

*На правах рукописи*

**ТИЛОВА ЛЕЙЛА РАСУЛОВНА**

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

14.01.12 – онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

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

**Научные руководители:**

кандидат биологических наук  
доктор химических наук

**Лесовая Екатерина Андреевна**  
**Ширинян Валерик Зармирович**

**Официальные оппоненты:**

**Сергеева Наталья Сергеевна**, доктор биологических наук, профессор, руководитель отделения прогноза эффективности консервативного лечения московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Григорьева Эльвира Витальевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, исполняющий обязанности руководителя лаборатории гликобиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится «4» апреля 2019 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478 г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

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

Автореферат разослан «.....» .....2019 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

**Кадагидзе Заира Григорьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Глюкокортикоиды (ГС) регулируют основные физиологические процессы в организме, включая гомеостаз, эмбриональное и постэмбриональное развитие, а также ответ организма на стресс. Несмотря на то, что при длительном приеме ГС развивается большое количество побочных эффектов, ГС 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 ГС осуществляется посредством связывания лиганда с глюкокортикоидным рецептором (GR). 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. Противовоспалительные эффекты ГС в основном обусловлены ДНК-независимым белок-белковым взаимодействием GR с различными TF, определяемым как механизм транс-репрессии. Развитие большей части ГС-индуцируемых побочных эффектов обусловлено ДНК-зависимым механизмом транс-активации. Схема действия GR путем прямых ДНК-белок и белок-белок взаимодействий является довольно упрощенной, тем не менее, ряд многих побочных эффектов действительно реализуется за счет индукции транс-активации, в частности, гипергликемия и атрофические явления в кожной и мышечной ткани. Тем не менее, описаны лиганды GR, которые могут избирательно индуцировать транс-реессию без интенсивного 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.

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

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

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

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

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

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

### **Методология и методы исследования**

В работе использовали комплексный анализ с применением современных физико-химических и молекулярно биологических методов исследования, в частности, эффекты анализируемых SEGRA *in vitro* оценивали с использованием методов работы со суспензионными культурами опухолевых клеток, проточной цитофлуориметрии, иммунохимических методов, полимеразной цепной реакции в реальном времени, репортерного анализа на трансгенных и трансдуцированных линиях опухолевых клеток, оценку аффинности соединений к GR проводили с использованием метода поляризации флуоресценции, противоопухолевый эффект анализируемых соединений *in vivo* изучали с использованием перевиваемой лимфомы P388 мышей. Мутагенность соединений оценивалась с помощью теста Эймса. При определении стабильности соединений использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию.

Достоверность результатов подтверждена адекватным выбором методов и использованием современных методов математической статистики

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

- антипролиферативные и проапоптотические эффекты оптических изомеров CpdA и ряда 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 CpdA-03 проявляет противоопухолевую активность на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей *in vivo*.

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

В ходе выполнения диссертационной работы изучены эффекты ряда соединений SEGRA, при получении которых были использованы новые стратегии синтеза и были оптимизированы методы выделения и очистки промежуточных и целевых соединений. Были изучены свойства десяти новых соединений класса SEGRA: двух энантиомеров CpdA и восьми химических производных CpdA. Скрининг биологических свойств аналогов CpdA показал, что их антипролиферативное и проапоптотическое действие, эффекты на индукцию транс-активации и транс-репрессии, а также аффинность к GR сопоставимы с эффектами CpdA и Dex. Полученные данные расширяют наши представления о функционировании GR при его активации нестероидными лигандами

без запуска димеризации рецептора. Полученные результаты являются теоретической основой развития персонализированного подхода при проведении GC-терапии в комплексе с химиопрепаратами. Для наиболее активного производного CpдA-03 был продемонстрирован противоопухолевый эффект *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют о том, что данное соединение является перспективным для дальнейшего проведения доклинических испытаний как потенциальный препарат для терапии злокачественных новообразований кроветворной системы.

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

1. Новосинтезированные R- и S-энантиомеры хирального соединения CpдA, являются селективными агонистами GR, действующими преимущественно по механизму активации трансрепрессии, причем их противоопухолевые 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 CpдA является GR-зависимая трансрепрессия транскрипционных факторов.

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

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

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

#### **Личный вклад автора**

Автор лично провела анализ научной литературы по теме диссертации, принимала непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования,

анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология, и областям исследования 2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» и 6. «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

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

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами молекулярно-биологических исследований, полученные автором новые данные согласуются с отдельными результатами опубликованных исследований по изучению биологических свойств SEGRA. 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 4 статьи в отечественных журналах из списка ВАК. Результаты исследования были представлены и обсуждены на конференциях: Всероссийская конференция с «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» (20-21 марта 2014 г., Москва), Всероссийская 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 2015г., Москва), II Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (22- 24 июня 2016г., Санкт- Петербург), II всероссийская конференция по молекулярной онкологии «Молекулярная онкология», (6-8 декабря 2016г., Москва), III Петербургский онкологический форум «Белые ночи», Санкт-Петербург, Россия, (23–24 июня, 2017 г.). Апробация диссертации состоялась 23 октября 2018 года на

межлабораторной научной конференции с участием лаборатории канцерогенных веществ, лаборатории механизмов химического канцерогенеза, группы профилактики канцерогенных воздействий и природных канцерогенов отдела химического канцерогенеза, лаборатории механизмов канцерогенеза, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток, лаборатории молекулярной эндокринологии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в 20 опубликованных научных работах, из них 4 статьи в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

### Объем и структура диссертации

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 154 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием использованных материалов и методов, глав «Результаты» и «Обсуждение результатов», заключения и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 135 отечественных и зарубежных источников, и содержит 45 иллюстраций и 5 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Согласно терминологии, используемой в современной литературе, противоопухолевое действие препарата *in vitro* подразумевает его способность подавлять пролиферацию и индуцировать апоптоз в клетках линий, полученных из опухолей интересующей нозологической формы злокачественного новообразования. Нами были исследованы данные эффекты для двух энантиомеров CpdA и восьми новосинтезированных производных данного соединения (рисунок 1).

