с дексаметазоном и рацемической смесью аффинности к рецептору. В

отношении химических производных CpdA эта зависимость не являлась столь линейной, поскольку новые соединения обладали различным уровнем сродства к GR. Так, разница между антипролиферативным эффектом на клетки CEM-pGIPZ с нормальной экспрессией GR и CEM-shGR с его подавленной экспрессией при обработке данных клеток химическим производным CpdA-02 не была статистически достоверной, в то время как для CpdA-03 был продемонстрирован гораздо более выраженный антипролиферативный эффект на клетках, экспрессирующим GR на стандартном уровне, чем для клеток с нокдауном GR. Полученные данные косвенно свидетельствуют о том, что CpdA-03 обладает определенным сродством к рецептору. Схожие результаты были получены для CpdA-04 и CpdA-05.

Проапоптотический эффект энантиомеров CpdA на клетки CEM и Granta коррелировал со степенью подавления роста и жизнеспособности данных клеток при инкубации с этими соединениями. Более того, необходимо отметить, что индукция апоптоза как (S)-, так и (R)-энантиомером была сравнима со степенью индукции апоптоза рацематом CpdA и глюкокортикоидом дексаметазоном. Таким образом, можно сделать вывод о том, что антипролиферативный эффект энантиомеров CpdA на клетки CEM и Granta связан с запуском апоптотических механизмов в клетке. Аналогичный вывод был сделан в отношении новосинтезированных химических производных CpdA.

Таким образом, в данной работе были продемонстрированы GR-зависимые противоопухолевые эффекты оптических изомеров и химических производных CpdA *in vitro*, что свидетельствует об их потенциальной эффективности в доклинических исследованиях в качестве препарата для химиотерапии гемобластозов, в частности, лейкозов и лимфом.

Степень реализации биологических эффектов GC на организм человека определяется посредством транс-репрессорного и транс-активационного потенциала GC. При активации GR традиционными GC эти два механизма представлены примерно в равной степени. Ранее были синтезированы новые модифицированные лиганды, которые при активации GR позволили увеличить

долю транс-репрессии. CpдA является одним из новых селективных агонистов GR (SEGRA). Его структура значительно отличается как от большинства ранее изученных антагонистов, так и от его селективных агонистов [99, 100, 113, 114]. Известно, что CpдA способен связываться с лиганд-связывающим доменом GR и конкурировать с дексаметазоном. [100, 115]. CpдA также не фосфорилирует GR по остатку серина Ser-211, тем самым не вызывая димеризации комплекса «лиганд-рецептор», а, следовательно, не запуская механизма транс-активации [115]. Ранее было показано, что данное соединение подавляет связывание GR с ДНК, а также транскрипционную активность рецептора в клетках рака предстательной железы [100]. В наших исследованиях было показано, что фосфорилирование GR по Ser211 также не повышается после обработки клеток СЕМ и Granta как энантиомерами CpдA, что было ожидаемо, учитывая их схожий антипролиферативный эффект, так и химическими производными CpдA. При условии высокой аффинности к рецептору и значительному противоопухолевому потенциалу полученные данные о влиянии химических производных CpдA на фосфорилирование GR являются положительным аргументом в отношении применения данных молекул в химиотерапии лейкозов и лимфом.

Далее в данной работе была проведена оценка эффектов всех исследуемых соединений на функциональную активность рецептора: оценка транс-репрессорного и транс-активационного потенциала энантиомеров и химических производных CpдA, а также анализ непосредственного связывания химических производных CpдA с GR и их влияние на уровень фосфорилирования рецептора.

С помощью люциферазного репортерного анализа был продемонстрирован интегральный эффект всех исследуемых соединений на запуск транс-активации, и было показано, что ни энантиомеры CpдA, ни его химические производные не проявляли способность индуцировать данный механизм. Для подтверждения полученных данных был проведен количественный ПЦР-анализа специфических генов-маркеров транс-активации. В качестве генов-маркеров транс-активации была оценена экспрессия генов, содержащих в своих промоторах GRE и подобранных для подобного рода анализа ранее в исследованиях нашей



лаборатории: иммунофилин *FKBP51*, входящий в состав цитоплазматического комплекса GR [116] и ген *GILZ*, который является первым геном, в котором были обнаружены GRE [41]. Более того, повышенная экспрессия *FKBP51* является причиной резистентности к GC за счет стабилизации цитоплазматического белкового комплекса, препятствовании связывания рецептора с лигандом и удержанию его в цитоплазме [117-119]. Ген *GILZ* является одним из потенциальных медиаторов иммуносупрессивного и противовоспалительного действия GC [120]. Однако известно, что гиперэкспрессия *GILZ* может являться причиной антиапоптотического действия в зависимости от типа ткани [120, 121]. Кроме того, гиперэкспрессия *GILZ* вызывает активацию остеокластов и является причиной развития остеопороза, индуцированного глюкокортикоидами [122]. Таким образом, гиперэкспрессия вышеупомянутых генов может являться причиной развития резистентности (*FKBP51*), либо развития побочных эффектов (*GILZ*) при терапии GC. Нами было показано, что энантиомеры CpdA не вызывал увеличения экспрессии данных генов, а, следовательно, можно сделать предположение о том, что применение чистых энантиомеров уменьшит риск развития побочных эффектов и резистентности. В отношении химических производных CpdA было показано, что ни одно из исследуемых соединений не способно индуцировать экспрессию данных генов на уровне, сравнимом с глюкокортикоидом Dex, однако для соединения CpdA-04 было показано увеличение экспрессии гена FKBP51 в клетках СЕМ после 24 ч обработки. Подобный эффект можно объяснить альтернативным, до настоящего времени не изученным механизмом действия данного соединения.

