

ЖИДКОВА ЕКАТЕРИНА МИХАЙЛОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ СЕЛЕКТИВНЫХ
АГОНИСТОВ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА НА КЛЕТКИ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

3.1.6. Онкология, лучевая терапия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

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

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Лесовая Екатерина Андреевна

Официальные оппоненты:

Григорьева Эльвира Витальевна, доктор биологических наук, заведующий лабораторией гликобиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Татарский Виктор Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «06» марта 2025 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.032.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, по адресу: 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

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

Автореферат разослан «.....» 20__ года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Активность рецептора глюкокортикоидов (GR) важна для многих физиологических процессов, а также определяет развитие ряда патологий. При ряде злокачественных новообразований активация GR способствует прогрессии опухолей, выражаемой в появлении химиорезистентности, активизации метастазирования, увеличении генетической нестабильности и т.д. После связывания с лигандом рецептор может действовать как транскрипционный фактор, взаимодействуя в форме димера с собственными глюкокортикоид-респонсивными элементами в промоторах и энхансерах ряда генов, реализуя механизм трансактивации, или формировать гетеродимерные комплексы с другими транскрипционными факторами, подавляя их активность и опосредуя механизм трансрепрессии. Основные терапевтические эффекты глюкокортикоидов (GC) опосредованы преимущественно белок-белковыми взаимодействиями активированного GR с другими факторами транскрипции и последующей трансрепрессией генов. При этом побочные эффекты в основном реализуются за счет трансактивации. Наиболее распространенными нежелательными явлениями при использовании GC в терапии солидных опухолей, в частности, рака молочной железы (РМЖ) являются развитие остеопороза с проявлениями асептического некроза, диабета, нарушений водно-солевого баланса, а также усиление метастазирования и развитие резистентности клеток опухоли к химиопрепаратам.

РМЖ является ведущей патологией у женского населения (22,5%). В 2023 г. выявлено 82499 случаев РМЖ. За счет различий РМЖ по гормональному статусу, эффекты GC при лечении разных подтипов РМЖ крайне неоднозначны. Молекулярная классификация РМЖ выделяет три основных подтипа: люминальный (с высокой экспрессией рецептора эстрогена (ER α)), HER2-позитивный (с низкой экспрессией ER и высокой – HER2) и тройной негативный (ТН), характеризующийся отсутствием экспрессии ER α , HER2 и рецептора прогестерона (PR). GC являются одним из наиболее распространенных компонентов комбинированного лечения солидных опухолей, в том числе ТН РМЖ и гормон-резистентного РМЖ. По данным различных исследований, ТН РМЖ составляет от 10 до 25% всех подтипов РМЖ.

По данным клинических исследований, GC увеличивают терапевтический интервал цитотоксических химиопрепаратов и препятствуют развитию синдрома анорексии-кахексии, снижая тошноту и повышая аппетит у онкологических больных. Экспозиция опухолевых клеток люминального РМЖ к GC приводит к подавлению их эстроген-зависимой пролиферации, однако в клетках ТН РМЖ активация GR ассоциирована с неблагоприятным прогнозом. Такие различия в эффектах GC при терапии РМЖ разных типов могут быть

объяснены зависимостью направленности действия GC от особенностей молекулярных характеристик опухолевых клеток разных подтипов РМЖ. В настоящее время отсутствует дифференцированный подход к применению GC при терапии РМЖ. GC могут увеличивать риск метастазирования ТН РМЖ и усиливать пролиферацию опухолевых клеток. В связи с этим, представляется необходимым изучение влияния GC на рост и жизнеспособность клеток РМЖ с различным статусом ER α , PR и HER2, на степень запуска трансактивации и трансрепрессии, а также на молекулярные механизмы развития метастазирования.

В последние десятилетия одним из перспективных направлений является разработка селективных модуляторов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), рассматриваемые в качестве альтернативы GC в клинической практике. Подобно GC, SEGRA связываются с GR, однако приобретаемая рецептором конформация в случае SEGRA препятствует реализации трансактивации, обуславливая побочные эффекты. В то же время, механизм трансрепрессии и, следовательно, терапевтическое действие запускается в полном объеме. В настоящее время на разных фазах фармацевтической разработки находится ряд SEGRA, которые предполагается использовать в терапии астмы и ревматоидного артрита. Однако круг потенциальных потребителей лекарственных препаратов на основе SEGRA достаточно широк, и включает также онкологических больных с различными гематологическими и солидными злокачественными новообразованиями.

В связи с этим, был разработан дизайн и проведен синтез ряда структурных аналогов CpdA. Среди новосинтезированных аналогов была отобрана лидерная молекула CpdA-03 (4-[1-гидрокси-2-пиперидин-1-илэтил]фенол), для которой была показана сравнимая с исходным соединением CpdA противоопухолевая активность в отношении моделей лейкозов и лимфом как *in vitro*, так и *in vivo*. Настоящее исследование направлено на более углубленное исследование CpdA-03: анализ стабильности, определение его аффинности к GR в клеточной системе *in vitro*, а также его молекулярных эффектов на моделях РМЖ различных подтипов.

Цель исследования

Сравнительный анализ молекулярных механизмов влияния GC и SEGRA, а именно, CpdA и CpdA-03, на клетки рака молочной железы различных молекулярных подтипов

Задачи исследования

1. Оценить аффинность CpdA-03 к GR в клеточной системе *in vitro*.
2. Проанализировать стабильность молекулы CpdA-03 в различных условиях хранения.

3. Оценить GR-зависимый антипролиферативный эффект SpdA и SpdA-03 на клеточных моделях РМЖ.
4. Оценить трансактивационный и трансрепрессорный потенциал SpdA и SpdA-03 в сравнении с дексаметазоном по степени ядерной транслокации GR, изменению уровня экспрессии маркерных генов и уровня фосфорилирования GR по Ser211.
5. Проанализировать эффекты SEGRA и GC на интегральную миграционную способность клеток РМЖ и молекулярные механизмы, обуславливающие подвижность клеток и их участие в клеточной адгезии.

Методология и методы и исследования

Методологическую основу исследования составляли комплексный и системный подходы к изучению функционирования GR в ряде линий культивируемых клеток РМЖ с различными молекулярно-генетическими характеристиками с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования.

В ходе исследования был использован широкий спектр методов молекулярной биологии. Все клеточные тесты выполнены с использованием иммортализованных линий клеток, широко применяемых в качестве экспериментальных модельных систем в фундаментальных и прикладных исследованиях в области молекулярной онкологии. Использование в качестве моделей РМЖ *in vitro* культивируемых клеток с различной морфологией, генотипом и фенотипом, при этом экспрессирующих GR на высоком уровне, позволило получить достоверные и однозначно интерпретируемые результаты.

Степень аффинности SpdA-03 к GR была определена радиолигандным методом с использованием клеточной линии с высокой экспрессией рецептора. Оценка антипролиферативного действия исследуемых соединений была проведена путем прямого подсчета клеток. Наблюдаемые эффекты были подтверждены с помощью анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла с использованием проточной цитофлуориметрии, а также с помощью оценки экспрессии ряда регуляторных генов методом количественной ПЦР. Дополнительно были получены генетически-модифицированные клеточные линии с подавленной экспрессией GR, для которых также была проведена оценка жизнеспособности при действии исследуемых лигандов и показана селективность реализации антипролиферативного действия соединений через GR.

Влияние новых SEGRA на функциональную активность GR было оценено с помощью Вестерн-блоттинга по изменению уровня фосфорилирования рецептора и динамики его транслокации в ядро, а также при помощи количественной ПЦР по изменению профиля экспрессии GC-зависимых генов – маркеров трансактивации. С использованием коммерческой

валидированной панели лиофилизированных праймеров были проанализированы изменения профиля экспрессии 86 GR-зависимых генов. Для оценки действия лигандов GR на миграционную активность клеток РМЖ были применены как методы интегральной оценки эффекта (метод застания раны и тест целостности щелевых контактов), так и методы исследования молекулярных механизмов (ПЦР и вестерн-блоттинг для анализа генов и белков, регулирующих межклеточные контакты и миграционную активность клеток).