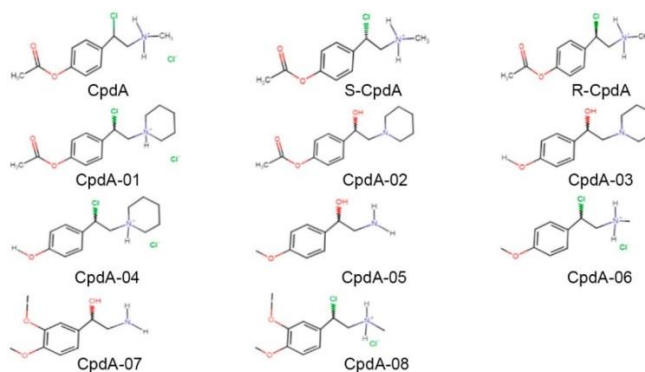
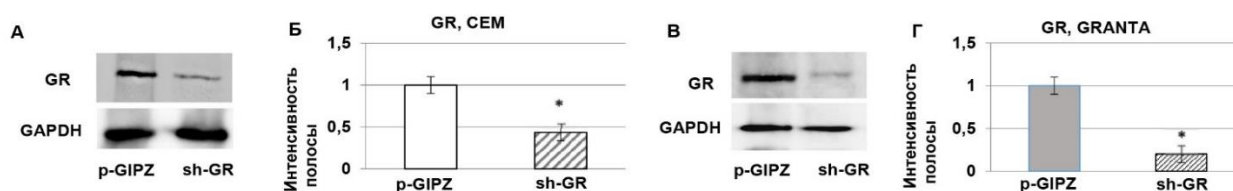


Рисунок 1 - Структуры энантиомеров CpdA и его химических производных.



В качестве модельной системы в работе были использованы клетки острого лимфобластного лейкоза СЕМ и мантийноклеточной лимфомы Granta. Также с помощью лентивирусных конструкций, экспрессирующих короткую шпилечную РНК к гену GR, были получены линии клеток СЕМ и Granta с подавленной экспрессией GR (СЕМ-shGR, Granta-shGR) и контрольные субклоны СЕМ-pGIPZ и Granta-pGIPZ. Для определения уровня экспрессии GR был проведен Вестерн блоттинг тотальных клеточных лизатов клеток СЕМ и Granta. Уровень экспрессии GR в специально полученных трансгенных клонах клеток СЕМ и Granta, содержащих в геноме и экспрессирующих короткую шпилечную РНК к GR (shRNA-GR), был заметно снижен: подавление экспрессии составило 57% от контроля в случае клеток СЕМ и на 70% в клетках Granta (рисунок 2).



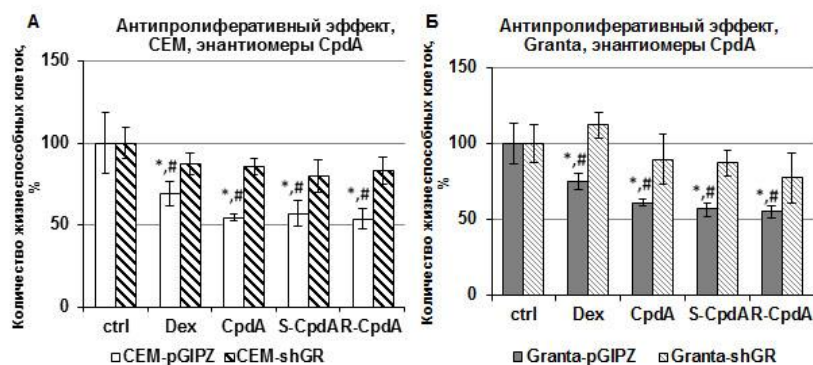
**Рисунок 2** - Экспрессия GR в клетках линии СЕМ-pGIPZ и СЕМ-shGR (A), Granta-pGIPZ и Granta-shGR (B). Уровень экспрессии GR в клетках СЕМ и Granta проводили с помощью Вестерн блоттинга. (Б, Г) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. Данные представлены как  $M \pm SD$  ( $n=3$ ), \* - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0.05$  (применимо ко всем рисункам)

### **Определение антипролиферативного и проапоптотического эффектов энантиомеров *CpdA***

Определение антипролиферативного эффекта проводили после 24-х часовой инкубации с растворителем, Dex, *CpdA* или энантиомерами *CpdA* (R, S) с помощью прямого подсчета клеток. В предварительных экспериментах были определены IC50 исследуемых соединений, которые оказались близки к IC50 Dex и *CpdA* и лежали в диапазоне концентраций 8-11 мкМ. В качестве рабочих концентраций энантиомеров *CpdA* были выбраны концентрации в 1 мкМ (IC20), аналогично Dex и рацемату *CpdA*.

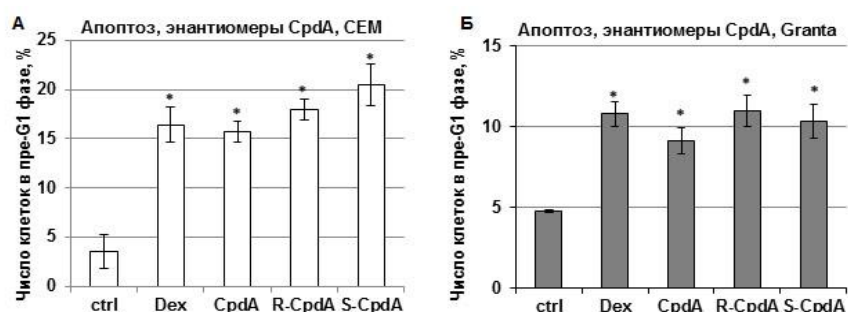
24 часовая обработка R- и S-энантиомерами *CpdA* клеток СЕМ-pGIPZ, трансдуцированных контрольным вектором и обладающих нормальным уровнем экспрессии GR, привела к гибели 56 % и 43% клеток, что было близко к эффекту рацемата *CpdA* (рисунок 3А). При этом наблюдалась тенденция к превышению действия Dex. При анализе эффектов как энантиомеров, так и рацемата *CpdA* и Dex на клетки

СЕМ-shGR с подавленной экспрессией рецептора статистически значимых эффектов при действии всех вышеупомянутых соединений не наблюдали, отмечали гибель менее 22% клеток. Аналогичные данные были получены при анализе эффектов R- и S-CpdA на клетки Granta-pGIPZ и Granta-shGR (рисунок 3Б).



**Рисунок 3** - Антипролиферативный эффект энантиомеров СрдА на клетки СЕМ (А) и Granta (Б). Подсчет количества жизнеспособных клеток проводили с помощью прямого подсчета клеток в камере Горяева. \*- статистически значимое отличие от контроля; # - статистически значимое отличие между числом жизнеспособных клеток СЕМ-pGIPZ и СЕМ-shGR,  $p < 0.05$

