

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

На правах рукописи

Жидкова Екатерина Михайловна

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

3.1.6 Онкология, лучевая терапия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
доцент
Лесовая Екатерина Андреевна

Москва - 2024 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Молекулярные аспекты патогенеза рака молочной железы	13
1.1.1 Молекулярная классификация рака молочной железы	13
1.1.2 Нарушения сигнальных путей в клетках РМЖ.....	16
1.2. Молекулярные механизмы метастазирования РМЖ.....	18
1.3. Роль активации аутофагии в развитии химиорезистентности РМЖ	21
1.4. Современные подходы к терапии рака молочной железы	23
1.5. Глюкокортикоиды: механизмы действия и применение в комбинированной химиотерапии РМЖ.....	25
1.5.1. Механизмы действия рецептора глюкокортикоидов.....	26
1.5.2. Участие рецептора глюкокортикоидов в регуляции сигнальных путей в клетках	30
1.5.3. Специфика реализации механизма действия глюкокортикоидов в терапии рака молочной железы	33
1.5.4. Побочные эффекты глюкокортикоидов	33
1.5.5. Влияние глюкокортикоидов на прогрессию РМЖ	34
1.5.6. Способы снижения побочных эффектов и повышения терапевтического действия глюкокортикоидов	36
1.6. Селективные модуляторы рецептора глюкокортикоидов.....	37
1.6.1. Compound A и его синтетические аналоги	41
1.7 Заключение к обзору литературы	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1. Приборы и реактивы	47
2.2. Радиолигандный анализ конкурентного связывания.....	48
2.3. Оценка пролиферативной активности	49
2.4. Получение трансформированных клеток	49
2.4.1. Трансформация компетентных клеток и выделение плазмидной ДНК.....	49
2.4.2. Получение вируса и инфекция клеток	50
2.5. Анализ клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии	50
2.6. Выделение белка и вестерн-блоттинг	51
2.7. Выделение РНК и обратная транскрипция.....	53
2.8. Количественная полимеразная цепная реакция	53

2.8.1 Оценка экспрессии генов - регуляторов миграции и метастазирования	53
2.8.2. Оценка экспрессии GR-зависимых генов.....	54
2.9. Люциферазный репортерный анализ	57
2.10. Исследование миграционной активности	57
2.10.1. Миграция клеток через поры камеры Бойдена	57
2.10.2. Тест на застание раны	58
2.11 Ядерно-магнитный резонанс	58
2.12 Анализ целостности щелевых контактов.....	58
2.13 Молекулярный докинг	59
2.14. Статистическая обработка данных	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	60
3.1 Оценка аффинности CpdA-03 к GR.....	60
3.2 Оценка стабильности молекулы CpdA-03	62
3.3 Антипролиферативные эффекты SEGRA	65
3.4 Оценка трансактивационного и транскрепторного потенциала CpdA и CpdA-03 в клетках РМЖ.....	70
3.4.1 Исследование влияния CpdA и CpdA-03 на транслокацию GR в ядро клеток РМЖ.....	70
3.4.2 Оценка влияния CpdA и CpdA-03 на уровень фосфорилирования GR в клетках РМЖ	71
3.4.3 Анализ изменения экспрессии GR-зависимых генов	73
3.4.4 Анализ транскрепторного потенциала SEGRA и GC в клетках РМЖ.....	77
3.5 Оценка действия SEGRA и GC на миграционную способность клеток РМЖ	79
3.5.1 Тест на застание раны	79
3.5.2. Миграция в камерах Бойдена.....	80
3.5.2 Интегральный анализ влияния лигандов GR на щелевые контакты.....	82
3.5.3 Анализ действия лигандов GR на экспрессию генов и белков – регуляторов межклеточной адгезии.....	84
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ.....	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень ее разработанности