Научная новизна

В представленном исследовании на клетках РМЖ получены данные о динамике ядерной GR-транслокации, активационного фосфорилирования, действия на экспрессию GR-зависимых генов и ассоциированных с ними белков не только для CpdA-03, но и для хорошо изученного на различных линиях опухолевых клеток соединения CpdA. Впервые продемонстрировано действие GC и SEGRA на межклеточные взаимодействия и миграционную активность клеток РМЖ, а также на активацию GR-зависимых механизмов регуляции их жизнеспособности. Впервые проведен сравнительный анализ изменения профиля экспрессии более 100 генов в клетках РМЖ под действием GC и SEGRA. Впервые проведен сравнительный анализ действия лигандов GR на миграционную активность клеток РМЖ и подтверждена ранее малоизученная роль GC в усилении метастазирования ТН РМЖ. Кроме того, впервые проведенное сравнительное исследование уровня метастатической активности опухолевых клеток и изменений профиля экспрессии генов регуляции межклеточной адгезии и подвижности выявило корреляции снижения/повышения определенных транскриптов с GC-опосредованным усилением метастатической активности клеток РМЖ. Получены новые данные об активности SEGRA в клетках РМЖ различных подтипов: показаны GR-зависимые антипролиферативные и противовоспалительные действия CpdA и CpdA-03, сравнимые с эффектами дексаметазона. В практическом аспекте на основании полученных данных о биологической активности нового химического производного CpdA и исходной молекулы было показано, что препараты группы SEGRA имеют ряд существенных преимуществ перед GC.

Теоретическая и практическая значимость

Современные исследования роли ядерных рецепторов в патогенезе РМЖ не ограничиваются только анализом роли PR и ER α . Исследование роли экспрессии GR и действия эндо- и экзогенных лигандов GR на прогрессию злокачественных новообразований (ЗНО) также является актуальным направлением биомедицинской науки. Оценка потенциальных фармакологически активных нестероидных веществ SEGRA (CpdA, CpdA-03) в качестве аналогов GC не только позволяют разработать менее токсичную схему химиотерапии и

повысить продолжительность и качество жизни пациентов с РМЖ, но и может иметь значение при лечении других солидных опухолей, при которых применяются GC. Сопоставление эффектов GC в отношении различных по гормональному статусу линиях РМЖ создает базу данных для развития персонализированного подхода в использовании GC при терапии РМЖ.

Данные представленного впервые проведенного сравнительного анализа действия лигандов GR на миграционную активность клеток РМЖ разных молекулярных подтипов, являются подтверждением роли GC в усилении метастазирования ТН РМЖ. В то же время, полученные данные свидетельствуют о возможности более избирательной активации GR-зависимых сигнальных путей, ведущих к гибели опухолевой клетки, с помощью SEGRA. Эти данные исключительно важны для клинической онкологии, так как GC активно используют в комбинированной противоопухолевой химиотерапии цитостатиками ТН РМЖ, а ежегодно в России этот тип ЗНО выявляют более чем у 20 тысяч женщин. Данные об активности CpdA-03 обладают высокой практической значимостью в свете того, что в настоящий момент отсутствуют фармацевтические препараты класса SEGRA, одобренные к применению в клинической практике.

Полученные в ходе исследования приоритетные данные могут быть использованы:

- в фундаментальных исследованиях для дальнейшего изучения молекулярных механизмов и биологической функции реализации трансрепрессорного механизма GR в нормальных и опухолевых тканях *in vitro* и *in vivo*,

- для разработки и оптимизации протоколов проведения доклинических и клинических исследований по повышению эффективности адъювантной химиотерапии пациентов с ТН РМЖ, а также другими типами ЗНО, включающими терапию GC.

Личный вклад

Автор самостоятельно провела анализ научной литературы по теме работы, разработала план исследования, сформулировала цели и задачи 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 конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия, направлению исследований п.2 «Исследования на молекулярном, клеточном и органном уровнях этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные

на современных достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии, биофизики и др.)»).

Положения, выносимые на защиту

1. Производное CpдA-03 химически стабильно в широком диапазоне значений pH и обладает аффинностью к GR.
2. CpдA и CpдA-03 проявляют GR-зависимый цитостатический эффект в клетках РМЖ.
3. CpдA и его химический аналог CpдA-03 оказывают влияние на GR-зависимую экспрессию генов преимущественно по механизму транскрепрессии.
4. CpдA и CpдA-03 не вызывают ядерной транслокации и транскрипционных посттрансляционных модификаций GR.
5. В отличие от дексаметазона (Dex), CpдA и CpдA-03 не оказывают стимулирующего влияния на миграционную способность клеток РМЖ ТН подтипа.

Внедрение результатов исследования

Разработанные в ходе работы генно-модифицированные клеточные модели используются в научно-исследовательской деятельности НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии Н.Н. Блохина» Минздрава России для оценки GR-зависимых эффектов разрабатываемых противоопухолевых препаратов. Экспериментально-практические данные, полученные в ходе исследования, вносят существенный вклад в понимание роли активации GR в прогрессии и метастазировании РМЖ, а также создает предпосылки для практических исследований, направленных на разработку более безопасных и эффективных лекарственных препаратов класса SEGRA.

Апробация

Апробация диссертации состоялась 5 ноября 2024 года на совместной научной конференции отдела химического канцерогенеза, лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов, лаборатории онкопротеомики, лаборатория механизмов канцерогенеза, отдела молекулярной биологии опухолей, отдела экспериментальной биологии опухолей, отдела иммунохимии, лаборатории молекулярной биологии вирусов, лаборатории механизмов регуляции иммунитета, лаборатории биологии стромальных клеток опухолей, лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Результаты исследований представлены на 10 научных конференциях: III-VI Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2017 г., 2018 г., 2019 г., 2020

г., 2021 г., 2022 г.), The 2nd International Electronic Conference on Biomolecules: Biomacromolecules and the Modern World Challenges (Базель, 2022 г.), ESMO Breast Cancer Congress (Берлин, 2019 г.), VII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2019 г.), X Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии памяти академика Н.Н. Трапезникова (Сочи, 2018 г.).

Публикации

Материалы диссертации представлены в 21 публикации, в том числе в 3 статьях в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для защиты диссертационных работ по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия (биологические науки).

Объём и структура работы

Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 417 источников. Текст иллюстрирован 32 рисунками и 6 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

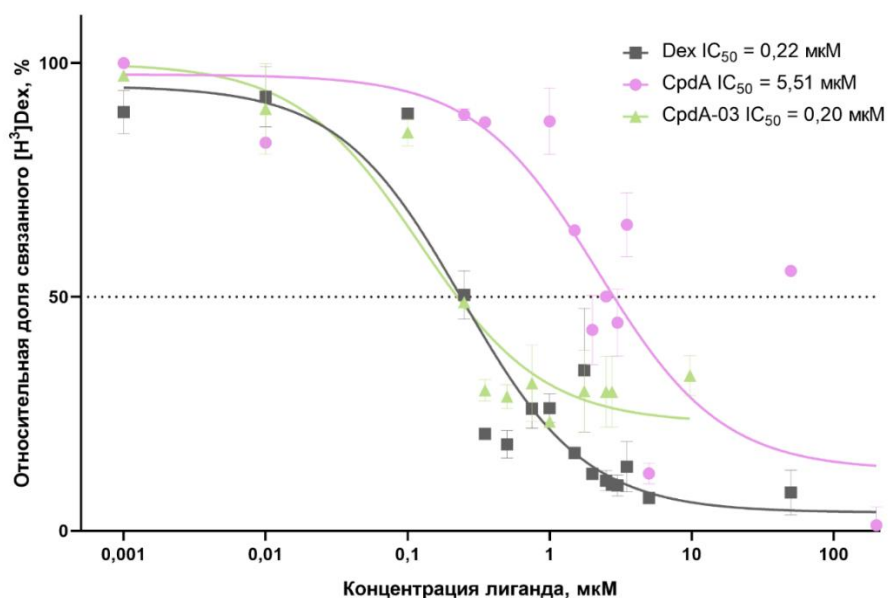
В работе использовались клетки аденокарциномы молочной железы линий MCF-7 (люминальный), MDA-MB-231 (ТН), MDA-MB-453 (HER2-слабопозитивный), HCC-1954 (HER2-позитивный). Сублинии с нокаутом GR были получены с помощью лентивирусных конструкций, несущих короткую шпилечную РНК к мРНК GR. GR-зависимый антипролиферативный эффект CpдA и CpдA-03 оценивали методом прямого подсчета жизнеспособных клеток в исходных и модифицированных линиях после 120 ч инкубации с исследуемыми препаратами. Сравнительный анализ аффинности CpдA-03 и известных лигандов, CpдA и Dex, к GR был проведен радиолигандным методом с использованием меченого тритием Dex (^3H Dex). Клетки инкубировали с 0,5 мкМ ^3H Dex в присутствии Dex, CpдA или CpдA-03 в диапазоне концентраций от 1 нМ до 200 мкМ. В клетках меченные тритием молекулы Dex конкурировали с исследуемыми лигандами за связывание с молекулами GR. После инкубации проводили измерение остаточного сигнала ^3H Dex в клетках. Стабильность молекулы CpдA-03 при длительном (от 1 месяца) хранении при комнатной температуре, при действии УФ-излучения, а также при различных значениях pH растворителя