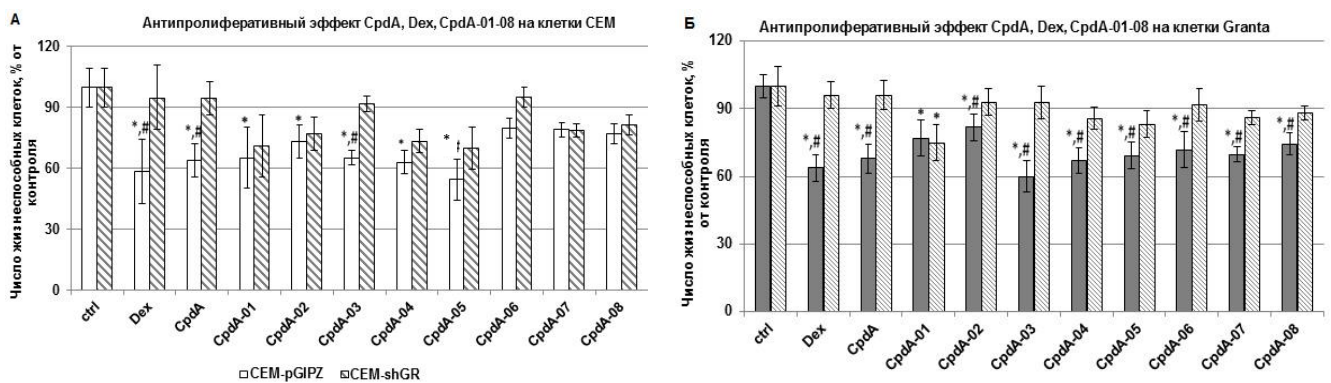
Данные по антипролиферативному эффекту энантиомеров СрдА согласовались с данными проточной цитофлуориметрии по исследованию запуска апоптоза. Было продемонстрировано, что оба энантиомера СрдА аналогично Dex и СрдА индуцируют апоптоз в обеих клеточных линиях. При инкубации клеток СЕМ с R- и S-СрдА количество клеток, находящихся в пре- $G_1$  фазе, увеличилось в 3 и 3,5 раза соответственно. Количество клеток СЕМ, находящихся в пре- $G_1$  фазе, после обработки Dex в течение 24 ч увеличилось в 2 раза относительно контроля. Для клеток Granta наблюдали схожую зависимость, хотя эффекты были выражены слабее (рисунок 4А, Б).



**Рисунок 4** - Проапоптотический эффект GC, СрдА и энантиомеров СрдА в клетках СЕМ (А) и Granta (Б). Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по количеству клеток в пре- $G_1$ -фазе. \* -  $p < 0,05$ .

## *Антипролиферативные и проапоптотические эффекты новосинтезированных химических производных CpdA*

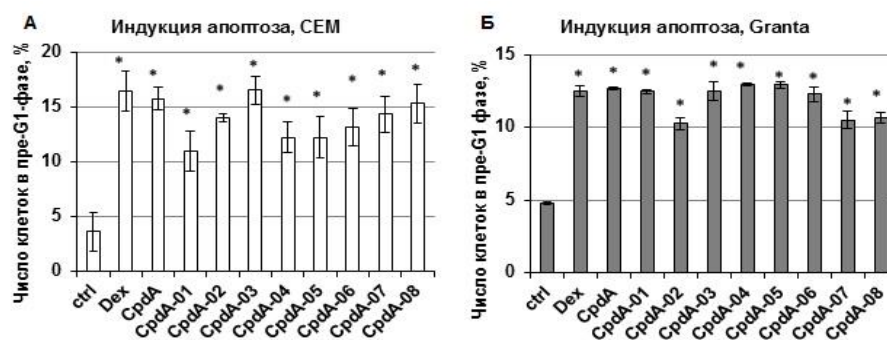
При исследовании GR-зависимого антипролиферативного эффекта химических производных CpdA01-08 было показано, что наиболее высокой способностью подавлять пролиферацию обладают CpdA-03, -04, -05, -08. Так, после 24-часовой обработки CpdA-03 в концентрации 1 мкМ клеток СЕМ-pGIPZ, обладающих нормальным уровнем экспрессии GR, доля жизнеспособных клеток составила 65,3%, что сопоставимо с эффектами рацемата CpdA и Dex. В то же время в клетках СЕМ-shGR с подавленной экспрессией гена GR CpdA-03 не оказал антипролиферативного эффекта и количество жизнеспособных клеток составляло 91,9% после 24 ч инкубации. При инкубации с этим же соединением клеток Granta-pGIPZ количество живых клеток составляло 60%, а в культуре Granta-shGR с подавленной экспрессией GR количество жизнеспособных клеток составляло 92,8%, что также сравнимо с эффектами Dex и рацемата CpdA на данные клетки. (рисунок 5А, Б). Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что антипролиферативный эффект новосинтезированного химического производного CpdA, CpdA-03, реализуется посредством активации GR.



**Рисунок 5-** Антипролиферативный эффект CpdA-01-08, CpdA и Dex на клетки СЕМ (А) и Granta (Б). Подсчет количества жизнеспособных клеток проводили с помощью прямого подсчета клеток в камере Горяева. \* - статистически значимое отличие от контроля; # - статистически значимое отличие между числом жизнеспособных клеток СЕМ-pGIPZ, Granta-pGIPZ и СЕМ-shGR, Granta-shGR,  $p < 0.05$

При исследовании индукции апоптоза после 48 часовой обработки соединениями CpdA 01-08 в обеих клеточных линиях наблюдался запуск апоптоза, сопоставимый с эффектами CpdA и Dex. Наиболее выраженный проапоптотический эффект проявляли соединения CpdA-02, -03, -04, -05, -08 (рисунок 6А, Б). Так, количество клеток Granta, находящихся в пре-G<sub>1</sub> фазе, после обработки аналогами CpdA в течение 48 ч

увеличилось в случае СрдА-03, СрдА-04, СрдА-05 в 1,6 раз. На клетках линии СЕМ было показано, что ряд новосинтезированных химических производных СрдА индуцировали апоптоз в большей степени, чем Dex и рацемат СрдА: увеличение числа клеток СЕМ в пре-G1 фазе, после обработки Dex и СрдА в течение 48 ч составило 1,6 раз относительно контроля, после обработки СрдА-03 – 2 раза, СрдА-04 – 1,8 раз, и СрдА-08 – 2,1 раз.



**Рисунок 6** - Проапоптотический эффект соединений СрдА 01-08 в клетках СЕМ (А) и Granta(Б). Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по количеству клеток в пре-G1-фазе. \* -  $p < 0.05$

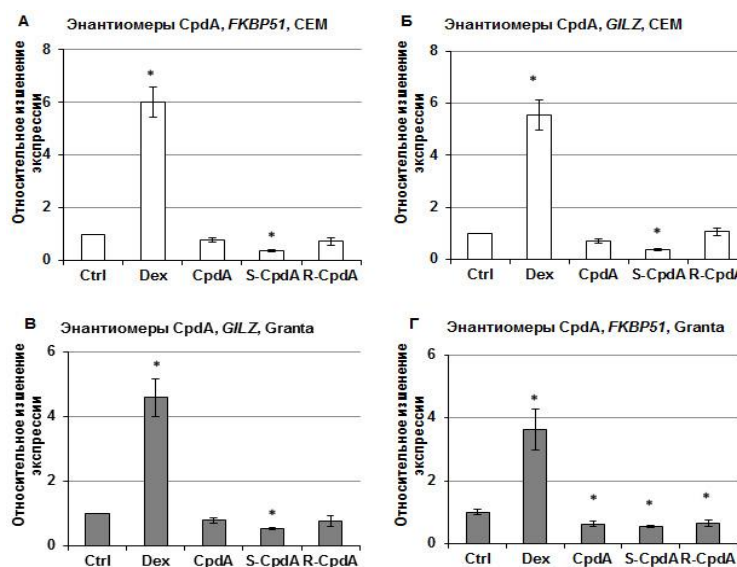
### Оценка эффектов исследуемых соединений на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора

#### *Исследование способности энантиомеров СрдА 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, был продемонстрирован эффект энантиомеров СрдА на клетки лейкоза СЕМ после 24-часовой обработки. Было показано, что энантиомеры СрдА не вызывали увеличение экспрессии данных генов, как и рацемическая смесь данного соединения. В качестве положительного контроля был использован Dex, который увеличивал экспрессию этих генов в 5 раз (рисунок 7А, Б). 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 СрдА на 15-25% (рисунок 7В, Г).