Активность рецептора глюкокортикоидов (GR) важна для многих нормальных физиологических процессов, а также определяет развитие ряда патологий, в частности, в развитии резистентности к химиопрепаратам и в стимуляции прогрессии и метастазирования солидных опухолей. После связывания с лигандом рецептор может действовать как транскрипционный фактор, взаимодействуя в форме димера с собственными, глюкокортикоид-респонсивными элементами (GRE) в промоторах и энхансерах ряда генов, реализуя механизм трансактивации, или формировать сложные гетеродимерные комплексы с другими транскрипционными факторами, подавляя их активность и опосредуя механизм трансрепрессии [82, 287]. Основные терапевтические эффекты глюкокортикоидов (GC) опосредованы преимущественно белок-белковыми взаимодействиями активированного рецептора с другими факторами транскрипции и последующей трансрепрессией генов [82, 287]. При этом побочные эффекты в основном реализуются за счет трансактивации GRE. Наиболее распространенными нежелательными явлениями при использовании GC в терапии солидных опухолей, в частности, рака молочной железы (РМЖ) являются остеопороз, диабет, а также усиление метастазирования и развитие резистентности клеток опухоли к химиопрепаратам [96, 172, 264, 393]. Одной из проблем в исследовании эффектов GC является их неоднозначность при применении в лечении опухолей различных нозологических форм.

Молочная железа занимает второе место среди наиболее распространенных локализаций в общей (оба пола) структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями (12,3%) [1]. РМЖ является ведущей патологией у женского населения (22,5%) [1]. В 2023 г. выявлено 82499 случаев РМЖ [1]. За счет разнообразия РМЖ по гормональному статусу, эффекты GC при лечении разных типов 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 экспрессией HER2) и тройной негативный (ТН), характеризующийся отсутствием экспрессии ER α , HER2 и рецептора прогестерона (PR) [17, 278]. Основой терапии ER α -позитивного РМЖ являются длительные курсы приема антагонистов эстрогена, а в терапии HER2-позитивного РМЖ применяются моноклональные антитела к HER2. Клетки ТН РМЖ лишены специфических терапевтических мишеней (ER α и HER2), в связи с чем в основе терапии лежит резекция опухоли в комбинации с проведением курсов химиотерапии. 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 [17, 99, 110, 182, 262, 278].

По данным клинических исследований, GC увеличивают терапевтический интервал цитотоксических химиопрепаратов и препятствуют развитию синдрома анорексии-кахексии, снижая тошноту и повышая аппетит у онкологических больных [172]. Экспозиция опухолевых клеток люминального РМЖ к GC приводит к подавлению их эстроген-зависимой пролиферации [383], однако в клетках ТН РМЖ активация GR ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [264]. 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 [72]. В настоящее время отсутствует дифференцированный подход к применению GC при терапии РМЖ. GC назначают симптоматически при люминальном РМЖ и в качестве обязательного компонента при проведении неoadъювантной химиотерапии ТН РМЖ. Однако длительный прием GC способствует развитию серьезных метаболических осложнений. Также GC могут увеличивать риск метастазирования ТН РМЖ и усиливать пролиферацию опухолевых клеток [264, 393]. 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 апоптоза, трансактивации и транскрепрессии, а также на молекулярные механизмы развития метастазирования.

Снижение негативных эффектов активации GR возможно по двум направлениям: ингибирование экспрессии генов, опосредующих побочные эффекты GC, и замена GC на препараты, селективно активирующие транскрепрессорный механизм GR (SEGRA). Первый подход предполагает выявление и подавление GR-зависимых генов и соответствующих им белков, ассоциированных с трансактивацией GR. Второй подход основан на избирательном запуске ДНК-независимой транскрепрессии, ключевая роль которой в реализации терапевтических эффектов GC широко описана в литературе [82, 287, 288]. В последние десятилетия одним из перспективных направлений является разработка селективных модуляторов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA), рассматриваемых в качестве альтернативы GC в клинической практике. Подобно GC, SEGRA связываются с GR, однако приобретаемая рецептором конформация в случае SEGRA препятствует его гомодимеризации и активирующему фосфорилированию Ser211 [243, 311, 313], таким образом, не происходит

запуска трансактивации, обуславливающей 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 [51, 197, 243]. Однако круг потенциальных потребителей лекарственных препаратов на основе SEGRA достаточно широк, и включает также онкологических больных с различными гематологическими и солидными злокачественными новообразованиями. Описано довольно много молекул, имеющих активность SEGRA и включающих в себя как производные стероидного ряда, так и низкомолекулярные нестероидные соединения. Однако следует отметить, что до реализации на рынке противоопухолевых препаратов не дошла ни одна из исследуемых молекул. В связи с этим, перспективным направлением в этой области является разработка лекарственных препаратов группы SEGRA для применения в онкологической практике.