была проанализирована с помощью метода ЯМР-спектроскопии. Трансактивационный и трансрепрессорный потенциал CpdA и CpdA-03 в сравнении с дексаметазоном оценивали методом вестерн-блоттинга по степени ядерной транслокации GR, и уровня фосфорилирования GR по Ser211 в цитоплазме и ядре клеток, а также по изменению уровня экспрессии маркерных генов (в панели QIAGEN, кат. № PAHS-154Z) методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Эффекты SEGRA и GC на интегральную миграционную способность клеток РМЖ были оценены в тесте на зарастание раны и в тесте на направленную миграцию в камерах Бойдена. Дополнительно, с использованием панели праймеров QIAGEN, кат. № PAHS-213Z методом количественной ПЦР была проведена оценка изменения профиля экспрессии генов, ассоциированных с адгезионными свойствами клетки, при действии лигандов GR, а также методом вестерн-блоттинга с использованием специфических антител была проведена оценка изменения уровня экспрессии белков семейства коннексинов.

Результаты исследования

Оценка аффинности CpdA-03 к GR

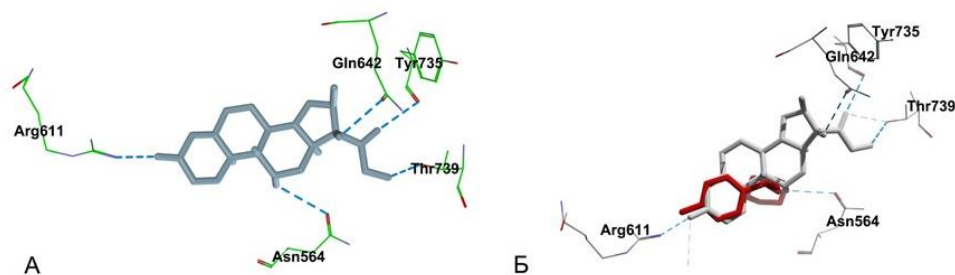
На первом этапе работы был проведен сравнительный анализ аффинности CpdA-03 и известных лигандов, CpdA и Dex, к GR методом радиолигандного анализа по остаточному сигналу конкурентного лиганда [^3H]Dex. IC_{50} связывания составила для Dex – $0,22 \pm 0,08$ мкМ, для CpdA – $5,51 \pm 2,21$ мкМ, для CpdA-03 – $0,20 \pm 0,06$ мкМ (Рисунок 1).



Клетки инкубировали в течение 90 мин с [^3H]Dex в присутствии Dex, CpdA или CpdA-03 в диапазоне концентраций от 1 нМ до 100 мкМ. Относительная доля связывания была определена по остаточной радиоактивности клеточного лизата, данный показатель для образцов, инкубированных с [^3H]Dex принят за 100%

Рисунок 1 – Оценка аффинности Dex, CpdA и CpdA-03 к GR радиолигандным методом

В дополнение к экспериментам в клеточной системе, было проведено компьютерное моделирование взаимодействия CrdA-03 с лиганд-связывающим доменом GR (Рисунок 2). Результаты *in silico* моделирования свидетельствуют о том, что молекула CrdA-03 способна образовывать связь с Arg611 и Asn564 в лиганд-связывающем домене GR, в то время как Dex взаимодействует помимо этих двух остатков также с Thr739, Gln642 и Tyr735.

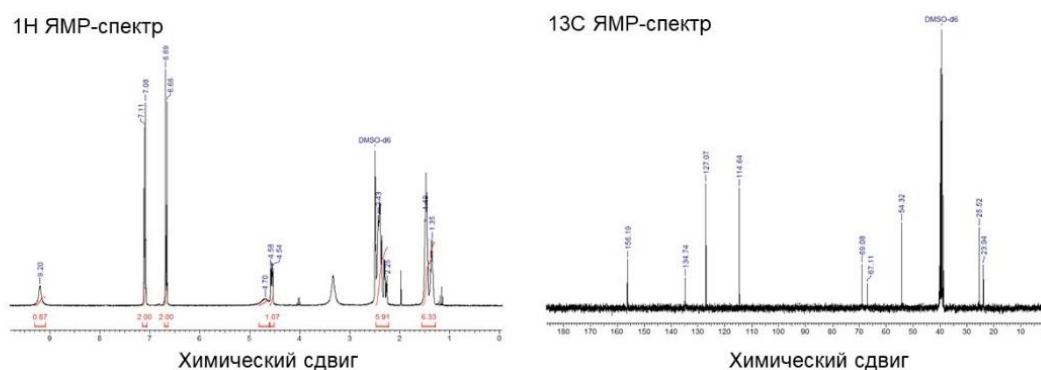


А. Взаимодействие Dex с GR. Б. Взаимодействие CrdA-03 с GR

Рисунок 2 – Модель взаимодействия Dex и CrdA-03 с лиганд-связывающим доменом GR.

Оценка стабильности молекулы CrdA-03

С помощью метода ЯМР-спектроскопии была проанализирована стабильность молекулы при длительном (от 1 месяца) хранении при комнатной температуре, при действии УФ-излучения, а также при различных значениях pH растворителя (Рисунок 3).



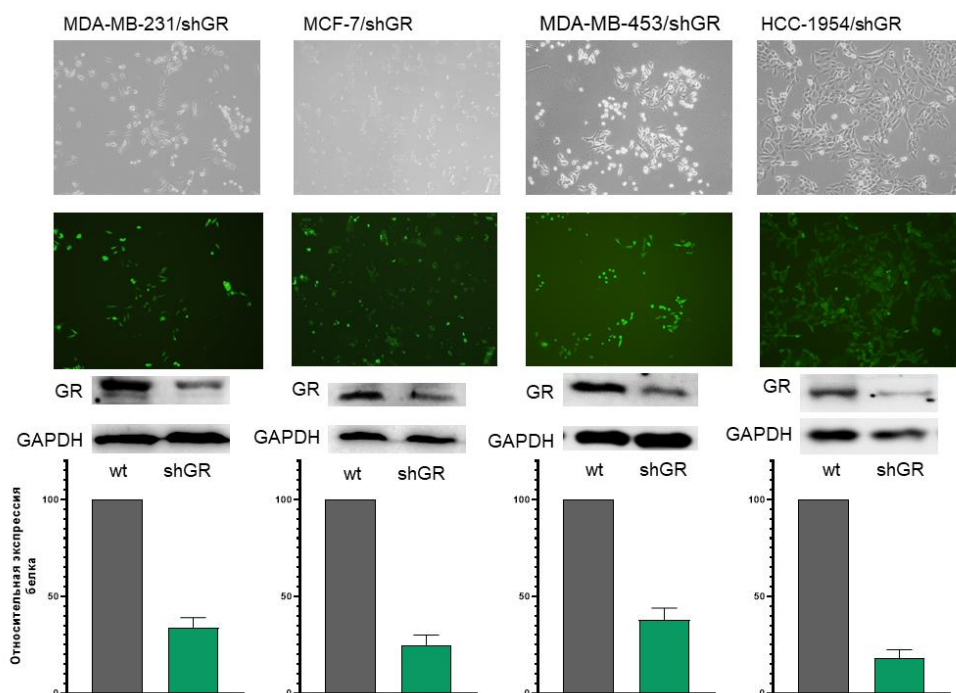
Спектры регистрировали на приборе Bruker DPX-300 (резонансные частоты ^1H =300 МГц, ^{13}C =75 МГц)

Рисунок 3 – ЯМР спектры CrdA-03, полученные при растворении соединения в D_2O

Во всех экспериментах при анализе структуры соединения было показано, что полученные спектры полностью идентичны спектрам исходного соединения. На представленном рисунке приведены спектры ^1H и ^{13}C ЯМР молекулы CpдA-03 при растворении в D_2O . Также стоит отметить, что за время инкубации во всех экспериментальных образцах не наблюдалось изменения цвета или выпадения осадка в растворах CpдA-03.