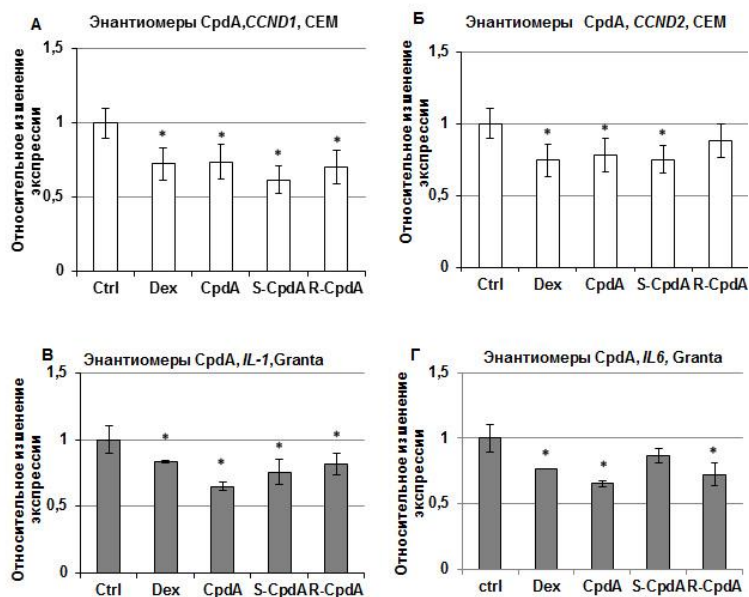
Для оценки транс-репрессорного потенциала энантиомеров СрдА в сравнении с рацемической смесью и Dex с помощью количественной ПЦР была исследована

экспрессия генов, содержащих в промоторной области сайты связывания NF-κB – регуляторов клеточного цикла циклинов D1 и D2. При обработке Dex клеток линии СЕМ экспрессия *CCND1* снизилась в 3,1 раза, при обработке CpдA - 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 (рисунок 8А, Б).



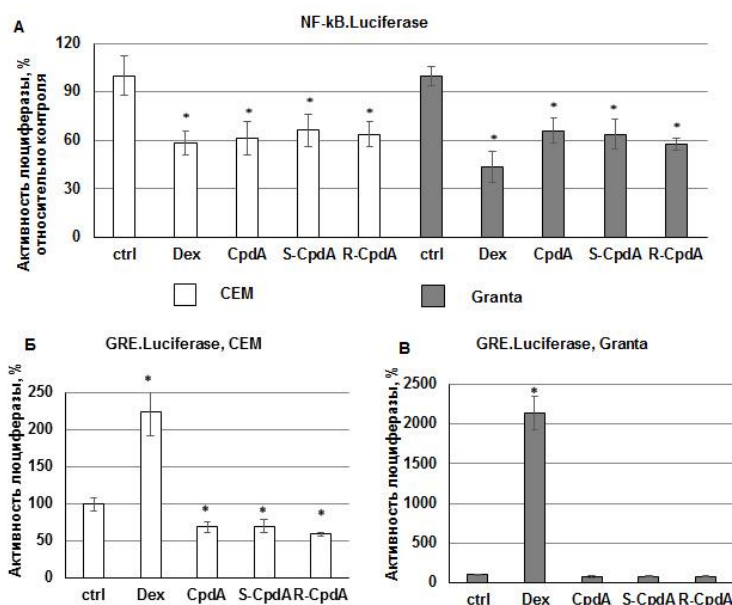
**Рисунок 7** - Влияние энантиомеров CpдA на экспрессию GR-зависимых генов *FKBP51* и *GILZ* в клетках СЕМ (А, Б) и Granta (В, Г). Уровень экспрессии генов определяли методом количественной ПЦР. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). \* -  $p < 0,05$ .

В случае клеток Granta в качестве маркеров транс-репрессии нами были использованы гены цитокинов *IL-1* и *IL-6*, также регулирующих воспаление и пролиферацию. Экспрессия *IL-1* и *IL-6* снижалась после обработки всеми исследуемыми соединениями в 1,3-1,7 раза. Более выраженный эффект на подавление экспрессии *IL-1* был показан для S-CpдA, а в случае анализа экспрессии гена *IL-6* – для R-CpдA (рисунок 8В, Г).



**Рисунок 8** - Влияние энантиомеров CpdA на экспрессию генов *CCND1* и *CCND2* в клетках линии CEM (А, Б) и генов *IL-1* и *IL-6* в клетках линии Granta (В, Г). Уровень экспрессии генов определяли методом количественной ПЦР. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). \* -  $p < 0,05$ .

Для подтверждения влияния энантиомеров CpdA на молекулярные механизмы действия GR был проведен люциферазный репортерный анализ. В клетках CEM-NF-kB.Luc и Granta-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 9А). 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 энантиомеры не вызывали такого эффекта. В случае R-CpdA было продемонстрировано статистически значимое снижение активности люциферазы в 1,4 раза (рисунок 9Б). В случае клеток Granta наблюдали схожий эффект с тем отличием, что тенденцию к снижению активности люциферазы проявляли как оба энантиомера, так и рацемическая смесь CpdA (рисунок 9В).