Основой настоящего исследования послужило обнаружение трансрепрессорных свойств малой природной молекулы Compound A (CpdA), источником которого является африканское растение *Salsola tuberculatiformis* Botschantzev [46, 211]. Свойства данного соединения подробно изучены и описаны. CpdA имеет высокую аффинность к GR, вызывает трансреессию GR, проявляет противовоспалительные свойства *in vitro* и *in vivo* [45, 46, 196]. В исследованиях, проведенных ранее в нашей лаборатории на моделях опухолей кроветворной системы, показано, что CpdA обладает противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo* [199, 417]. Стоит отметить, что антипролиферативная активность CpdA продемонстрирована также в отношении клеточных линии РМЖ *in vitro* [67]. Основываясь на вышеприведенных данных, можно сделать вывод о том, что изучение эффектов потенциальных SEGRA, позволяющее найти более безопасные и эффективные лекарственные препараты для использования в клинической онкологической практике является хорошо обоснованным и перспективным направлением современных исследований в области экспериментальной онкологии.

К сожалению, молекула CpdA разлагается в водных растворах до высокоактивного производного азиридина, что делает невозможным дальнейшую разработку в качестве препарата и применение в клинической практике. В связи с этим, в нашей лаборатории 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 линии Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза и В-клеточной мантийноклеточной лимфомы *in vitro*, а также

перевиваемых ксенографтах и аллографтах лимфомы у мышей *in vivo* [417]. Настоящее исследование представляет собой более углубленное исследование CpdA-03: анализ стабильности, определение его аффинности к GR в клеточной системе *in vitro*, а также исследование активности на моделях другой нозологии, РМЖ различных подтипов.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе промоции метастазирования ТН РМЖ при действии GC, изучены недостаточно. В мировой литературе, несмотря на долгую историю заболевания и большие выборки пациентов, описаны только эпидемиологические, а также разрозненные экспериментальные данные. В связи с этим, часть работы посвящена уточнению молекулярных механизмов действия GC в отношении клеток РМЖ. В связи с существенной долей ТН РМЖ (до 20 тыс. пациентов ежегодно) в структуре онкологической заболеваемости, введение в клиническую практику препаратов класса SEGRA в перспективе позволит проводить терапию РМЖ с меньшим проявлением негативных побочных эффектов трансактивации GR. Таким образом, изучение молекулярных механизмов действия новых SEGRA на клетки РМЖ представляется чрезвычайно актуальным.

Настоящая работа посвящена оценке активности и исследованию молекулярных механизмов действия SEGRA CpdA и CpdA-03 в отношении клеток РМЖ в сравнении с GC. Дизайн представленного исследования основан на имеющихся теоретических и экспериментальных данных о биологических эффектах GC и SEGRA. Исследование направлено на анализ молекулярных основ реализации побочных эффектов GC, а также оценку терапевтического потенциала SEGRA CpdA-03 в клеточной модели РМЖ. Задачи, решаемые в ходе данного исследования, затрагивают поиск рациональной стратегии использования лигандов GR в химиотерапии РМЖ различных подтипов. Учитывая существенный вклад ТН РМЖ в структуру онкологической заболеваемости, решение данных задач представляется чрезвычайно актуальным, так как открывает перспективы оптимизации и персонализации терапии, механизмы которой реализуются посредством активации GR.

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 CpdA и CpdA-03 на клеточных моделях РМЖ.
4. Оценить трансактивационный и трансрепрессорный потенциал CpdA и CpdA-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.

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 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 на широкой панели сравнительное исследование 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. А именно, на 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 значимые преимущества перед GC.

Теоретическая и практическая значимость

Современные исследования роли ядерных рецепторов в патогенезе РМЖ не ограничиваются только анализом роли рецепторов эстрогена и прогестерона. 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 позволяет 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 ранее малоизученной роли GC в усилении метастазирования ТН РМЖ. В то же время, полученные данные свидетельствуют о возможности более избирательной активации GR-зависимых изменений клеточного сигналинга с противоопухолевой направленностью 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 [1, 3, 110]. 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.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составляли комплексный и системный подходы к изучению функционирования GR в культивируемых клетках РМЖ ряда линий 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 подсчёта 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 сублинии клеток 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 коммерчески 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 интегральные методы (метод застывания 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).