Антипролиферативные эффекты SEGRA

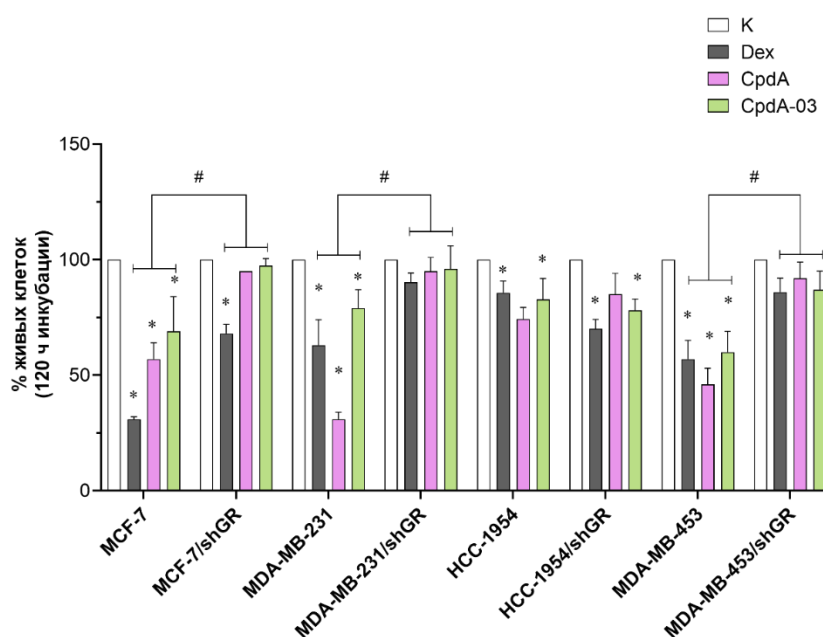
С помощью трансдукции лентивирусного вектора, кодирующего shRNA к мРНК GR, были получены стабильные субклоны клеток с подавленной экспрессией рецептора (Рисунок 4). Нокдаун белка был подтвержден методом вестерн-блоттинга тотальных клеточных лизатов клеток РМЖ. Уровень экспрессии GR в полученных клонах, трансдуцированных лентивирусными конструкциями, экспрессирующими короткую шпилечную РНК к GR, был снижен на 60-80% по сравнению с клетками положительного контроля. Далее на полученных линиях была проведена оценка GR-зависимости антипролиферативных эффектов исследуемых соединений.



Экспрессия GR в клетках MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, HCC-1954, а также в полученных сублиниях MCF-7/shGR, MDA-MB-231/shGR, MDA-MB-453/shGR, HCC-1954/shGR была оценена методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня GAPDH. Экспрессию GFP регистрировали с помощью флуоресцентного микроскопа в УФ-свете

Рисунок 4 – Характеристика полученных сублиний клеток с нокдауном GR

Для определения влияния исследуемых соединений на пролиферацию клеток РМЖ проводили инкубацию клеток с CpдA-03, CpдA или Dex в концентрации 10 нМ. Подсчет числа живых клеток проводили на 5 сутки от первого внесения исследуемых веществ (Рисунок 5). CpдA-03 подавлял пролиферацию клеток линий MCF-7, MDA-MB-231, HCC-1954 и MDA-MB-453 на 31 ± 15 , 21 ± 8 , 17 ± 9 и 40 ± 9 % соответственно. Клетки с подавленной экспрессией GR были не чувствительны или проявляли сравнительно низкую чувствительность к лигандам GR. Проллиферация клеток MCF-7 под действием Dex, CpдA и CpдA-03 снижалась на 69 ± 1 , 43 ± 7 и 31 ± 15 % соответственно. Линия HCC-1954 (HER2-позитивный подтип) обладала наибольшей устойчивостью к лигандам GR. Однако антипролиферативный эффект CpдA-03 на клетки HCC-1954 сохранялся и при нокауте GR (выживаемость HCC-1954 составила 83 ± 9 %, а HCC-1954/shGR – 78 ± 5 %). Клетки с подавленной экспрессией GR линий MDA-MB-231/shGR и MDA-MB-453/shGR не обладали чувствительностью к лигандам GR.



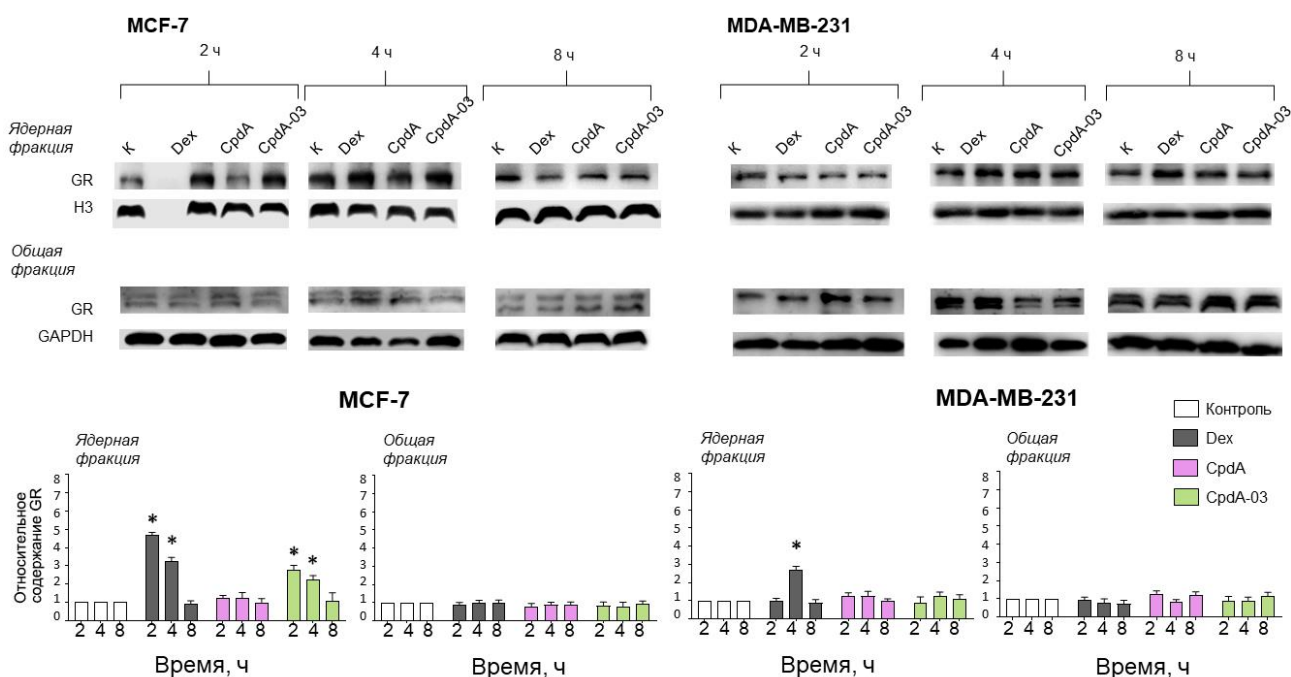
Клетки были инкубированы 120 ч с 10 нМ Dex, CpдA, CpдA-03, затем был проведен подсчет клеток с окрашиванием трипановым синим. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$; # – статистически значимое отличие % живых клеток в исходных линиях и сублиниях с нокаутом GR, $p < 0,05$

Рисунок 5 – Процент жизнеспособных клеток РМЖ после инкубации с лигандами GR

Оценка трансактивационного и трансрепрессорного потенциала CpдA и CpдA-03 в клетках РМЖ

Для исследования функциональной активности GR под действием GC и исследуемых нестероидных лигандов, была оценена динамика транслокации GR в ядро (Рисунок 6). Через 2 ч

после внесения препаратов, увеличение ядерной фракции GR в клетках MCF-7 наблюдалось для Dex и CpдA-03 (увеличение в 4,7 и 2,8 раз по сравнению с контролем). Ядерная фракция GR оставалась на высоком уровне и 4 ч после внесения препаратов (3,3 и 2,2 раза), а затем возвращалась к уровню контроля. В клетках MDA-MB-231 содержание GR в ядре достигало максимума через 4 ч (увеличение в 2,7 раз), а затем снижался до контрольного уровня.