**Рисунок 9** - Влияние энантиомеров CpдA на активность NFκB в клетках CEM и Granta(A). Влияние энантиомеров CpдA на активность GR в клетках CEM (Б) и Granta (В). Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем CMV-промотора. \* -  $p < 0.05$

### ***Оценка влияния новосинтезированных химических производных CpдA на функциональную активность глюкокортикоидного рецептора***

Первоочередным необходимым условием для описания новосинтезированных химических производных CpдA как лигандов GR являлось прямое доказательство физического взаимодействия химических производных CpдA с рецептором. При исследовании связывания нами был использован метод поляризации флуоресценции. Аффинность потенциального лиганда к рецептору определяли по изменению поляризации конкурентного флуоресцентно меченого лиганда. За концентрацию, при которой наблюдалось 50% ингибирование связывания конкурентного флуоресцентно-меченого лиганда Fluormone GS1 (IC50), принимали ту концентрацию, при которой наблюдалось уменьшение поляризации комплекса GR с флуоресцентно-меченым лигандом Fluormone GS1 в 2 раза относительно максимума. По результатам наших исследований было показано, что IC50 для Dex, который использовали в качестве положительного контроля, составила 22 нМ, что совпадает с данными литературы. IC50 для исходного соединения CpдA составила 2,2 мкМ, что также совпадает с данными литературы. IC50 для CpдA-03 лежала в том же диапазоне и составила 1,8 мкМ, в отличие от CpдA-04, IC50 которого была в 10 раз выше и составила 21,3 мкМ (таблица

1). Для СpdA-05, -06 и 01 не было показано существенное изменение поляризации флуоресценции при инкубации с GR и Fluormone GS1.

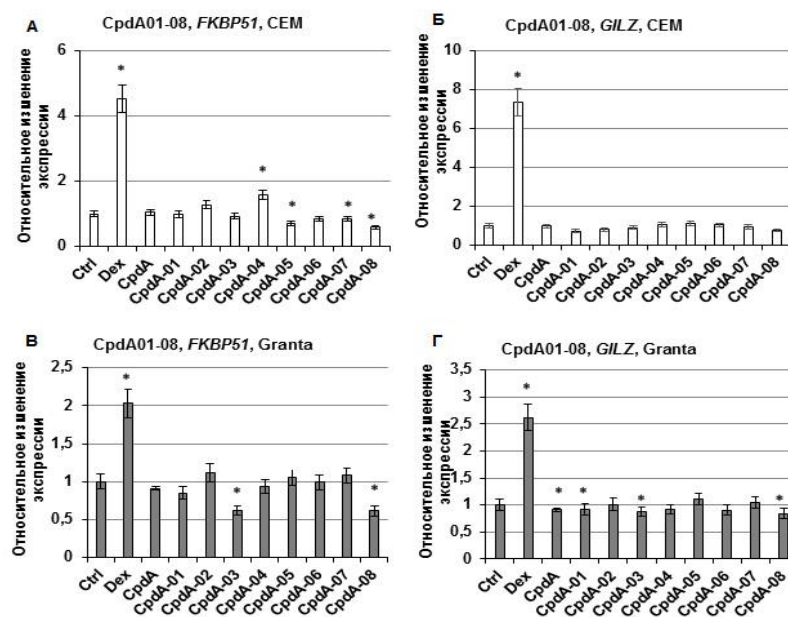
**Таблица 1** - Концентрации Dex, СpdA, СpdA-01-08, при которых наблюдали подавление связывания флуоресцентно меченого лиганда GR, Fluormone GS1, на 50%

Вещество	log IC <sub>50</sub> , нМ	±	IC <sub>50</sub> , нМ	±
Dex	1,35	0,48	22,3	7,99
СpdA	3,36	0,27	2291,2 (2,3 мкМ)	184,4
СpdA-01	5,33	0,44	>100мкМ	-
СpdA-02	8,34	0,71	>100мкМ	-
СpdA-03	3,26	0,22	1836,5 (1,8 мкМ)	123,1
СpdA-04	4,33	0,34	21163 (21,2 мкМ)	1686
СpdA-05	5,67	0,51	>100мкМ	-
СpdA-06	9,13	1,78	>100мкМ	-
СpdA-07	8,61	1,62	>100мкМ	-
СpdA-08	7,93	0,94	>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*. При обработке клеток СЕМ СpdA-04 экспрессия *FKBP51* повышалась в 1,4 раза, что предполагает существование альтернативных механизмов действия данного соединения. Наиболее оптимальные результаты показало соединение СpdA-03, которое стабильно не увеличивало экспрессию данных генов в обеих клеточных линиях. Сходный эффект наблюдали при оценке экспрессии гена *GILZ*. В клетках линии Granta после обработки их СpdA-03 в концентрации 1 мкМ экспрессия *FKBP51* падала в 1,5 раза, экспрессия *GILZ* падала в 1,3 раза относительно контроля. Dex статистически значимо увеличивал экспрессию этих генов в 4,5 и 7,5 раз в клетках СЕМ (рисунок 10А, Б) и в 1,5-2 раза в клетках Granta (рисунок 10В, Г). Для оценки запуска транс-репрессии определяли изменения в экспрессии генов *CCND1-D2* в клетках СЕМ и *IL-1* и *IL6*- в клетках Granta после инкубации с исследуемыми соединениями в течение 24 ч. Как и ожидалось, Dex и СpdA подавляли экспрессию обоих циклинов в клетках СЕМ и обоих интерлейкинов в клетках Granta. В отношении химических производных СpdA преимущественно было отмечено также подавление экспрессии циклинов, за исключением СpdA-04 и СpdA-08: увеличение экспрессии *CCND1* после обработки клеток СpdA-04 было в 1,4 раза, СpdA-08 - почти в 1,3 раза (рисунок 11А, Б). Экспрессию гена *IL1* в клетках линии Granta

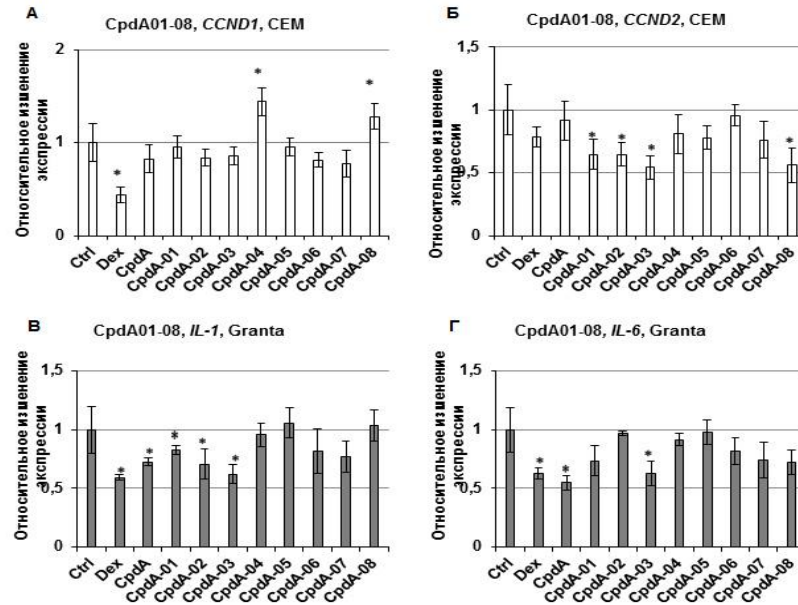


значительно снизили CpдA-01,-02,-03,-04. В частности, после обработки клеток CpдA-03 экспрессия как *IL-1*, как и *IL6* снизилась 1,6 раз, что было сравнимо с эффектом Dex (рисунок 11В, Г).