GR-зависимая транс-репрессия играет ведущую роль в противоопухолевом эффекте GC при использовании ряда модельных систем *in vitro* [100, 123]. Ранее нашей и другими исследовательскими группами было показано, что CpdA обладает способностью запускать GR-опосредованную транс-реессию, воспроизводя противовоспалительное и антипролиферативное действие GC, реализующееся во многом посредством подавления активности транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [88, 89, 100, 115]. В данной работе активность

NF- $\kappa$ B после обработки Dex, CpдA, энантиомерами или химическими производными CpдA исследовали с помощью люциферазного репортерного анализа с использованием NF- $\kappa$ B-зависимого гена люциферазы светлячка. Было показано, что в клетках СЕМ активность люциферазы снижалась после обработки всеми исследуемыми веществами на уровне, сравнимом с Dex или CpдA, а в случае соединения CpдA-03 этот эффект был выражен даже сильнее. На клетках Granta были получены схожие, но менее ярко выраженные результаты. При оценке запуска транс-репрессии с помощью количественной ПЦР генов-маркеров данного процесса в качестве маркеров на клетках СЕМ были использованы NF- $\kappa$ B-зависимые гены циклинов *D1* (*CCND1*) и *D2* (*CCND2*), известных регуляторов клеточного цикла. Ранее было выявлено и идентифицировано три гена семейства циклинов. *CCND1*, локализованный на длинном плече хромосомы 11 (11q13), *CCND2*, локализованный в области 12p13, а также *CCND3*, расположенный на коротком плече хромосомы 6 (6p21). Роль *CCND1* и *CCND2* в злокачественной трансформации клетки доказана [124]. Циклин D1 связывается и активируется специфической циклин-зависимой киназой (CDK4 и CDK6), которая играет ключевую роль в прогрессии клетки во время клеточного цикла. В нормальном состоянии комплекс циклин D1 и CDK4/CDK6 фосфорилирует белок pRb (белковый продукт гена супрессора опухолевого роста RB1). Дерегуляция комплекса циклина с циклин зависимой киназой в результате амплификации или гиперэкспрессии его гена ведет к неконтролируемой пролиферации и началу злокачественной трансформации клетки. При гиперэкспрессии циклина *D1* наступление G1-фазы происходит в ускоренном режиме, что приводит к нестабильности генома. Амплификация гена циклина *D1* и/или его гиперэкспрессия связана с метастазами в отдаленные лимфоузлы, и неблагоприятным прогнозом [87-91]. Однако другими исследовательскими группами эта связь обнаружена не была [125-127]. Некоторые авторы считают, что циклин D1 является потенциальным маркером опухолевой прогрессии [128, 129]. Циклин D2 также образует с циклин-зависимой CDK4 или CDK6 комплекс, который необходим для перехода G1/S в ходе клеточного цикла, и фосфорилирует

белок pRb, как и циклин D1. При исследовании нокаутных мышей по гомологичному гену было показано, что данный ген играет важную роль в пролиферации зародышевых клеток, а также в развитии гранулезоклеточной опухоли яичника. Высокий уровень экспрессии гена *CCND2* наблюдался в овариальных и тестикулярных опухолях [130]. При исследовании запуска транс-репрессии в клетках мантийноклеточной лимфомы Granta использовать циклины D1 и D2 как маркеры данного процесса нецелесообразно, поскольку хромосомная транслокация t(11;14), затрагивающая гены иммуноглобулина H и *CCND1/D2*, является основным патогенетическим звеном развития данного заболевания, и экспрессия *CCND1/D2* высока [44]. В случае клеток Granta в качестве маркеров транс-репрессии нами были использованы гены цитокинов IL-1 и IL-6, также регулирующих дифференцировку и пролиферацию T- и B-клеток и являющихся медиаторами острого и хронического воспаления [131-134]. В ходе исследования было показано, что энантиомеры *CpdA* обладают более высоким транс-репрессорным потенциалом, чем рацемическая смесь. Однако R-энантиомер сильнее подавляет экспрессию циклинов, чем S-энантиомер. В отношении химических производных *CpdA* общая направленная эффектов данных соединений была направлена также в сторону подавления экспрессии данных генов. Выборки наиболее активно подавляющих транскрипцию данных генов соединений различались между клеточными линиями, а также от гена к гену, но необходимо отметить, что *CpdA-03* входил в каждую группу соединений, наиболее эффективных в отношении запуска транс-репрессии.

При исследовании эффектов синтезированных химических производных *CpdA* на жизнеспособность клеток SEM и Granta было продемонстрировано, что у части соединений (*CpdA-03*, -04, -05) антипролиферативный эффект зависит от уровня GR в клетке, следовательно, их действие реализуется посредством связывания с рецептором. 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 (IC<sub>50</sub>), составила 0,18

мкМ, что близко к расчетному (0,21 мкМ) и опубликованному (0,064-0,08 мкМ) значению IC50 для CpдА [102]. Остальные тесты по определению уровня антипролиферативной и проапоптотической активности, а также по степени запуска транс-репрессии и транс-активации, продемонстрировали высокой противоопухолевый потенциал CpдА-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.

Необходимо отметить, что доклинические исследования включают в себя не только оценку эффективности лекарственного средства, но и оценку его безопасности. Существует ряд рекомендаций по исследованию безопасности потенциальных терапевтических средств [135]. В частности, необходим анализ их генотоксичности – способности вызывать повреждения в структуре ДНК. Чем выше уровень повреждения ДНК, тем выше вероятность ошибки и/или недостаточности работы системы репарации ДНК и частота возникающих генетических нарушений. Следовательно, при использовании генотоксичных соединений в химиотерапии есть риск возникновения вторичных опухолей. Поиск новых химиопрепаратов направлен на выявление наиболее эффективных противоопухолевых средств с наименьшей генотоксичностью.

Для алкилирующих соединений повреждение ДНК является основным механизмом противоопухолевого действия, но также и источником цитотоксического поражения нормальных тканей. Для таргетных препаратов с высокоспецифическим спектром действия на опухолевые клетки, сопутствующее неспецифическое повреждение ДНК нежелательно. Ранее в нашей лаборатории было показано, что CpдА в высоких концентрациях (>1 мМ) способен вызывать мутации по типу сдвига рамки считывания у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium* [104]. Эти данные согласуются с теми наблюдениями, что CpдА является нестабильной молекулой, распадающейся в водном растворе до производного азиридина [112], относящегося по классификации МАИР к канцерогенам класса 2Б [92]. В связи с этим мы провели анализ мутагенной активности у энантиомеров и химических производных CpдА. Для этого мы

использовали тест Эймса, позволяющий охарактеризовать способность энантиомеров CpдА вызывать мутации по типу сдвига рамки считывания и замены пар оснований. При анализе мутагенной активности у химических производных CpдА ее обнаружено не было, слабая мутагенная активность была показана для оптических изомеров CpдА при использовании в высоких дозах.