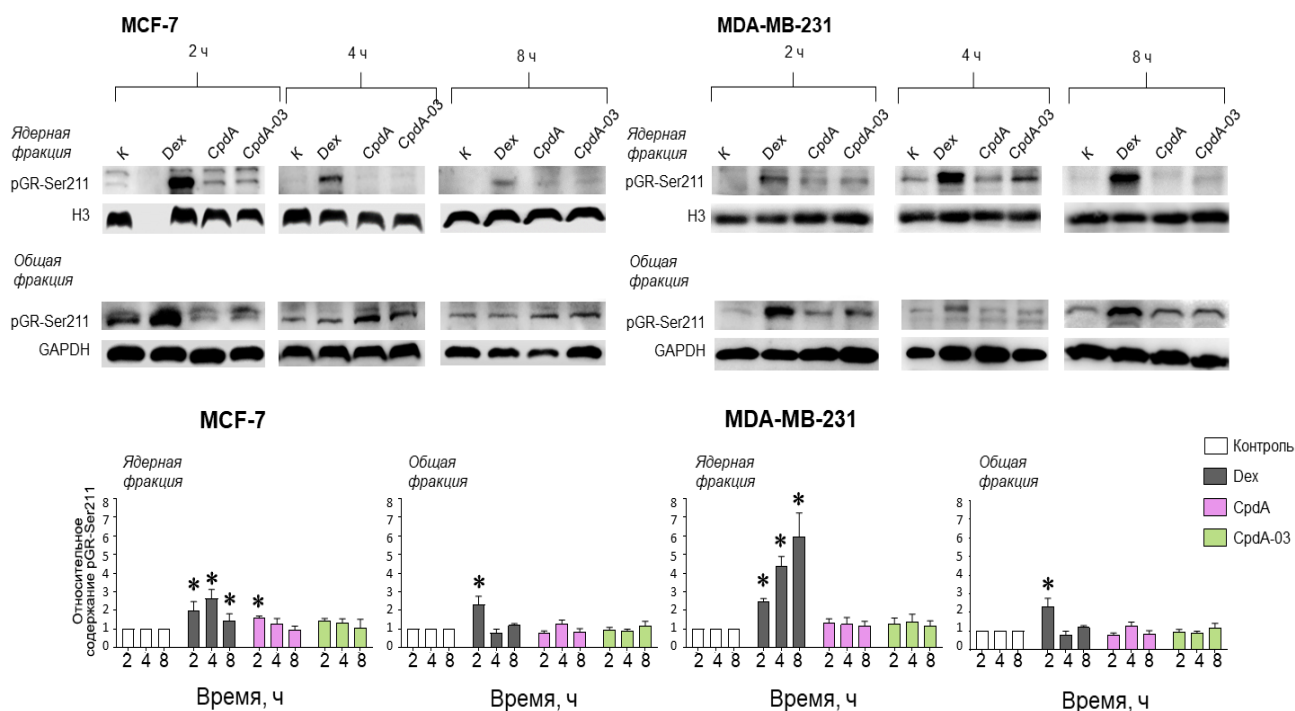


Уровень белка GR в цитоплазматической и ядерной фракциях клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 был определен после инкубации с 10 нМ Dex/CpдA/CpдA-03 в течение 2, 4 или 8 ч методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня GAPDH или гистона H3. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 6 – Уровень белка GR в ядерной фракции клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 после инкубации с Dex/CpдA/CpдA-03 в течение 2, 4 или 8 ч

Фосфорилирование по Ser211 является маркером запуска транскрипционного механизма. В связи с этим, был проведен анализ уровня pGR-Ser211 в ядерной и общей фракции белка после обработки исследуемыми препаратами (Рисунок 7). Накопление pGR-Ser211 в клетках линии MCF-7 наблюдали уже через 2 ч после обработки Dex и CpдA (экспрессия усиливалась в 1,9 и 1,6 раз соответственно). Через 4 ч инкубации с Dex количество белка в ядерных фракциях увеличивалось в 2,6 раз, в то время как в клетках, инкубированных с CpдA, уровень pGR-Ser211 возвращался к уровню контроля. При обработке клеток MCF-7

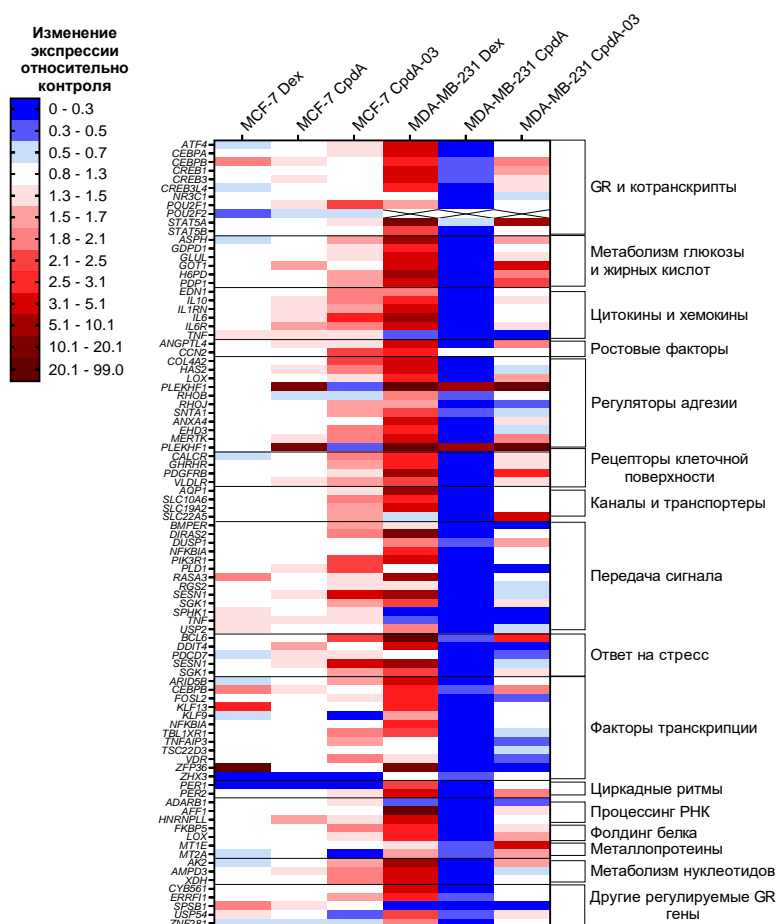
SEGRA фосфорилирования рецептора не происходило. В клетках линии MDA-MB-231 наблюдалось времязависимое усиление уровня pGR-Ser211: в 2,5 раз за 2 ч, в 4,4 раза за 4 ч и в 5,9 раз за 8 ч. В общей фракции статистически значимое увеличение уровня pGR-Ser211 наблюдали в обеих линиях при 2-часовом воздействии Dex.



Уровень белка pGR-Ser211 в цитоплазматической и ядерной фракциях клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 был определен после инкубации с 10 нМ Dex/CpdA/CpdA-03 в течение 2, 4 или 8 ч методом вестерн-блоттинга с использованием специфических антител. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня GAPDH или гистона H3. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 7 – Влияние Dex, CpdA и CpdA-03 на фосфорилирование GR по Ser211

На следующем этапе было проанализировано влияние на уровень экспрессии 86 GR-респонсивных генов. Для этого были использована панель праймеров RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, кат. № PAHS-154Z). В целом, профиль экспрессии GR-зависимых генов в клетках линии MDA-MB-231 подвержен более значительным изменениям под действием лигандов GR в сравнении с клетками линии MCF-7 (Рисунок 8). В клетках линии MDA-MB-231 под действием Dex активируется транскрипция практически всех исследуемых генов. За 24 ч происходит повышение кофакторов GR и факторов транскрипции, ассоциированных с трансактивацией GR. В то же время SEGRA CpdA за 24 ч сдвигает баланс в сторону подавления GR-зависимых генов в клетках линии MDA-MB-231.