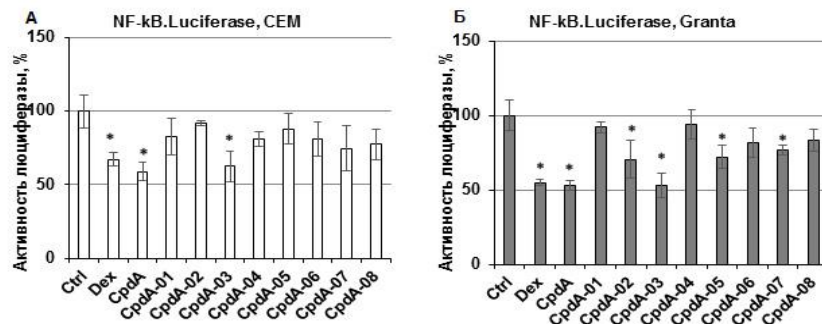
**Рисунок 10** - Влияние химических производных CpдA на экспрессию гена *FKBP51* в клетках CEM (A) и Granta (B) и гена *GILZ* в клетках CEM (Б) и Granta (Г). Уровень экспрессии *GILZ* определяли методом количественной ПЦР. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). \* - $p < 0,05$ .

Для определения транс-активационного и транс-репрессорного потенциала новых полученных соединений также был проведен анализ GC-индуцированной активности люциферазы при проведении репортерного анализа. Подавление активности NFκB на клетках CEM было выражено эффективнее, чем на клетках Granta (рисунок 12А, Б). Наиболее активными соединениями в отношении ингибирования активности данного фактора транскрипции были соединения CpдA-03, -05, -06 и -08.



**Рисунок 11** - Влияние химических производных Cpda на экспрессию генов *CCND1* и *CCND2* в клетках CEM (А, Б) и генов *IL-1* и *IL-6* в клетках Granta (В, Г). Уровень экспрессии генов определяли методом количественной ПЦР. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (*Rpl27*). \* -  $p < 0,05$

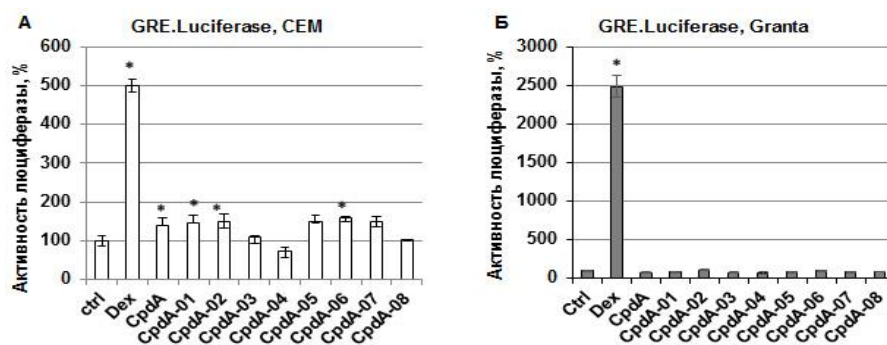
В частности, на клетках CEM было показано, что активность люциферазы снижается более чем на 80% после обработки клеток Cpda-03, более чем на 70% после обработки Cpda-05, Cpda-06 и Cpda-08. В случае с клетками Granta ингибирующий эффект новых синтезированных производных Cpda был менее выражен, однако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



**Рисунок 12** - Влияние химических производных Cpda на активность NF-kB в клетках CEM (А) и Granta (Б). Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. \* -  $p < 0,05$

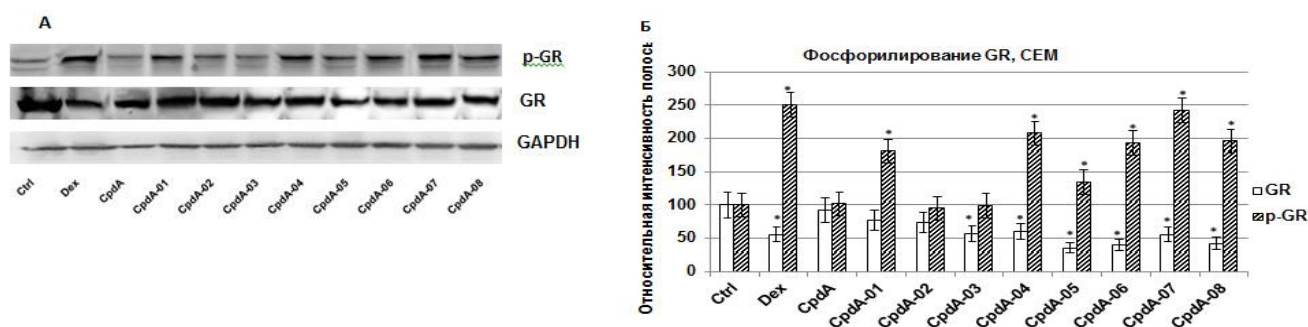
В отношении активности GR было показано, что она также была подавлена в обеих клеточных линиях после обработки их химическими производными Cpda и

исходным соединением (рисунок 13А, Б). Так, при обработке клеток СЕМ СpdА-01-08 было показано, что наибольшую степень ингибирования в 5 и 6 раз проявляют соединения СpdА-03 и СpdА-04. О корректной работе используемой модельной системы судили по увеличению активности люциферазы после обработки Дех: для клеток СЕМ было отмечено увеличение активности люциферазы в 5 раз, для клеток Granta – в 25 раз.

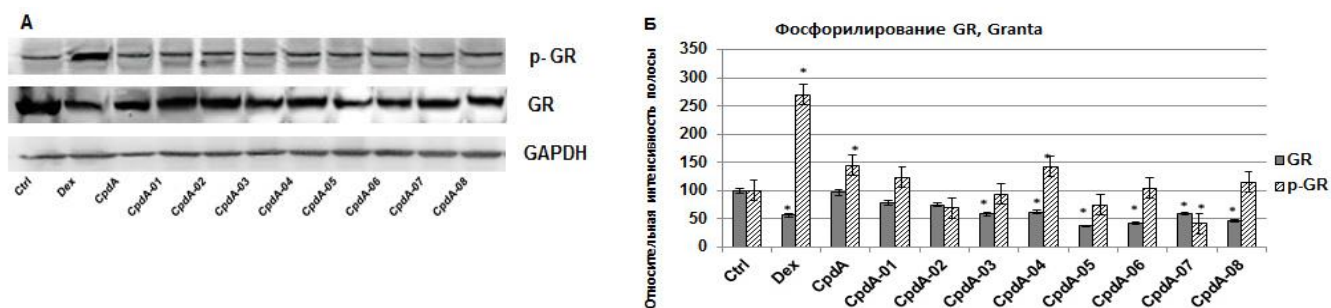


**Рисунок 13** - Влияние химических производных СpdА на активность GR в клетках СЕМ (А) и Granta(Б). Для нормализации сигнала использовали клетки, трансдуцированные лентивирусным вектором, экспрессирующим ген люциферазы светлячка под контролем минимального CMV-промотора. \* -  $p < 0.05$

Еще одним показателем индукции транс-активации является фосфорилирование GR по остатку серина Ser211. На рисунке 14 продемонстрировано фосфорилирование белка GR после 24 часовой обработки клеток СЕМ новыми химическими производными СpdА. Как можно увидеть, ряд химических производных СpdА не запускал фосфорилирование GR, в частности, такой эффект наблюдали для СpdА-02, СpdА-03 и СpdА-05. На клетках линии Granta было продемонстрировано, что все химические производные СpdА также не запускают фосфорилирование рецептора (рисунок 15).