Таким образом, тесты по определению уровня антипролиферативной и проапоптотической активности, а также по анализу эффектов новосинтезированных соединений на функциональную активность GR продемонстрировали высокий противоопухолевый потенциал CpдА-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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе было выполнено исследование биологических свойств новосинтезированных соединений: оптических изомеров и химических производных CpdA, известного селективного агониста глюкокортикоидного рецептора. В отношении энантиомеров CpdA, гипотеза о том, что оптические изомеры данного соединения проявляют различные эффекты в биологических системах, подтверждена не была. Было показано, что антипролиферативные и проапоптотические эффекты оптических изомеров CpdA, а также их влияние на механизмы транс-репрессии и транс-активации сопоставимы с подобными эффектами глюкокортикоидов и исходной рацемической смеси CpdA. Биологические эффекты новосинтезированных химических производных CpdA отличались большим разнообразием. Так, среди 8 впервые тестируемых препаратов для одного соединения, аналога Синефрина CpdA-03, было показано, что он обладает аффинностью к GR, сопоставимой с аффинностью исходного соединения CpdA. Эффекты на рост и жизнеспособность клеток, на индукцию апоптотических, транс-репрессорных и транс-активационных механизмов также были сопоставимы с эффектами GC и CpdA, или были даже более выражены. Другие исследуемые соединения также были эффективны по отношению к подавлению жизнеспособности клеток злокачественных новообразований кроветворной системы и избирательному запуску сигнального пути GR, однако не обладали всем спектром активности Dex, CpdA и CpdA-03. В заключение, противоопухолевая активность CpdA-03 была также продемонстрирована *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей, что позволяет рекомендовать его для испытания в доклинических исследованиях как потенциальный препарат для терапии злокачественных новообразований кроветворной системы.

## ВЫВОДЫ

1. Снижение жизнеспособности клеток СЕМ и Granta, а также индукция апоптоза в данных клетках при обработке энантиомерами СpdА и СpdА-03 статистически значимо отличалось от контроля и было сопоставимо с эффектами Dex и СpdА.

2. Основным механизмом реализации антипролиферативных и проапоптотических эффектов оптических изомеров СpdА и СpdА-03 является активация GR.

3. Энантиомеры СpdА и ряд химических производных СpdА способны избирательно запускать механизм транс-репрессии активированного ГР при подавлении индукции транс-активации; при этом наибольшую активность продемонстрировало соединение СpdА-03.

4. Наибольшей аффинностью к GR из всех новосинтезированных химических производных СpdА обладают соединения СpdА-03 и СpdА-04, причем аффинность СpdА-03 сопоставима с аффинностью СpdА.

5. Все полученные химические производные СpdА не обладают способностью вызывать мутации в бактериальном тесте Эймса. R-энантиомер СpdА проявляет слабую мутагенную активность по типу сдвига рамки считывания.

6. СpdА-03, СpdА-02, СpdА-05, в отличие от Dex, не способны вызывать фосфорилирование GR по остатку Ser211, необходимого для запуска транс-активации в обеих клеточных линиях.

7. Наиболее активное в тестах *in vitro* соединение СpdА-03 проявляет противоопухолевую активность на модели перевиваемой лимфомы Р388 у мышей *in vivo*: наблюдали статистически достоверное торможение роста опухолевого узла на 78% при внутрибрюшинном введении СpdА-03 в дозе 7,5 мг/кг.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

2-АФ - 2-аминофлуорен

ДДТДП - 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазапирен

ДМСО - диметилсульфоксид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

МАИР – международное агентство по изучению рака

МРТ - магнитно-резонансная томография

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ЯМР - ядерный магнитный резонанс

АСТН - адренкортикотропный гормон

АIF - фактор, индуцирующий апоптоз

AP-1-активирующий протеин 1

APAF-1 - фактор, активирующий апоптотические протеазы

AR - андрогеновый рецептор

BCR- рецептор к В-клеточному антигену

cAMP – циклоаденинмонофосфат

CARM1 - ассоциированная с коактиватором аргинин метилтрансфераза 1

CBG- кортикостероид-связывающий глобулин

CBP - CREB-связывающий белок

CCL4- лиганд 4 к хемокину с CC мотивами

CCND2 – циклин D1

CCND1 – циклин D2

CD11b - поверхностный интегрин-рецептор подсемейства  $\beta$ 2-интегринов

CIA - коллаген-индуцированный артрит

c-IAP1 – клеточный ингибитор апоптоза 1

SpdA- Compound A, 2-(4-ацетофенил)-2-хлор-N-метилдиэтиламмоний хлорид

CREB – белок, связывающийся к респонсивными элементами cAMP



CRH - кортиколиберин

DBD- ДНК-связывающий домен

Дех- дексаметазон

DUSP1 - фосфатаза 1 двойной специфичности

EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота

Erk1/2- внеклеточная киназа  $\frac{1}{2}$ , регулируемая сигнальными путями

FcRI - рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов

FKBP51 – белок 51, связывающий FK506

FKBP52 - белок 52, связывающий FK506

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

GC- глюкокортикоид

GFP – зеленый флуоресцентный белок

GILZ – глюкокортикоид-индуцируемая лейциновая «молния»

GR- глюкокортикоидный рецептор

GRE- респонсивные элементы глюкокортикоидного рецептора

GRIP1- белок 1, взаимодействующий с глутаматом

GSK-3 $\beta$  - киназа гликогенсинтазы-3 $\beta$

HPA - гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

HPMA - N-(2-гидроксипропил) метакриламид

11 $\beta$ -HSD1- 11 $\beta$ -гидроксистероид дегидрогеназа типа 1

11 $\beta$ -HSD2- 11 $\beta$ -гидроксистероид дегидрогеназа типа 2

IFN $\gamma$  -интерферон-гамма

IgA- иммуноглобулин А

IgE- иммуноглобулин Е

IgG-иммуноглобулин G

IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13- интерлейкины 1, 4, 5, 6, 10, 13