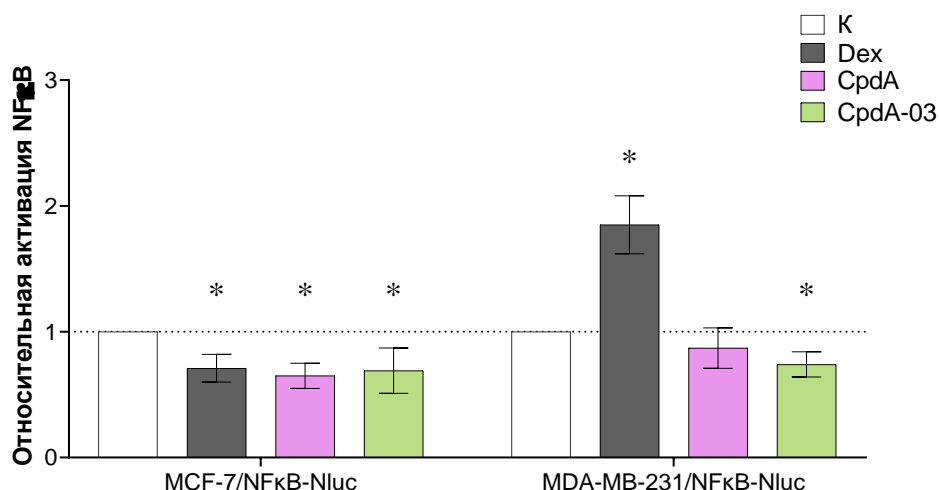


Клетки были инкубированы с 10 нМ Dex, Cpda или Cpda-03 в течение 24 ч. Экспрессия генов была проанализирована методом количественной ПЦР. Результаты нормированы на экспрессию *ACTB*, *GAPDH* и *RPLP0* и представлены в виде тепловой карты изменения экспрессии относительно принятой за 1 в контрольных образцах

Рисунок 8 – Оценка изменения экспрессии GR-зависимых генов при действии Dex, Cpda, Cpda-03

Анализ противовоспалительных эффектов SEGRA и GC в клетках PMЖ

Для SEGRA Cpda и Cpda-03 описана способность ингибировать NFκB за счет активации механизма трансрепрессии. Степень активации NFκB в полученных сублиниях оценивали в люциферазном репортерном тесте. С помощью трансфекции были получены линии, содержащие дополнительные последовательности промоторной области NFκB, сопряженные с геном *NLuc* (Рисунок 9). В клетках линии MCF-7 при действии лигандов GR наблюдали слабое подавление NFκB: относительный уровень активации NFκB снижался на 29, 35 и 31 % при действии Dex, Cpda и Cpda-03 соответственно. В клетках ТН PMЖ MDA-MB-231 при действии Dex наблюдалась активация NFκB (уровень хемилюминесценции повышался в 1,9 раз относительно контроля).



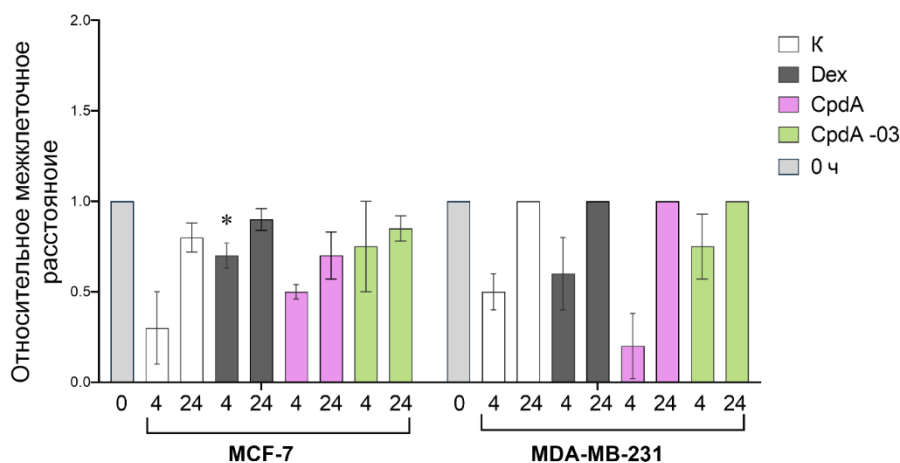
Клетки сублиний MCF-7/NFκB-Nluc и MDA-MB-231/NFκB-Nluc, полученных с помощью трансфекции, были инкубированы с 10 нМ Dex, CpdA или CpdA-03 в течение 24 ч. Степень активации NFκB оценивалась по интенсивности хемилюминесценции. Результаты нормированы на интенсивность хемилюминесценции в сублиниях MCF-7/mCMV-Nluc и MDA-MB-231/mCMV-Nluc и приведены в относительных долях от контроля. * – статистически значимые отличия от контроля, * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 9 – Оценка степени активации NFκB Dex, CpdA и CpdA-03 в люциферазном репортерном анализе

Таким образом было показано, что GC Dex активирует NFκB в клетках ТН РМЖ.

Оценка действия SEGRA и GC на миграционную способность клеток РМЖ

Одним из классических подходов интегральной оценки влияния соединений на миграционную активность клеток является оценка скорости зарастания раны монослоя культуры клеток в присутствии исследуемых препаратов. Клетки РМЖ обладают разной миграционной активностью (Рисунок 10). Раны в монослое линии MCF-7 за 24 ч не зарастали полностью (относительное расстояние между слоями клеток оставалось на уровне 10-30% от зарегистрированного в нулевой экспериментальной точке). Клетки линии MDA-MB-231 наоборот, демонстрировали более высокую скорость миграции в области раны. Уже через 4 ч расстояние между клетками уменьшалось в 2 раза. Dex статистически значимо повышал миграционную активность клеток MCF-7 при инкубации 4 ч (в 2,3 раза в сравнении с отрицательным контролем). В то же время CpdA и CpdA-03 проявляли тенденцию к подавлению миграционной активности клеток ТН подтипа РМЖ, однако достоверно значимые различия в эксперименте получены не были.



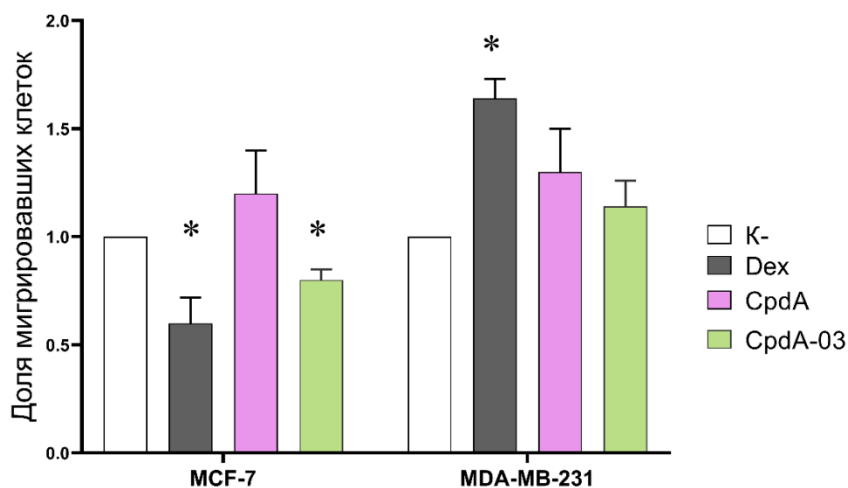
Клетки предварительно инкубировали 120 ч с 10 нМ Dex, CpдA или CpдA-03. В монослое клеток были проведены раны, затем были внесены Dex, CpдA или CpдA-03 (в концентрации 10 нМ). Фотосъемку в области раны проводили сразу после ее нанесения, затем через 4 и 24 ч инкубации с препаратами. Относительное расстояние между слоями клеток после проведения раны принято за 1. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 10 – Оценка влияния лигандов GR на скорость застывания раны

Таким образом было показано, что GC Dex повышает миграционный потенциал клеток люминального РМЖ при кратковременной экспозиции. В то же время SEGRA CpдA и CpдA-03 не оказывают влияния на миграцию клеток от краев раны как при длительной, так и при кратковременной инкубации.