**Рисунок 14** – Влияние химических производных СpdА на уровень фосфорилирования GR в клетках СЕМ. (А) Уровень экспрессии GR и p-GR в клетках СЕМ анализировали с помощью Вестерн блоттинга. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. \* -  $p < 0.05$ .



**Рисунок 15** - Влияние и химических производных CpдА на уровень фосфорилирования GR в клетках Granta. (А) Уровень экспрессии GR и p-GR в клетках Granta анализировали с помощью Вестерн блоттинга. (Б) Денситометрический анализ блотов проводили с помощью пакета программ ImageJ. На графиках представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH. \* -  $p < 0.05$

По результатам исследований было показано, что наиболее выраженными свойствами SEGRA обладает соединение CpдА-03. В дальнейших исследованиях данного химического производного CpдА была определена его противоопухолевая активность *in vivo* на модели перевиваемой лимфомы у мышей.

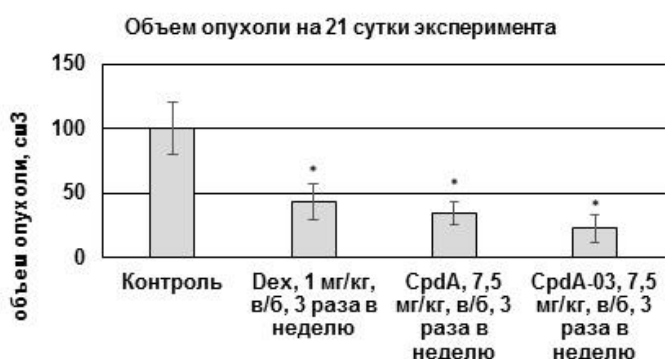
### Исследование мутагенной активности производных и энантиомеров CpдА

Для полной характеристики препарата, рассматриваемого в качестве потенциального терапевтического средства, необходим анализ его генотоксичности – способности вызывать повреждения в структуре ДНК. Мутационный тест на *Salmonella Typhimurium* является классическим бактериальным тестом на частоту реверсивных мутаций, позволяющим охарактеризовать способность соединений вызывать мутации по типу сдвига рамки считывания и замены пар оснований. Он позволяет выявлять как мутагены прямого действия, так и латентные их формы (промутагены) путем активации последних микросомными монооксигеназами из печени крыс. Эксперименты по индукции реверсий у сальмонеллы в основной модификации теста Эймса на штаммах TA98 и TA100 по определению мутагенной активности производных и энантиомеров CpдА в широком диапазоне концентраций показали, 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). CpдА проявлял незначительную мутагенную активность в высоких дозах на штамме TA98, как нами было показано ранее. 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: в 4 и 1,5 раза для штамма TA100, в 36 и 2 раза для штамма TA98. Высокая специфичность мутагенного ответа была подтверждена испытаниями штамма TA98 с мутагеном ДДТДП (увеличение числа колоний в 27 раз) и штамма TA100 с азидом натрия (увеличение числа ревертантов в 10 раз).

### Оценка противоопухолевого эффекта наиболее активного химического производного CpдA, CpдA-03, *in vivo*

Для исследования противоопухолевого эффекта CpдA-03 *in vivo* была использована модель перевиваемой лимфомы P388 у мышей. Лимфома P388 представляет собой асцитную жидкость с опухолевыми клетками, которую можно перевивать как подкожно, так и внутрибрюшинно. Описано использование данной модельной системы в исследованиях эффективности комбинаций глюкокортикоидов с цитостатическими препаратами. В наших экспериментах мы использовали подкожную трансплантацию опухолевых клеток, поскольку тогда критерием оценки противоопухолевой активности служит объем подкожного опухолевого узла. Инъекции CpдA-03, CpдA 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 ежедневных инъекций) отмечали статистически достоверное торможение роста опухолевого узла на 57% у животных, получавших Dex, на 66% – у животных, получавших CpдA и в 78% раза – у животных, получавших CpдA-03 (рисунок 16). Таким образом, противоопухолевый эффект CpдA-03 оказался более выраженным, чем у препаратов сравнения.



**Рисунок 16** - Эффект дексаметазона, CpдA и CpдA-03 на объем аллогraftов лимфомы P388. Критерием противоопухолевой активности исследуемых соединений являлась динамика изменения роста опухоли. На рисунке представлен средний объем аллогraftов на 21 день эксперимента. \* -  $p < 0.05$

## 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 проапоптотических, 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 CpdA и CpdA-03 статистически значимо отличалось от контроля и было сопоставимо с эффектами Dex и CpdA.
2. Основным механизмом реализации антипролиферативных и проапоптотических эффектов оптических изомеров CpdA и CpdA-03 является активация GR.
3. Энантиомеры CpdA и ряд химических производных CpdA способны избирательно запускать механизм транс-репрессии активированного GR при подавлении

индукции транс-активации; при этом наибольшую активность продемонстрировало соединение CpдA-03.

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

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

6. CpдA-03, CpдA-02, CpдA-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 CpдA-03 проявляет противоопухолевую активность на модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей *in vivo*: наблюдали статистически достоверное торможение роста опухолевого узла на 78% при внутрибрюшинном введении CpдA-03 в дозе 7,5 мг/кг.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ПЕРЕЧНЕМ ВАК ПРИ МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

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

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

3. Савинкова, А.В. Противоопухолевый эффект оптических изомеров CpдA *in vitro* на модели острого лимфобластного лейкоза / А.В. Савинкова, Л.Р. Тилова, О.И. Борисова, Е.М. Жидкова, К.А. Кузин, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // Российский биотерапевтический журнал – 2017. – Т. 16. - №1 — С. 61-69.

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

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

### **ДРУГИЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

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

2. Ланцова, А.В. Масштабирование технологии получения липосомальной формы тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия и изучение ее мутагенных и иммунотоксических свойств / А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова, О.Л. Орлова, Н.В. Голубцова, А.А. Рудакова, З.А. Соколова, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Л.Р. Тилова // Российский биотерапевтический журнал. – 2018. – Т. 17– №1 – С. 83- 94.