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 трансрепрессии.
4. CpдA и CpдA-03 не вызывают ядерной транслокации и трансактивационных пострасляционных модификаций GR.
5. В отличие от дексаметазона, CpдA и CpдA-03 не оказывают стимулирующего влияния на миграционную способность клеток РМЖ ТН подтипа.

Соответствие диссертации паспорту научной 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.)».

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами молекулярно-биологических исследований, полученные автором новые данные согласуются с имеющимися в литературе отдельными данными по изучению механизмов действия GC и SEGRA. Все эксперименты выполнены минимум в трех биологических повторах, с использованием отрицательных и положительных контролей. Достоверность полученных данных основана на адекватном выборе и корректном использовании в исследовании современных методов анализа, полученные результаты обработаны с использованием современных методов математической статистики.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликована 21 публикация, в том числе, 3 статьи 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).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав (литературный обзор, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования, обсуждение полученных результатов), выводов, заключения, списка использованных сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация изложена на 140 страницах печатного текста, иллюстрирована 6 таблицами, 32 рисунками. Список литературы включает 417 источников, из которых 11 отечественных и 406 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место как по распространенности, так и по смертности у женского населения в России и мире (Рисунок 1) [1, 49, 317]. На конец 2023 года число пациентов, состоящих под диспансерным наблюдением с диагностированными ЗНО молочной железы в РФ, составил 22,5 % от общего числа пациентов [1].

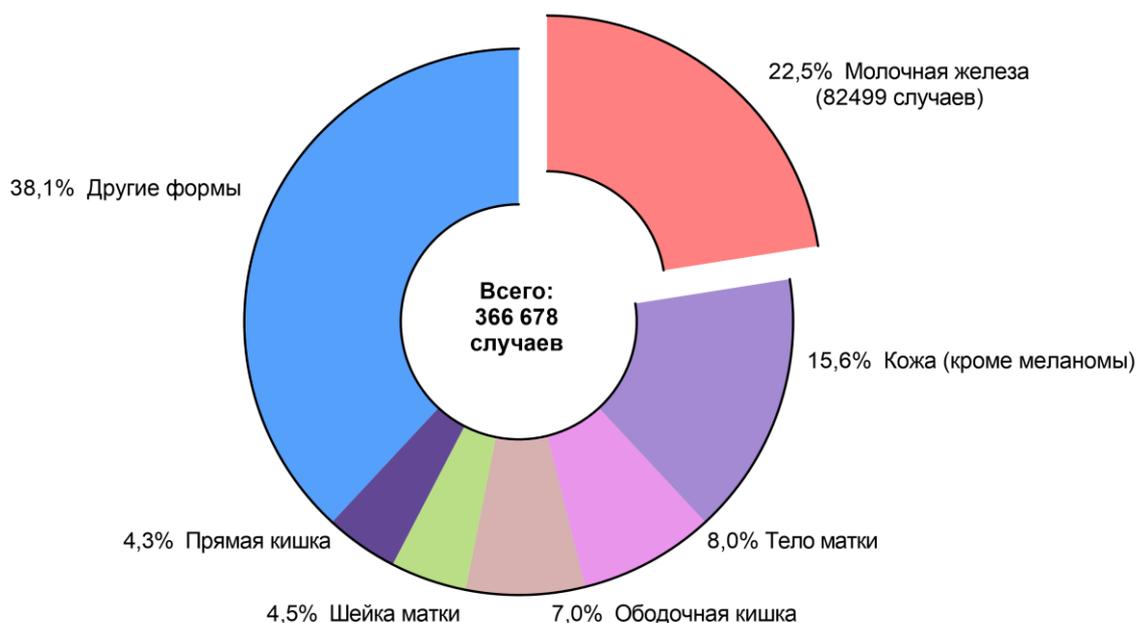


Рисунок 1 - Общее число новых случаев ЗНО среди женщин в РФ в 2023 (адаптировано из [1, 49, 317]).