Миграция в камерах Бойдена

Для исследования влияния соединений на направленную миграцию клеток РМЖ была проведена предварительная 120 ч инкубация клеток с 10 нМ Dex, CpдA или CpдA-03. Под действием Dex и CpдA-03 степень миграции клеток линии MCF-7 снижалась на 40 ± 10 и 20 ± 5 % соответственно (Рисунок 11). Под действием Dex миграция клеток линии MDA-MB-231 увеличивалась в 1,64 раза относительно контроля. CpдA и CpдA-03 не оказывали влияния на миграционную активность клеток ТН РМЖ.



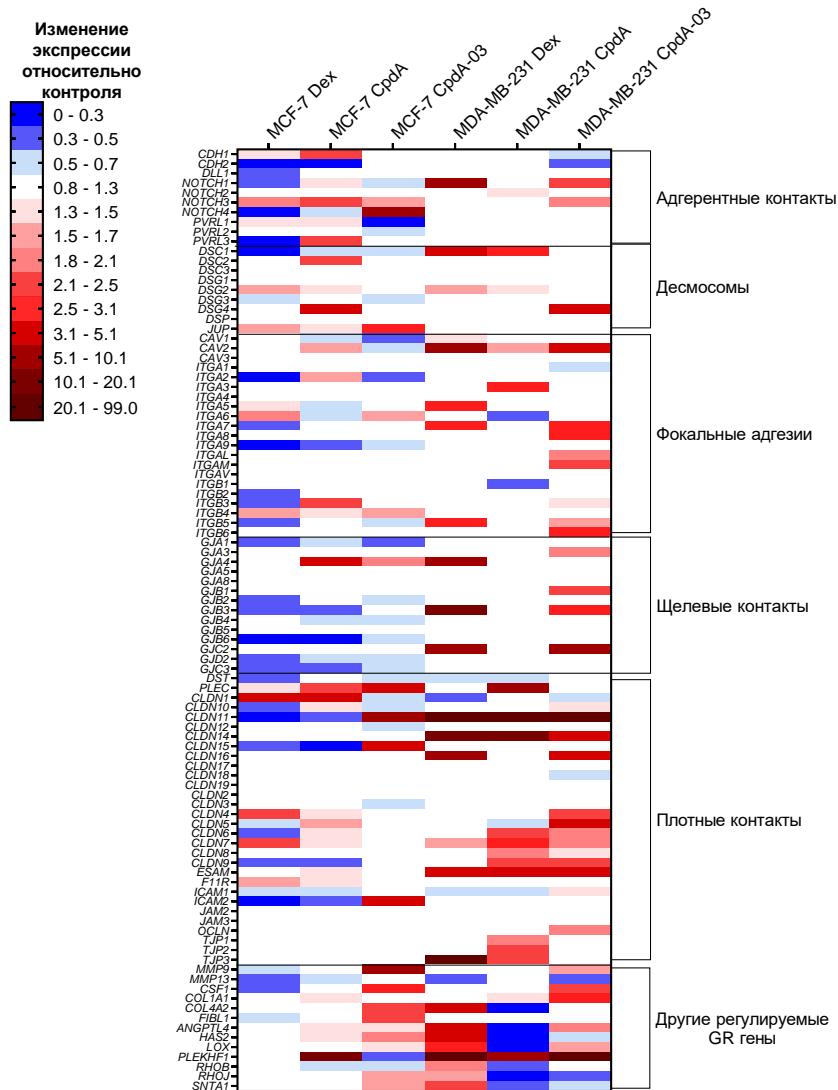
Клетки предварительно культивировали 120 с 10 нМ Dex, CpdA или CpdA-03. Степень миграции оценивали через 24 ч инкубации в камерах Бойдена. Доля мигрировавших клеток в контрольных образцах принята за 100%. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 11 – Оценка влияния лигандов GR на миграцию в камерах Бойдена

Таким образом было показано, что GC Dex стимулирует направленную миграцию клеток ТН РМЖ.

Анализ действия лигандов GR на экспрессию генов и белков – регуляторов межклеточной адгезии

Методом количественной ПЦР с использованием панели праймеров набора RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, кат. № PAHS-213Z) был проведен скрининг действия исследуемых соединений на экспрессию генов белков межклеточных контактов различных типов (Рисунок 12). Дополнительно были проанализированы гены, подобранные на основании сопоставления литературных данных о маркерах метастазирования РМЖ и о мишенях GR в трансформированных клетках. В клетках линии MDA-MB-231 под действием Dex наблюдали активацию во всех исследуемых группах генов. Наиболее выраженный активационный эффект наблюдался в группе генов семейства клаудинов (*CLDN 7, 11, 14, 16*) и коннексинов (*GJA4, GJB3, GJC2*). В клетках линии MCF-7 при действии GC Dex наблюдалось снижение экспрессии 32 генов, регулирующих адгерентные, плотные, щелевые контакты и десмосомы, а также генов металлопротеиназ 9 и 13 (*MMP9, MMP13*).

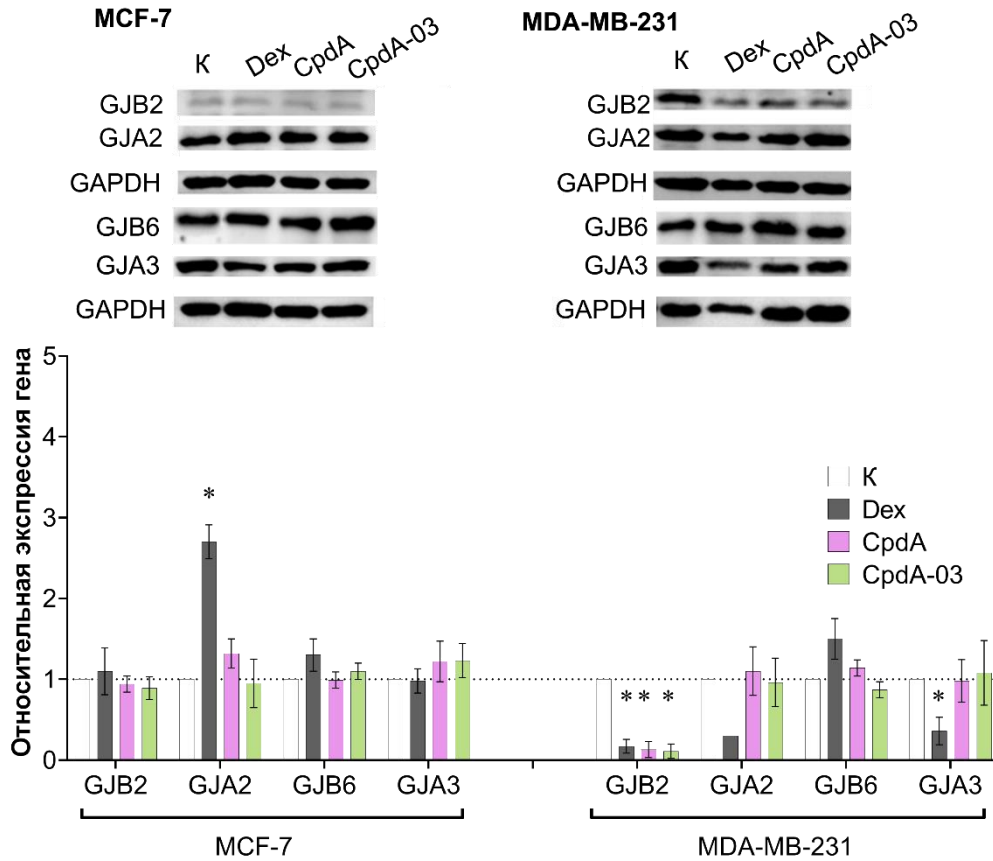


Клетки инкубировали с 10 нМ Dex, CpD или CpD-03 в течение 120 ч. Экспрессию генов анализировали методом количественной ПЦР с использованием набора RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, кат. № PAHS-213Z). Результаты нормировали на экспрессию *ACTB*, *GAPDH* и *RPLP0* и представляли в виде тепловой карты изменения экспрессии относительно принятой за 1 в контрольных образцах

Рисунок 12 – Оценка изменения экспрессии зависимых генов, ассоциированных с адгезионными свойствами клетки, при действии лигандов GR

Поскольку Dex стимулирует миграционную активность клеток и влияет на гены семейства коннексинов (GJ), был проведен анализ экспрессии ряда коннексинов, для которых описана роль в метастазировании РМЖ, на уровне белка методом вестерн-блоттинга. Показана низкая экспрессия GJB2 в клетках люминального РМЖ, в то время как в клетках ТН РМЖ белок определяется на высоком уровне (Рисунок 13). За 120 ч Dex, CpD и CpD-03 снижали экспрессию GJB2 в клетках MDA-MB-231 в 5,9, 7,8 и 9,2 раза, соответственно. Dex за 120 ч

индуцировал снижение экспрессии GJA2 и GJA3 в 3,3 и 2,8 раза в клетках ТН РМЖ MDA-MB-231. В то же время в линии MCF-7 люминального РМЖ экспрессия GJA2 при действии Dex повышалась в 2,7 раз.