LBD - лиганд-связывающий домен

LPS - липополисахарид

15-LXA4 - 15-липоксин А4

MHC I, MHC II- главный комплекс гистосовместимости 1,2

MPO - миелопероксидаза

MTT - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий-бромид), «

NCL - нуклеолин

NFAT – ядерный транскрипционный фактор активированных Т-клеток

NFκB- ядерный транскрипционный фактор «каппа-би»

nGRE - отрицательные GRE

NR3C1 - группа С ядерных рецепторов подсемейства 3

NTD - N-концевой транс-активационный домен,

PBS – фосфорно-солевой буфер

PI – пропидий йодид

PSMA - мембранный антиген клеток рака предстательной железы

RAFTK - тирозинкиназа, связанная с фокальной адгезией

miRNAs – микроРНК

shRNA – короткие шпилечные РНК

siRNAs - малые интерферирующие РНК

Rpl27 - рибосомный белок L27

SCFR - рецептор фактора стволовых клеток

SEGRA - селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора

SRC1 - коактиватор стероидных рецепторов 1

TAM - опухоль-ассоциированные макрофаги

TF- транскрипционный фактор

Th1, Th2, Th17 – Т-хелперы 1, 2, 17

TLR (toll like receptors) Toll-подобные рецепторы

TMA - тримеллитовый ангидрид

TNFα- фактор некроза опухоли альфа

TPA - 4-форбол-12-миристан-13-ацетат

Tregs- регуляторные Т- клетки

VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

XIAP – кодируемый X-хромосомой ингибитор апоптоза

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Sacta, M.A. Glucocorticoid Signaling: An Update from a Genomic Perspective / M.A. Sacta, Y. Chinenov, I. Rogatsky // *Annu Rev Physiol.* – 2016. – V. 78. – P. 155-80.
2. Sundahl, N. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds / N. Sundahl, J. Bridelance, C. Libert, K. De Bosscher, I.M. Beck // *Pharmacol Ther.* – 2015. – V. 152. – P. 28-41.
3. Gulliver, L.S. Xenobiotics and the Glucocorticoid Receptor / L.S. Gulliver // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2017. – V. 319. – P. 69-79.
4. Vandewalle, J. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids / J. Vandewalle, A. Luypaert, K. De Bosscher, C. Libert // *Trends Endocrinol Metab.* – 2018. – V. 29. – № 1. – P. 42-54.
5. 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. – № 2. – P. 224-41.
6. Chrousos G.P. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic / G.P. Chrousos, T. Kino // *Sci STKE.* – 2005. – V. 2005. – № 304. – P. pe48.
7. Davies, T.H. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins / T.H. Davies, Y.M. Ning, E.R. Sanchez // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277. – № 7. – P. 4597-600.
8. Harrell, J.M. Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein / J.M. Harrell, P.J. Murphy, Y. Morishima, H. Chen, J.F. Mansfield, M.D. Galigniana, W.B. Pratt // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279. – № 52. – P. 54647-54.
9. 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. Hubner, R.M. Evans // *Mol Cell.* – 2013. – V. 49. – № 1. – P. 158-71.

10. Hudson, W.H. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression / W.H. Hudson, C. Youn, E.A. Ortlund // *Nat Struct Mol Biol.* – 2013. – V. 20. – № 1. – P. 53-8.
11. Kaul, S. Ubc9 is a novel modulator of the induction properties of glucocorticoid receptors / S. Kaul, J.A. Blackford, Jr., S. Cho, S.S. Simons, Jr. // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277. – № 15. – P. 12541-9.
12. Oshima, H. Modulation of transcription factor activity by a distant steroid modulatory element / H. Oshima, S. S. Simons, Jr. // *Mol Endocrinol.* – 1992. – V. 6. – № 3. – P. 416-28.
13. Szapary, D. Modulation of glucocorticoid induction of stably transfected tyrosine aminotransferase gene constructs involves elements up-stream of the glucocorticoid-responsive element / D. Szapary, H. Oshima, S.S. Simons, Jr. // *Endocrinology.* – 1992. – V. 130. – № 6. – P. 3492-502.
14. Ong, K.M. A theoretical framework for gene induction and experimental comparisons / K.M. Ong, J.A. Blackford, Jr., B.L. Kagan, S.S. Simons, Jr., C.C. Chow // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. – № 15. – P. 7107-12.
15. Mercier, L. Dissociation of steroid binding to receptors and steroid induction of biological activity in a glucocorticoid-responsive cell / L. Mercier, E.B. Thompson, S.S. Simons, Jr. // *Endocrinology.* – 1983. – V. 112. – № 2. – P. 601-9.
16. Balsalobre, A. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling / A. Balsalobre, S.A. Brown, L. Marcacci, F. Tronche, C. Kellendonk, H.M. Reichardt, G. Schutz, U. Schibler // *Science.* – 2000. – V. 289. – № 5488. – P. 2344-7.
17. Burioka, N. Dexamethasone influences human clock gene expression in bronchial epithelium and peripheral blood mononuclear cells in vitro / N. Burioka, M. Takata, Y. Okano, S. Ohdo, Y. Fukuoka, M. Miyata, H. Takane, M. Endo, H. Suyama, E. Shimizu // *Chronobiol Int.* – 2005. – V. 22. – № 3. – P. 585-90.
18. Conway-Campbell, B.L. Glucocorticoid ultradian rhythmicity directs cyclical gene pulsing of the clock gene period 1 in rat hippocampus / B.L. Conway-Campbell,

R.A. Sarabdjitsingh, M.A. McKenna, J.R. Pooley, Y.M. Kershaw, O.C. Meijer, E.R. de Kloet, S.L. Lightman // *J Neuroendocrinol.* – 2010. – V. 22. – № 10. – P. 1093-1100.

19. Koyanagi, S. Chronic treatment with prednisolone represses the circadian oscillation of clock gene expression in mouse peripheral tissues / S. Koyanagi, S. Okazawa, Y. Kuramoto, K. Ushijima, H. Shimeno, S. Soeda, H. Okamura, S. Ohdo // *Mol Endocrinol.* – 2006. – V. 20. – № 3. – P. 573-83.

20. Stavreva, D.A. Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription / D.A. Stavreva, M. Wiench, S. John, B.L. Conway-Campbell, M.A. McKenna, J.R. Pooley, T.A. Johnson, T.C. Voss, S.L. Lightman, G.L. Hager // *Nat Cell Biol.* – 2009. – V. 11. – № 9. – P. 1093-102.

21. Sujino, M. Differential entrainment of peripheral clocks in the rat by glucocorticoid and feeding / M. Sujino, K. Furukawa, S. Koinuma, A. Fujioka, M. Nagano, M. Iigo, Y. Shigeyoshi // *Endocrinology.* – 2012. – V. 153. – № 5. – P. 2277-86.

22. Oakley, R.H. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease / R.H. Oakley, J.A. Cidlowski // *J Allergy Clin Immunol.* – 2013. – V. 132. – № 5. – P. 1033-44.

23. Reddy T.E. The hypersensitive glucocorticoid response specifically regulates period 1 and expression of circadian genes / T.E. Reddy, J. Gertz, G.E. Crawford, M.J. Garabedian, R.M. Myers // *Mol Cell Biol.* – 2012. – V. 32. – № 18. – P. 3756-67.

24. McNally, J.G. The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells / J.G. McNally, W.G. Muller, D. Walker, R. Wolford, G.L. Hager // *Science.* – 2000. – V. 287. – № 5456. – P. 1262-5.