Главным фактором риска развития РМЖ считается возраст, в частности, приближение к менопаузе. К другим факторам риска относятся: поздние роды, применение заместительной гормонотерапии в период постменопаузы, злоупотребление алкоголем и курение, лишний вес, диабет II типа, а также наследуемые мутации [165, 272, 369]. У женщин, имеющих мутации в генах *BRCA1* и/или *BRCA2*, риск развития РМЖ может составлять до 80% [19, 272, 388].

1.1 Молекулярные аспекты патогенеза рака молочной железы

1.1.1 Молекулярная классификация рака молочной железы

Традиционные системы классификации РМЖ основаны на размере опухоли, наличии метастазов в регионарных лимфатических узлах и отдаленных метастазов, гистологических

маркерах и морфологии. Дополнительно при выборе стратегии терапии учитывается возраст пол и пациента (пре- и постменопауза), а также коморбидные патологии.

Современная молекулярная классификация РМЖ в общем виде основана на различиях в экспрессии рецепторов эстрогена (ER α), прогестерона (PR) и рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER2) и включает три основных подтипа: ER α -позитивный, тройной негативный (ТН) и HER2-позитивный [268, 278]. В подавляющем большинстве (70%) случаев РМЖ является гормонозависимым [1, 105, 268]. ER α -позитивный тип РМЖ подразделяется на два подтипа (А и В), отличающихся уровнем экспрессии HER2. Подтип люминальный В характеризуется повышенной экспрессией маркера пролиферативной активности Ki67, что связано с повышенной вероятностью мутации гена опухолевого супрессора p53, и более низкой, чем при люминальном А подтипе, экспрессии ER α и ER α -зависимых генов [42, 58, 278]. РМЖ с ER α -негативным фенотипом включает два биологически различных типа опухолей: тройной негативный (ТН, базальноподобный) и HER2-позитивный [195, 283]. Такие опухоли имеют менее благоприятный по сравнению с ER α -позитивными прогноз [42, 195]. Опухоли, не экспрессирующие ER α и PR, но с повышенным уровнем HER2, выделяют в группу HER2-позитивного РМЖ [11, 77, 282]. ТН РМЖ характеризуется отсутствием экспрессии ER α , PR и HER2. Клетками-предшественниками ТН РМЖ в подавляющем большинстве случаев являются базальные клетки протоков и альвеол молочной железы [278, 298]. В отдельный подтип выделяют опухоли с ТН фенотипом, в которых наблюдается низкая экспрессия клаудинов (CLDN) 3, 4, 7 и E-кадгерина (CDH1) [91, 135, 284, 302]. Хотя данный тип и отличается от ТН по иммуногистохимическим показателям и клинической картине в целом, его не всегда идентифицируют, и часто применяют схемы лечения, разработанные для ТН РМЖ. Полагают, что данный тип карцином развивается из недифференцированных клеток молочной железы [105, 195].

Мутации в генах опухолевых супрессоров BRCA1/2 выявляются в 15% случаев ТН РМЖ [9]. Опухоли одного подтипа могут иметь разный профиль экспрессии генов, отличаться по миграционному потенциалу и другим признакам, что подтверждается данными транскриптомного анализа и результатами секвенирования единичных клеток РМЖ [17, 71, 109]. Так, более чем в половине случаев РМЖ, оценивающийся на данный момент как HER2-негативный, характеризуется низкой экспрессией HER2, и выделение таких опухолей в отдельный HER2-слабопозитивный подтип имеет важное клиническое значение [222, 353]. В таблице 1 приведены характеристики молекулярных подтипов РМЖ.

Таблица 1 - Характеристики молекулярных подтипов РМЖ [195, 278, 282–284, 298, 305, 324, 334]

Тип РМЖ		Молекулярные характеристики			Общая характеристика и прогноз	Частота
		<i>ERα</i>	<i>PR</i>	<i>HER2</i>		
Люминальный/ ERα-позитивный	A	++	+ / -	-	Благоприятный прогноз Наиболее высокая выживаемость Метастазы в кости, печень, легкие	до 70%.
	B	+ / ++	+ / -	++	Неблагоприятный прогноз Метастазы в головной мозг, кости, лимфатические узлы	10-15%
Тройной негативный/ Базальноподобный		-	-	-	Агрессивное течение Нечувствительность к таргетной гормональной терапии Метастазы в висцеральные органы и головной мозг	10-25%
HER2-позитивный		-	-	++	Неблагоприятный прогноз Метастазы в висцеральные органы и головной мозг	5-10%
HER2- слабопозитивный		-	-	+	Активация HER2-зависимой пролиферации в ответ на лучевую или гормональную терапию	до 65% всех опухолей молочной железы (до 60% среди ERα-позитивных и до 40% среди TN)
Низкоклаудиновый		-	-	-	Низкая экспрессия клаудинов (CLDN3, 4, 7)	7-14%