3. Фетисов, Т.И. Противоопухолевое действие кураксина CBL0137 на моделях аденокарциномы толстой кишки / Т.И. Фетисов, Л.Р. Тилова, Е.А. Лесовая, Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова, Л.С. Труханова, О.В. Морозова, Е.В. Шипаева, Р.В. Иванов, А.А. Пурмаль, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, А.В. Гудков, К.В. Гурова, К.И. Кирсанов // Успехи молекулярной онкологии. - 2016. – Т. 3 – №3 – С. 1–86.

4. Л.Р. Тилова. Использование селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) в комбинированной химиотерапии гемобластозов / Л.Р. Тилова, О.И. Задорожная, К.И. Кирсанов, А.М. Оглоблина, М.Г. Якубовская, И.В. Будунова, Г.А. Белицкий, Е.А. Лесовая. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике», Москва, Россия, 20-21 марта 2014г. – Биотерапевтический журнал – 2014. – Т. 13– №1. – С.132.

5. О.И. Задорожная. Противоопухолевая активность нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора *CpdA in vivo* / О.И. Задорожная, Л.Р. Тилова, К.И. Кирсанов, А.М. Оглоблина, М.Г. Якубовская, И.В. Будунова, Г.А. Белицкий, Е.А. Лесовая. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике»,



Москва, Россия, 20-21 марта 2014 г. – Биотерапевтический журнал – 2014 г. – Т. 13– №1. – С.85.

6. А.В Савинкова. Синтез и противоопухолевая активность энантиомеров CpdA *in vitro* / А.В Савинкова, О.И. Задорожная, Л.Р. Тилова, К.И. Кирсанов, А.М. Оглоблина, М.Г. Якубовская, И.В. Будунова, Г.А. Белицкий, Е.А. Лесовая. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, Россия, 2-4 апреля 2015 г. – Биотерапевтический журнал – 2015. – Т. 14– №1.– С.128.

7. E. Lesovaya. Selective glucocorticoid receptor agonists as novel anti-cancer agents./ E. Lesovaya, L. Tilova, O. Zadorozhnaya, A. Savinkova, K. Kirsanov, A. Ogloblina, G. Belitsky, G. Baida, I. Budunova, M. Yakubovskaya. // Proceedings of the International conference. – Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk – 2015. – Т. 13– №1.– С.33-34.

8. L. Tilova. Synthesis and anti-cancer effects of CpdA enantiomers, non-steroidal glucocorticoid receptor ligands / L. Tilova, O. Zadorozhnaya, A. Savinkova, K. Kirsanov, A. Ogloblina, G. Belitsky, I. Budunova, E. Lesovaya, M. Yakubovskaya. // Proceedings of the International conference. – Cellular and molecular mechanism of tumour-microenvironment crosstalk – 2015– Т. 13– №1. – С.61-62.

9. О.И. Борисова (Задорожная). Модулирование функциональной активности глюкокортикоидного рецептора с избирательной активацией транс-репрессии с помощью иммуносупрессора рапамицина. / О.И. Борисова (Задорожная), А.В. Савинкова, Л.Р. Тилова, Е.М. Жидкова, К.И. Кирсанов, Г.Е. Байда, И.В. Будунова, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая. // Материалы конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы развития», Москва, Россия, 16-17 декабря 2015 г. – Успехи молекулярной онкологии –2015. – Т.2. - №4. –С. 62.

10. Л.Р. Тилова. Синтез новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) и оценка их противоопухолевого эффекта *in vitro* / Л.Р. Тилова, О.И. Борисова (Задорожная), А.В. Савинкова, К.И. Кирсанов, И.В. Будунова, Е.Ю. Булич, В.З. Ширинян, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая. // Материалы конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы развития», Москва, Россия, 16-17 декабря 2015 г. – Успехи молекулярной онкологии – 2015. – Т.2. - №4.–С. 84.

11. А.Ю. Бейзер. Клеточная линия HeLa-T1 как потенциальная система скрининга ксенобиотиков на эпигенетическую активность / А.Ю. Бейзер, И.А. Хитрово, Л.Р. Тилова, Е.А. Лесовая, А.Ю. Портянникова, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, К.И.

Кирсанов. // Материалы конференции «Молекулярная онкология: итоги и перспективы развития», Москва, Россия, 16-17 декабря 2015 г. – Успехи молекулярной онкологии – 2015. – Т.2. - №4.–С. 11.

12. А.В. Савинкова. Противоопухолевая активность новых нестероидных хирально чистых лигандов глюкокортикоидного рецептора *in vitro*. / А.В. Савинкова, Л.Р. Тилова, О.И. Борисова (Задорожная), К.И. Кирсанов, И.В. Будунова, Е. Ю. Булич, В. З. Ширинян, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая. // Материалы II онкологического форума «Белые ночи», Санкт- Петербург, Россия, 22-24 июня 2016 г. – Сборник тезисов «Белые ночи» –2016.–С. 357-358

13. Е.М. Жидкова. Разработка модельной системы рака молочной железы для оценки эффектов селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора / Е.М. Жидкова, М.А. Мазин, К.А. Кузин, Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, О.И. Борисова, А.Ю. Портянникова, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая. // Материалы конференции «Молекулярная онкология», Москва, Россия, – 6-8 декабря 2016г. — Успехи молекулярной онкологии —2016. —Т. 3– №4.— С. 76.

14. Л.Р. Тилова. Синтез новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора, и оценка их противоопухолевой активности на модели гемобластозов *in vitro* / Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, К.А. Кузин, О.И. Борисова, Е.М. Жидкова, К.И. Кирсанов, В.П. Максимова, О.А. Власова, Т.И. Фетисов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Л.В. Яминова, В.З. Ширинян, Е.А. Лесовая. // Материалы III петербургского международного онкологического форума «Белые ночи», Санкт-Петербург, Россия, 23–24 июня 2017 г — Сборник тезисов «Белые ночи». — 2016. — С.44.

15. Е.С. Лылова. Поиск ингибиторов REDD1, и оценка их влияния на рост и жизнеспособность клеток лейкозов и лимфом. / Е.С. Лылова, А.В. Савинкова, Л.Р. Тилова, Е.М. Жидкова, В.П. Максимова, К.А. Кузин, О.А. Власова, К.И. Кирсанов, А.Ю. Портянникова, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая. //Материалы конференции «Отечественные противоопухолевые препараты» Москва, Россия, Биотерапевтический журнал– 2018. – Т. 17– №1(спец. выпуск) – С.42.

16. E. Lesovaya. Anti-lymphoma activity of novel selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs) *in vitro* and *in vivo*. / E. Lesovaya, L. Tilova, A.Savinkova, E. Zhidkova, K. Kuzin, T. Fetisov, K. Kirsanov, V. Shirinyan, M. Yakubovskaya. // ESMO Open– 2018. – С. 122.