25. 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 // *Mol Cell Endocrinol.* – 2013. – V. 380. – № 1-2. – P. 41-54.

26. Duma, D. Sexually dimorphic actions of glucocorticoids provide a link to inflammatory diseases with gender differences in prevalence / D. Duma, J.B. Collins, J.W. Chou, J.A. Cidlowski // *Sci Signal.* – 2010. – V. 3. – № 143. – P. ra74.

27. Quax, R.A. Glucocorticoid sensitivity in health and disease / R.A. Quax, L. Manenschijn, J. W. Koper, J.M. Hazes, S.W. Lamberts, E.F. van Rossum, R.A. Feelders // *Nat Rev Endocrinol.* – 2013. – V. 9. – № 11. – P. 670-86.
28. Iwasaki, A. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses / A. Iwasaki, R. Medzhitov // *Nat Immunol.* – 2004. – V. 5. – № 10. – P. 987-95.
29. Abraham, S.M. Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune responses / S.M. Abraham, A.R. Clark // *Biochem Soc Trans.* – 2006. – V. 34. – № Pt 6. – P. 1018-23.
30. Chinenov, Y. Role of transcriptional coregulator GRIP1 in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids / Y. Chinenov, R. Gupte, J. Dobrovolna, J.R. Flammer, B. Liu, F.E. Michelassi, I. Rogatsky // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – V. 109. – № 29. – P. 11776-81.
31. Oppong, E. Effects of Glucocorticoids in the Immune System / E. Oppong, A.C. Cato // *Adv Exp Med Biol.* – 2015. – V. 872. – P. 217-33.
32. Ashwell, J.D. Glucocorticoids in T cell development and function / J.D. Ashwell, F.W. Lu, M.S. Vacchio // *Annu Rev Immunol.* – 2000. – V. 18. – P. 309-45.
33. Cox, G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes / G. Cox // *J Immunol.* – 1995. – V. 154. – № 9. – P. 4719-25.
34. Ricci, E. Role of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene in dexamethasone-induced inhibition of mouse neutrophil migration via control of annexin A1 expression / E. Ricci, S. Ronchetti, E. Pericolini, E. Gabrielli, L. Cari, M. Gentili, E. Roselletti, G. Migliorati, A. Vecchiarelli, C. Riccardi // *FASEB J.* – 2017. – V. 31. – № 7. – P. 3054-3065.
35. 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 // *J Allergy Clin Immunol.* – 2001. – V. 108. – № 2. – P. 215-20.
36. 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. – № 2. – P. 463-74.

37. Cain, D.W. Immune regulation by glucocorticoids / D.W. Cain, J.A. Cidlowski // *Nat Rev Immunol*. – 2017. – V. 17. – № 4. – P. 233-247.

38. Herold, M.J. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function / M.J. Herold, K.G. McPherson, H.M. Reichardt // *Cell Mol Life Sci*. – 2006. – V. 63. – № 1. – P. 60-72.

39. Planey, S.L. Role of apical caspases and glucocorticoid-regulated genes in glucocorticoid-induced apoptosis of pre-B leukemic cells / S.L. Planey, M.T. Abrams, N.M. Robertson, G. Litwack // *Cancer Res*. – 2003. – V. 63. – № 1. – P. 172-8.

40. Greenstein, S. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies / S. Greenstein, K. Ghias, N.L. Krett, S.T. Rosen // *Clin Cancer Res*. – 2002. – V. 8. – № 6. – P. 1681-94.

41. 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. – № 6. – P. 803-12.

42. Ashwell, J.D. Do glucocorticoids participate in thymocyte development? / J.D. Ashwell, M. S. Vacchio, J. Galon // *Immunol Today*. – 2000. – V. 21. – № 12. – P. 644-6.

43. 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. Schutz, P. H. Krammer // *Blood*. – 2005. – V. 106. – № 2. – P. 617-25.

44. 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.С. Антипова, О.Ю. Баранова, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г.

Якубовская, Е.А. Лесовая. // Клиническая онкогематология. – 2017. – Т. 2. – С. 235-247.

45. Marin, M.C. Apoptosis suppression by bcl-2 is correlated with the regulation of nuclear and cytosolic Ca<sup>2+</sup> / M.C. Marin, A. Fernandez, R.J. Bick, S. Brisbay, L.M. Buja, M. Snuggs, D.J. McConkey, A.C. von Eschenbach, M.J. Keating, T.J. McDonnell // *Oncogene*. – 1996. – V. 12. – № 11. – P. 2259-66.

46. Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system / A. Strasser // *Nat Rev Immunol*. – 2005. – V. 5. – № 3. – P. 189-200.

47. Ferri, K.F. Mitochondria--the suicide organelles / K. F. Ferri, G. Kroemer // *Bioessays*. – 2001. – V. 23. – № 2. – P. 111-5.

48. Chauhan, D. Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells / D. Chauhan, T. Hideshima, S. Rosen, J.C. Reed, S. Kharbanda, K.C. Anderson // *J Biol Chem*. – 2001. – V. 276. – № 27. – P. 24453-6.

49. Amaral, J.D. Role of nuclear steroid receptors in apoptosis / J.D. Amaral, S. Sola, C.J. Steer, C.M. Rodrigues // *Curr Med Chem*. – 2009. – V. 16. – № 29. – P. 3886-902.

50. Mori, N. Modulations of glucocorticoid-induced apoptosis linked to the p53 deletion and to the apoptosis susceptibility gene Rapop1 (Radiation-induced apoptosis 1) / N. Mori, J. Yamate, A.P. Stassen, S. Oka, M. Okumoto, A. Tsubura, T. Akamatsu, S. Sakuma, P. Demant // *Oncogene*. – 1999. – V. 18. – № 29. – P. 4282-5.

51. Rogatsky, I. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms / I. Rogatsky, J.M. Trowbridge, M.J. Garabedian // *Mol Cell Biol*. – 1997. – V. 17. – № 6. – P. 3181-93.

52. Hardin, J. Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death / J. Hardin, S. MacLeod, I. Grigorieva, R. Chang, B. Barlogie, H. Xiao, J. Epstein // *Blood*. – 1994. – V. 84. – № 9. – P. 3063-70.

53. Bosscher, K. de. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation / K. De



Bosscher, M.L. Schmitz, W. Vanden Berghe, S. Plaisance, W. Fiers, G. Haegeman // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – V. 94. – № 25. – P. 13504-9.