Используемая в современной практике классификация РМЖ по гормональному статусу была предложена еще в 2000 году [278], и в течение последующих лет её расширяли, уточняли и дополняли дополнительными характеристиками. Очевидно, что характеристики по трем молекулярным признакам недостаточно для того, чтобы определить прогноз развития заболевания и стратегию терапии. Для диагностики РМЖ на ранних стадиях, а также для определения курса терапии анализируются генетические (мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* (*p53*), *PTEN* и др.) и сывороточные (такие как раковый антиген СА 15-3 (Cancer Antigen 15-3) и карциноэмбриональный антиген СЕА) маркеры [93, 95], дополняющие молекулярную классификацию РМЖ.

1.1.2 Нарушения сигнальных путей в клетках РМЖ

Многие современные исследования направлены на поиск новых прогностических маркеров: изменений в профиле экспрессии микроРНК, некодирующих РНК или других эпигенетических модификаций [10, 219, 228, 270]. Например, было обнаружено, что не только мутации, но и метилирование промотора *BRCA1* коррелирует с плохим прогнозом и низкой выживаемостью пациентов с ТН РМЖ [270]. Также прогностическое значение имеет определение уровня метилирования генов, кодирующих виментин [203], септин 9 [281], синдекан 2 [253], ингибитор циклин-зависимых киназ 2А (*CDKN2A*) [387] и др. [265]. Более того, наравне с метилированием промоторов определенных генов, в ходе прогрессии РМЖ изменяется общий уровень метилирования ДНК и гистоновых модификаций, а также профиль экспрессии ферментов эпигенетической регуляции транскрипции: ДНК-метилтрансфераз (DNMT), метил цитозинового оксигеназ (ТЕТ) и др. [219, 265].

В клетках РМЖ часто наблюдают мутации в генах компонентов сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR, MAPK, NFκB и др. Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR регулирует клеточный метаболизм, пролиферацию, апоптоз, ангиогенез [240]. Мутация в гене *PIK3CA* приводит к избыточной пролиферации клеток опухоли и встречается при каждом из подтипов РМЖ. Подобные мутации обнаруживаются у 16% пациентов с ТН РМЖ, 28% - с люминальным А, в 42% - люминальным В, в 31% - HER2-позитивным РМЖ [224, 307]. Гиперэкспрессия HER2 в клетках РМЖ коррелирует с повышенным уровнем фосфорилированной АКТ (активной формой АКТ), а также с множественной лекарственной устойчивостью к химиотерапевтическим препаратам (таким как доксорубин, паклитаксел, 5-фторурацил и др.) [183].

Конститутивная активация транскрипционного фактора (ТФ) NFκB при РМЖ ассоциирована с большим размером опухоли, высоким риском метастазирования и гиперэкспрессией HER2 [309]. Активация NFκB приводит к усилению экспрессии цитокинов (например, интерлейкина IL1β и фактора некроза опухоли TNFα), матриксной металлопротеиназы 9 (MMP9), проапоптотического белка Bcl-2, циклина D1 (CCND1), циклин-зависимой киназы 2 (CDK2), и c-Мус, что приводит к избыточной пролиферации клеток [139, 176, 259, 277]. Активация NFκB опосредуется в том числе сыворотко- и GC-индуцируемой киназой 1 (SGK1), которая является субстратом mTOR и вовлечена в регуляцию клеточной пролиферации, адгезии клеток, гормональной резистентности и метастазирования РМЖ [126, 161, 331, 411].