Уровень белков GJB2, GJA2, GJB6 и GJA3 в клетках линий MCF-7 и MDA-MB-231 определяли после инкубации с 10 нМ Dex/CpdA/CpdA-03 в течение 120 ч методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня GAPDH. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 13 – Оценка влияния лигандов GR на экспрессию белков семейства коннексинов в клетках РМЖ

Таким образом было показано, что в клетках люминального (MCF-7) наблюдается пониженная в сравнении с ТН (MDA-MB-231) подтипом РМЖ базальная экспрессия GJB2 и GJB6, при чем GJB2 в клетках MCF-7 практически не детектируется. Также показано, что SEGRA в отличие от Dex не снижают экспрессию опухолевого супрессора GJA3 в клетках ТН РМЖ.

ВЫВОДЫ

1. CpдA-03 конкурентно связывается с GR в клетках в присутствии тритий-меченного Dex.
2. CpдA-03 обладает высокой стабильностью при долговременном хранении в водных растворах в широком диапазоне pH, а также при действии УФ-излучения.
3. CpдA и CpдA-03 обладают GR-зависимым антипролиферативным эффектом в отношении клеток РМЖ люминального, ТН, ТН HER2-слабопозитивного и HER2-позитивного подтипов, а также вызывают арест в G1 фазе клеточного цикла клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231.
4. CpдA-03 не вызывает трансактивацию GR, о чем судили по отсутствию фосфорилирования GR по Ser211, ядерной транслокации GR, а также изменению маркерных генов (*GILZ*, *FKBP51*, *DDIT4*) в клетках РМЖ.
5. Общее число регулируемых GR-респонсивных генов зависит от клеточной линии. В клетках ТН РМЖ Dex повышает экспрессию кластеров генов, вовлеченных в регуляцию продукции цитокинов, формирование клеточных контактов, передачи сигналов и ответа на стресс, CpдA в данном подтипе РМЖ вызывает противоположное изменение в транскрипции генов данных кластеров. В клетках люминального РМЖ эффекты исследуемых соединений выражены гораздо слабее.
6. Активация GR при действии SEGRA и Dex оказывает противоположное влияние на воспалительные сигнальные пути в клетках РМЖ люминального и ТН подтипов.
7. Долговременная культивация клеток ТН РМЖ с Dex приводит к усилению их миграционной активности, в то время как в клетках люминального РМЖ наблюдается обратный эффект. SEGRA CpдA и CpдA-03 в отличие от Dex не влияют на миграционную активность клеток РМЖ *in vitro*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Использование данных об изменениях в профиле экспрессии генов и белков при действии GC на клетки РМЖ позволит определить стратегию по снижению побочных эффектов GC. Также на основании полученных данных разнонаправленности действия GC в клетках РМЖ различных подтипов рекомендуется проводить анализ уровня GR и оценивать риск нежелательных последствий при включении в терапию GC при выборе терапии РМЖ. Пациентам с ТН РМЖ, принимавшим курсы GC, рекомендуется отслеживание динамики уровня экспрессии GR для определения вероятности развития возможных отдаленных метастазов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные данные расширяют представление о механизмах действия препаратов класса SEGRA в отношении клеток злокачественных новообразований и затрагивают поиск рациональной стратегии использования лигандов GR в химиотерапии РМЖ различных подтипов. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости выбора стратегии использования GC/SEGRA в химиотерапии РМЖ разных подтипов. В связи с существенной долей ТН РМЖ (около 20 тыс. пациентов ежегодно) в структуре онкологической заболеваемости в России, введение в клиническую практику препаратов класса SEGRA в перспективе позволит проводить терапию РМЖ с меньшим проявлением негативных побочных эффектов трансактивации GR. Полученные в ходе исследования приоритетные данные могут быть использованы для дальнейшего изучения молекулярных механизмов реализации трансактивационного/транспрессорного механизмов действия GR в нормальных и опухолевых тканях *in vitro* и *in vivo*. Соединение SpdA-03 далее планируется использовать для проведения доклинических и клинических исследований по повышению эффективности адьювантной химиотерапии РМЖ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Жидкова, Е. М.** Молекулярные механизмы действия нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора в клетках рака молочной железы / **Е.М. Жидкова**, В.П. Максимова, Д.Д. Григорьева, В.З. Ширинян, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // Успехи молекулярной онкологии. – 2024. – Т. 11. – № 3. – С. 92–102. (**Журнал ВАК**)
2. **Zhidkova, E. M.** Synthesis and anti-cancer activity of the novel selective glucocorticoid receptor agonists of the phenylethanolamine series / **E.M. Zhidkova**, L.R. Tilova, T.I. Fetisov, K.I. Kirsanov, E.P. Kulikov, A.D. Enikeev, I.V. Budunova, G.A. Badun, M.G. Chernysheva, V.Z. Shirinian, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – № 16. – P. 8904. (**Журнал ВАК**)
3. Badun, G. Preparation of tritium labeled dexamethasone phosphate and its application to assess the affinity of ligands for glucocorticoid receptors / G. Badun, **E. Zhidkova**, M. Chernysheva, A. Enikeev, M. Yakubovskaya, E. Lesovaya // Radiochemistry. – 2024. – Vol. 66. – № 4. – P. 514–521. (**Журнал ВАК**)
4. Тилова, Л. Р. Синтез нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора и оценка его противоопухолевой активности на модели гемобластозов *in vitro* / Л. Р. Тилова, А.В. Савинкова, А.К. Бочаров, К.А. Кузин, О.И. Борисова, **Е.М. Жидкова**, К.И.

Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Л.В. Яминова, В.З. Ширинян, Е.А. Лесовая // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6.

5. **Жидкова, Е. М.** Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора SPDA на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов / **Е.М. Жидкова**, К.А. Кузин, Л.Р. Тилова, 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.

6. Grigoreva, D. D. Autophagy activation in breast cancer cells *in vitro* after the treatment with PI3K/AKT/mTOR inhibitors / D.D. Grigoreva, **Е.М. Zhidkova**, E.S. Lylova, A.D. Enikeev, K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *Advances in Molecular Oncology*. – 2022. – Vol. 9. – № 4. – P. 61-70.

7. **Жидкова, Е. М.** Скрининг эффективности и антипролиферативного действия потенциальных ингибиторов DDIT4 на моделях рака молочной железы / **Е. М. Жидкова**, Д.Д. Григорьева, Е.С. Лылова, В.П. Максимова, Г.Р. Сагитова, Г.И. Хайриева, Е.С. Трапезникова, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // Сибирский онкологический журнал. – 2022. – Т. 21. – № 3. – С. 50-60.

8. Григорьева, Д. Д. Ингибирование глюкокортикоид-индуцированной экспрессии REDD1 рапамицином в клетках рака молочной железы / Д.Д. Григорьева, **Е.М. Жидкова**, Е.С. Лылова, Д.В. Демина, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9. – № 1. – С. 42-47.

9. Лылова, Е. С. Ингибирование Экспрессии гена REDD1 для снижения побочных эффектов глюкокортикоидов / Е.С. Лылова, А.В. Савинкова, **Е.М. Жидкова**, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская, И.В. Будунова, Е.А. Лесовая // Сибирский онкологический журнал. – 2020. – Т. 19. – № 6. – С. 73-81.