54. Chauhan, D. RAFTK/PYK2-dependent and -independent apoptosis in multiple myeloma cells / D. Chauhan, T. Hideshima, P. Pandey, S. Treon, G. Teoh, N. Raje, S. Rosen, N. Krett, H. Husson, S. Avraham, S. Kharbanda, K.C. Anderson // *Oncogene.* – 1999. – V. 18. – № 48. – P. 6733-40.

55. Gardner, J.P. Glucocorticoid modulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in human B lymphoblasts / J.P. Gardner, L. Zhang // *J Physiol.* – 1999. – V. 514 ( Pt 2). – P. 385-96.

56. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – V. 144. – № 5. – P. 646-74.

57. Sinha, R. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery / R. Sinha, G.J. Kim, S. Nie, D.M. Shin // *Mol Cancer Ther.* – 2006. – V. 5. – № 8. – P. 1909-17.

58. Truong, N.P. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery / N.P. Truong, M.R. Whittaker, C.W. Mak, T.P. Davis // *Expert Opin Drug Deliv.* – 2015. – V. 12. – № 1. – P. 129-42.

59. Wicki, A. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications / A. Wicki, D. Witzigmann, V. Balasubramanian, J. Huwyler // *J Control Release.* – 2015. – V. 200. – P. 138-57.

60. Senter, P.D. Potent antibody drug conjugates for cancer therapy / P.D. Senter // *Curr Opin Chem Biol.* – 2009. – V. 13. – № 3. – P. 235-44.

61. Puri, A. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic / A. Puri, K. Loomis, B. Smith, J.H. Lee, A. Yavlovich, E. Heldman, R. Blumenthal // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* – 2009. – V. 26. – № 6. – P. 523-80.

62. Xu, J. RNA replicon delivery via lipid-complexed PRINT protein particles / J. Xu, J.C. Luft, X. Yi, S. Tian, G. Owens, J. Wang, A. Johnson, P. Berglund, J. Smith, M.E. Napier, J.M. DeSimone // *Mol Pharm.* – 2013. – V. 10. – № 9. – P. 3366-74.

63. Sun, T. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy / T. Sun, Y.S. Zhang, B. Pang, D.C. Hyun, M. Yang, Y. Xia // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2014. – V. 53. – № 46. – P. 12320-64.

64. Hoare, T.R. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges / T.R. Hoare, D.S. Kohane // *Polymer*. – 2008. – V. 49. – № 8. – P. 1993-2007.
65. Kim, M. Applications of Cancer Cell-Specific Aptamers in Targeted Delivery of Anticancer Therapeutic Agents / M. Kim, D.M. Kim, K.S. Kim, W. Jung, D.E. Kim // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – № 4.
66. 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 // *J Immunol*. – 2001. – V. 166. – № 2. – P. 1169-77.
67. 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 Res Ther*. – 2009. – V. 11. – № 1. – P. R12.
68. Luhder, F. Novel Drug Delivery Systems Tailored for Improved Administration of Glucocorticoids / F. Luhder, H.M. Reichardt // *Int J Mol Sci*. – 2017. – V. 18. – № 9.
69. Wei, X. Pharmacokinetic and Biodistribution Studies of HPMA Copolymer Conjugates in an Aseptic Implant Loosening Mouse Model / X. Wei, F. Li, G. Zhao, Y.S. Chhonker, C. Averill, J. Galdamez, P.E. Purdue, X. Wang, E.V. Fehringer, K.L. Garvin, S.R. Goldring, Y. Alnouti, D. Wang // *Mol Pharm*. – 2017. – V. 14. – № 5. – P. 1418-1428.
70. Jiang, K. Local release of dexamethasone from macroporous scaffolds accelerates islet transplant engraftment by promotion of anti-inflammatory M2 macrophages / K. Jiang, J.D. Weaver, Y. Li, X. Chen, J. Liang, C.L. Stabler // *Biomaterials*. – 2017. – V. 114. – P. 71-81.
71. Wooldridge, J.E. Corticosteroids in advanced cancer / J.E. Wooldridge, C.M. Anderson, M.C. Perry // *Oncology (Williston Park)*. – 2001. – V. 15. – № 2. – P. 225-34; discussion 234-6.
72. Mao, Y. Milatuzumab-conjugated liposomes as targeted dexamethasone carriers for therapeutic delivery in CD74+ B-cell malignancies / Y. Mao, G.

Triantafillou, E. Hertlein, W. Towns, M. Stefanovski, X. Mo, D. Jarjoura, M. Phelps, G. Marcucci, L.J. Lee, D.M. Goldenberg, R.J. Lee, J.C. Byrd, N. Muthusamy // *Clin Cancer Res.* – 2013. – V. 19. – № 2. – P. 347-56.

73. Kluza, E. Anti-tumor activity of liposomal glucocorticoids: The relevance of liposome-mediated drug delivery, intratumoral localization and systemic activity / E. Kluza, S.Y. Yeo, S. Schmid, D.W. van der Schaft, R.W. Boekhoven, R.M. Schiffelers, G. Storm, G.J. Strijkers, K. Nicolay // *J Control Release.* – 2011. – V. 151. – № 1. – P. 10-7.

74. Xiang, X.D. A combinatorial approach to materials discovery / X.D. Xiang, X. Sun, G. Briceno, Y. Lou, K.A. Wang, H. Chang, W.G. Wallace-Freedman, S.W. Chen, P.G. Schultz // *Science.* – 1995. – V. 268. – № 5218. – P. 1738-40.

75. Lam, K.S. A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity / K.S. Lam, S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, W.M. Kazmierski, R.J. Knapp // *Nature.* – 1991. – V. 354. – № 6348. – P. 82-4.

76. Liu, R. Combinatorial chemistry in drug discovery / R. Liu, X. Li, K.S. Lam // *Curr Opin Chem Biol.* – 2017. – V. 38. – P. 117-126.

77. Xu, Y. Combining 3D-QSAR, docking, molecular dynamics and MM/PBSA methods to predict binding modes for nonsteroidal selective modulator to glucocorticoid receptor / Y. Xu, T. Zhang, M. Chen // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2009. – V. 19. – № 2. – P. 393-6.

78. 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 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – V. 104. – № 49. – P. 19244-9.

79. Vayssiere, B.M. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo / B.M. Vayssiere, S. Dupont, A. Choquart, F. Petit, T. Garcia, C. Marchandeu, H. Gronemeyer, M. Resche-Rigon // *Mol Endocrinol.* – 1997. – V. 11. – № 9. – P. 1245-55.

80. Berger, M. Discovery of new selective glucocorticoid receptor agonist leads / M. Berger, H. Rehwinkel, N. Schmees, H. Schacke, K. Edman, L. Wissler, A. Reichel, S. Jaroch // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2017. – V. 27. – № 3. – P. 437-442.

81. 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 // *Eur J Pharmacol.* – 2017. – V. 803. – P. 179-186.

82. Sundahl, N. Selective glucocorticoid receptor-activating adjuvant therapy in cancer treatments / N. Sundahl, D. Clarisse, M. Bracke, F. Offner, W.V. Berghe, I.M. Beck // *Oncoscience.* – 2016. – V. 3. – № 7-8. – P. 188-202.

83. Jayatilake, G.S. Isolation and structures of avicins D and G: in vitro tumor-inhibitory saponins derived from *Acacia victoriae* / G.S. Jayatilake, D.R. Freeberg, Z. Liu, S.L. Richeimer, M.E. Blake Nieto, D.T. Bailey, V. Haridas, J.U. Gutterman // *J Nat Prod.* – 2003. – V. 66. – № 6. – P. 779-83.

84. Ayroldi, E. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective / E. Ayroldi, A. Macchiarulo, C. Riccardi // *FASEB J.* – 2014. – V. 28. – № 12. – P. 5055-70.

85. Coghlan, M.J. The pursuit of differentiated ligands for the glucocorticoid receptor / M.J. Coghlan, S.W. Elmore, P.R. Kym, M.E. Kort // *Curr Top Med Chem.* – 2003. – V. 3. – № 14. – P. 1617-35.

86. van Lierop, M.J. Org 214007-0: a novel non-steroidal selective glucocorticoid receptor modulator with full anti-inflammatory properties and improved therapeutic index / M.J. van Lierop, W. Alkema, A.J. Laskewitz, R. Dijkema, H.M. van der Maaden, M.J. Smit, R. Plate, P.G. Conti, C.G. Jans, C.M. Timmers, C.A. van Boeckel, S.J. Lusher, R. McGuire, R.C. van Schaik, J. de Vlieg, R.L. Smeets, C.L. Hofstra, A.M. Boots, M. van Duin, B.A. Ingelse, W.G. Schoonen, A. Grefhorst, T.H. van Dijk, F. Kuipers, W.H. Dokter // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – № 11. – P. e48385.

87. 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 (Mosc)*. – 2011. – V. 76. – № 11. – P. 1242-52.

88. 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. – № 1. – P. 133-44.

89. 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. – № 31. – P. 30730-44.

90. Hoglund, P. A double-blind study of the sedative effects of the thalidomide enantiomers in humans / P. Hoglund, T. Eriksson, S. Bjorkman // *J Pharmacokinet Biopharm*. – 1998. – V. 26. – № 4. – P. 363-83.

91. Wainer, I.W. The therapeutic promise of single enantiomers: introduction / I.W. Wainer // *Hum Psychopharmacol*. – 2001. – V. 16. – № S2. – P. S73-S77.

92. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some aziridines, N-, S- & O-mustards and selenium / // *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man*. – 1975. – V. 9. – P. 1-268.

93. ISO 10993-3:2014 - Biological evaluation of medical devices -- Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. 2014.

94. Maron, D.M. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test / D.M. Maron, B.N. Ames // *Mutat Res*. – 1983. – V. 113. – № 3-4. – P. 173-215.

95. Белицкий, Г.А. Совол как индуктор микросомных ферментов, активирующих проканцерогены / Г.А. Белицкий, Л.М. Фонштейн, В.В. Худoley // *Экспериментальная онкология*. – 1987. – Т. 9. – № 3. – С. 20.

96. Абилев, С.К. О мутагенном действии производного тетрагидродиазопирена на бактерии / С.К. Абилев, Л.М. Фонштейн, Г.И. Мигачев, А.М. Андриевский, А.М. // Генетика. – 1979. – Т. 15. – № 5. – С. 807-811.

97. Мигачев, Г.И.. Синтез производных 5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дiazопирена / Г.И. Мигачев, А.М. Андриевский, Н.С. Докунихин // Химия гетероциклических соединений. – 1975. – Т. 12. – С. 1699-1700.

98. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – V. 227. – № 5259. – P. 680-5.

99. 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. – 2003. – V. 25. – № 6. – P. 612-9.

100. Yemelyanov, A. Novel steroid receptor phyto-modulator compound a inhibits growth and survival of prostate cancer cells / A. Yemelyanov, J. Czwoonog, L. Gera, S. Joshi, R.T. Chatterton, Jr., I. Budunova // Cancer Res. – 2008. – V. 68. – № 12. – P. 4763-73.

101. 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. – № 7. – P. 463-6.

102. <http://www.bertin-bioreagent.com/pr51600/cpda>. –

103. Chen, W. Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression / W. Chen, T. Dang, R.D. Blind, Z. Wang, C.N. Civasotto, A.B. Hittelman, I. Rogatsky, S.K. Logan, M.J. Garabedian // Mol Endocrinol. – 2008. – V. 22. – № 8. – P. 1754-66.

104. Лесовая, Е.А. Избирательная активация транс-репрессорной функции глюкокортикоидного рецептора в клетках гемобластозов: дис. канд. биол. наук: 14.01.12 / Лесовая Екатерина Андреевна. – М.: 2011. – 141 с.

105. Robak, T. Dexamethasone does not enhance antileukemic activity of cladribine in mice with leukemias L1210 and P388 / T. Robak, A. Szmigielska // *Neoplasma*. – 2000. – V. 47. – № 3. – P. 168-71.

106. Trafalis, D.T. Octreotide neutralizes dexamethasone antitumor actions on P388 murine lymphocytic leukemia in vivo / D.T. Trafalis, E. Chrysogelou, P. Dalezis, G. Geromichalos, M. Kontos, C. Andreadis, N. Ziras, M. Koutsilieris, A.E. Athanassiou, G.A. Pangalis, A. Papageorgiou // *J BUON*. – 2005. – V. 10. – № 1. – P. 89-94.

107. Inaba, H. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia / H. Inaba, C.-H. Pui // *The Lancet Oncology*. – 2010. – V. 11. – № 11. – P. 1096-1106.

108. Schacke, H. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects / H. Schacke, A. Schottelius, W.D. Docke, P. Strehlke, S. Jaroch, N. Schmees, H. Rehwinkel, H. Hennekes, K. Asadullah // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. – V. 101. – № 1. – P. 227-32.

109. Clarisse, D. Effect of combining glucocorticoids with Compound A on glucocorticoid receptor responsiveness in lymphoid malignancies / D. Clarisse, K. Van Wesemael, J. Tavernier, F. Offner, I.M. Beck, K. De Bosscher // *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – № 5. – P. e0197000.

110. Zhidkova, E.M. Comparative Analysis of Biological Effects of Selective Activator of the Glucocorticoid Receptor Cpda on Different Subtypes of Breast Cancer Cell Lines / E.M. Zhidkova, K.A. Kuzin, L.R. Tilova, A.V. Savinkova, O.I. Borisova, M.D. Lavrova, V.P. Maximova, K.I. Kirsanov, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *Siberian journal of oncology*. – 2017. – V. 16. – № 6. – P. 41-46.

111. 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*. – 2012. – V. 11. – № 2. – P. 395-406.

112. 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 // *Biochem Pharmacol.* – 1997. – V. 53. – № 2. – P. 189-97.

113. Schacke, H. Dissociated glucocorticoid receptor ligands / H. Schacke, H. Rehwinkel // *Curr Opin Investig Drugs.* – 2004. – V. 5. – № 5. – P. 524-8.

114. Honer, C. Glucocorticoid receptor antagonism by cyproterone acetate and RU486 / C. Honer, K. Nam, C. Fink, P. Marshall, G. Ksander, R.E. Chatelain, W. Cornell, R. Steele, R. Schweitzer, C. Schumacher // *Mol Pharmacol.* – 2003. – V. 63. – № 5. – P. 1012-20.

115. Bosscher, K de. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators / K. De Bosscher, G. Haegeman, D. Elewaut // *Curr Opin Pharmacol.* – 2010. – V. 10. – № 4. – P. 497-504.

116. Li, L. The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance / L. Li, Z. Lou, L. Wang // *Br J Cancer.* – 2011. – V. 104. – № 1. – P. 19-23.

117. 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. – № 11. – P. 4107-13.

118. 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 // *J Clin Endocrinol Metab.* – 1999. – V. 84. – № 2. – P. 663-9.

119. Maiaru, M. The stress regulator FKBP51: a novel and promising druggable target for the treatment of persistent pain states across sexes / M. Maiaru, O.B. Morgan, T. Mao, M. Breitsamer, H. Bamber, M. Pohlmann, M.V. Schmidt, G. Winter, F. Hausch, S.M. Geranton // *Pain.* – 2018. – V. 159. – № 7. – P. 1224-1234.

120. Ayroldi, E. A dual role for glucocorticoid-induced leucine zipper in glucocorticoid function: tumor growth promotion or suppression? / E. Ayroldi, L. Cannarile, D.V. Delfino, C. Riccardi // *Cell Death Dis.* – 2018. – V. 9. – № 5. – P. 463.

121. Ayroldi, E. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action / E. Ayroldi, C. Riccardi // *FASEB J.* – 2009. – V. 23. – № 11. – P. 3649-58.



122. 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.L. Kristo, O.K. Olstad, T. Ueland, R. Jemtland // *Endocr Rev.* – 2009. – V. 30. – № 7. – P. 932.

123. Chebotaev, D. The mechanisms of tumor suppressor effect of glucocorticoid receptor in skin / D. Chebotaev, A. Yemelyanov, I. Budunova // *Mol Carcinog.* – 2007. – V. 46. – № 8. – P. 732-40.

124. Hermoso, M.A. Putting the brake on inflammatory responses: the role of glucocorticoids / M.A. Hermoso, J.A. Cidlowski // *IUBMB Life.* – 2003. – V. 55. – № 9. – P. 497-504.

125. Morshed, K. An immunohistochemical study of cyclin D1 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma / K. Morshed, D. Skomra, E. Korobowicz, M. Szymanski, M. Polz-Dacewicz, W. Golabek // *Acta Otolaryngol.* – 2007. – V. 127. – № 7. – P. 760-9.

126. Vielba, R. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx / R. Vielba, J. Bilbao, A. Ispizua, I. Zabalza, J. Alfaro, R. Rezola, E. Moreno, J. Elorriaga, I. Alonso, A. Baroja, C. de la Hoz // *Laryngoscope.* – 2003. – V. 113. – № 1. – P. 167-72.

127. Yu, Z. Cyclin d1 is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma / Z. Yu, P.M. Weinberger, B.G. Haffty, C. Sasaki, C. Zerillo, J. Joe, D. Kowalski, J. Dziura, R.L. Camp, D.L. Rimm, A. Psyrrri // *Clin Cancer Res.* – 2005. – V. 11. – № 3. – P. 1160-6.

128. Krecicki, T. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue / T. Krecicki, R. Smigiel, M. Fraczek, M. Kowalczyk, M.M. Sasiadek // *J Laryngol Otol.* – 2004. – V. 118. – № 9. – P. 676-80.

129. Segas, J.V. Cyclin D1 protein tissue detection in laryngeal cancer / J.V. Segas, A.C. Lazaris, T.P. Nikolopoulos, N.G. Kavantzias, I.E. Lendari, A.M.

Tzagkaroulakis, E.S. Patsouris, E.A. Ferekidis // *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* – 2005. – V. 67. – № 6. – P. 319-25.

130. Robker, R.L. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1 / R.L. Robker, J.S. Richards // *Mol Endocrinol.* – 1998. – V. 12. – № 7. – P. 924-40.

131. Oppenheim, J.J. Antigen nonspecific lymphokines: an overview / J.J. Oppenheim // *Methods Enzymol.* – 1985. – V. 116. – P. 357-72.

132. Braquet, P. Role of cytokines and platelet-activating factor in microvascular immune injury / P. Braquet, D. Hosford, M. Braquet, R. Bourgain, F. Bussolino // *Int Arch Allergy Appl Immunol.* – 1989. – V. 88. – № 1-2. – P. 88-100.

133. Kita, E. Contribution of interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of Ityr mice / E. Kita, M. Emoto, D. Oku, F. Nishikawa, A. Hamuro, N. Kamikaidou, S. Kashiba // *J Leukoc Biol.* – 1992. – V. 51. – № 3. – P. 244-50.

134. Tripathi, P.A. NF- $\kappa$ B transcription factor: a key player in the generation of immune response / P.A. Tripathi, A. Aggarwal // *Current Science.* – 2006. – V. 90. – № 4. – P. 519-531.

135. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / Под ред. Миронова А. Н.: Гриф и К., 2012. – 944 с.