Изменения экспрессии активирующего протеина 1 (AP-1) наблюдают при различных ЗНО [34, 332]. AP-1 формирует гетеродимерные комплексы Jun, Fos, ATF и MAF [34, 332]. Jun и Fos контролируют синтез ДНК и продвижение клетки по фазам клеточного цикла. Связываясь с собственными респонсивными элементами, AP-1 контролирует экспрессию различных белков: цитокинов, TNF-α, интерлейкинов, интерферона IFNγ, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF, белков семейства MMP, коллагеназы 1 и стромелизина) [34, 332]. В свою очередь, для ряда интерлейкинов (IL1β [103, 216, 241, 294], IL6 [31, 87, 184], IL8 [358, 399] описано опухоль-промотирующее действие в отношении РМЖ.

Как было сказано выше, прогрессия РМЖ сопровождается нарушением экспрессии и/или мутациями TP53 [227, 360], что приводит к нарушению клеточного ответа на повреждения ДНК. Ряд работ описывают роль изменения экспрессии DDIT4 (REDD1, DNA Damage Inducible Transcript 4, Транскрипт 4, индуцируемый повреждением ДНК) в патогенезе РМЖ. Уровень DDIT4 в клетке непосредственно регулируется белком p53 в ответ на повреждения ДНК. При этом функция DDIT4 тесно связана с подавлением сигнального пути mTOR [89, 330]. Для TN и HER2-позитивного подтипов, показано, что пролиферация и выживание опухолевых клеток в условиях гипоксии может быть опосредовано активацией сигнального пути mTOR и стабилизацией экспрессии HIF-1α вследствие подавления DDIT4 [187]. Недавние исследования выявили корреляцию экспрессии DDIT4 с неблагоприятным прогнозом для пациентов с РМЖ [65].

Таким образом, РМЖ представляет собой ЗНО, характеризующееся большим многообразием путей молекулярного патогенеза, что требует индивидуального подхода в выборе стратегии лечения. Основными проблемами терапии РМЖ остаются появление отдаленных метастазов и развитие резистентности к терапевтическим препаратам.

Молекулярные механизмы данных процессов являются одним из важнейших предметов исследования биомедицинской науки.

1.2. Молекулярные механизмы метастазирования РМЖ

Более 80% случаев (до 66 тыс. пациенток в год) РМЖ классифицируются как инвазивная протоковая карцинома. Инвазивная форма РМЖ характеризуется утратой межклеточной адгезии, снижением числа миоэпителиальных клеток и нарушением базальной мембраны, что приводит к инфильтрации клеток опухоли и их миграции в окружающие ткани [268]. Средняя 5-летняя выживаемость пациентов с метастазами РМЖ составляет не более 30% [99]. РМЖ метастазирует во многие органы и ткани, включая кости, печень, мозг, легкие, лимфатическую систему [416].

Образование метастазов является следствием процессов, происходящих в клетках первичной опухоли, ее микроокружения и микроокружения метастатической ниши, в частности, баланса внеклеточных цитокинов в органе-мишени метастазирования. Клетки опухоли способны приобретать мезенхимальный фенотип, пластичность и подвижность под влиянием различных внешних факторов, включая действие химиотерапевтических агентов и радиотерапии. Метастатические ниши в органах-мишенях метастазирования также формируются под действием экзогенных факторов (в том числе, лекарственных препаратов) [271, 274], а также экзосом и цитокинов, выделяемых в кровяное русло клетками первичного опухолевого очага [15, 373].

Основным процессом опухолевой прогрессии и метастазирования является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) (Рисунок 2). ЭМП представляет спектр состояний между полностью эпителиальным фенотипом и полностью мезенхимальным процесс. В процессе ЭМП эпителиальная клетка может приобретать мезенхимальные признаки [94, 192, 218]. Вследствие ЭМП в клетках происходит потеря эпителиальной полярности, реорганизация цитоскелета, приобретение мезенхимальных маркеров (N-кадгерин, виментин, α -SMA) и активация ТФ-ЭМП (Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2 и др.). Активация ЭМП сопровождается разрушением базальной мембраны за счет увеличения секреции протеаз, в том числе матриксных металлопротеиназ (ММП), и изменениями в транскрипции ряда мембранных белков [94, 192, 218]. В ходе многокомпонентного процесса метастазирования клетки приобретают пластичность, которая позволяет им адаптироваться к условиям в кровотоке и очагах метастазирования. Приобретенная пластичность позволяет клеткам совершать обратный мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП), который сопровождается усилением

экспрессии эпителиальных маркеров (Е-кадгерин, окклюдина, цитокератины и др.) [94, 192, 218].

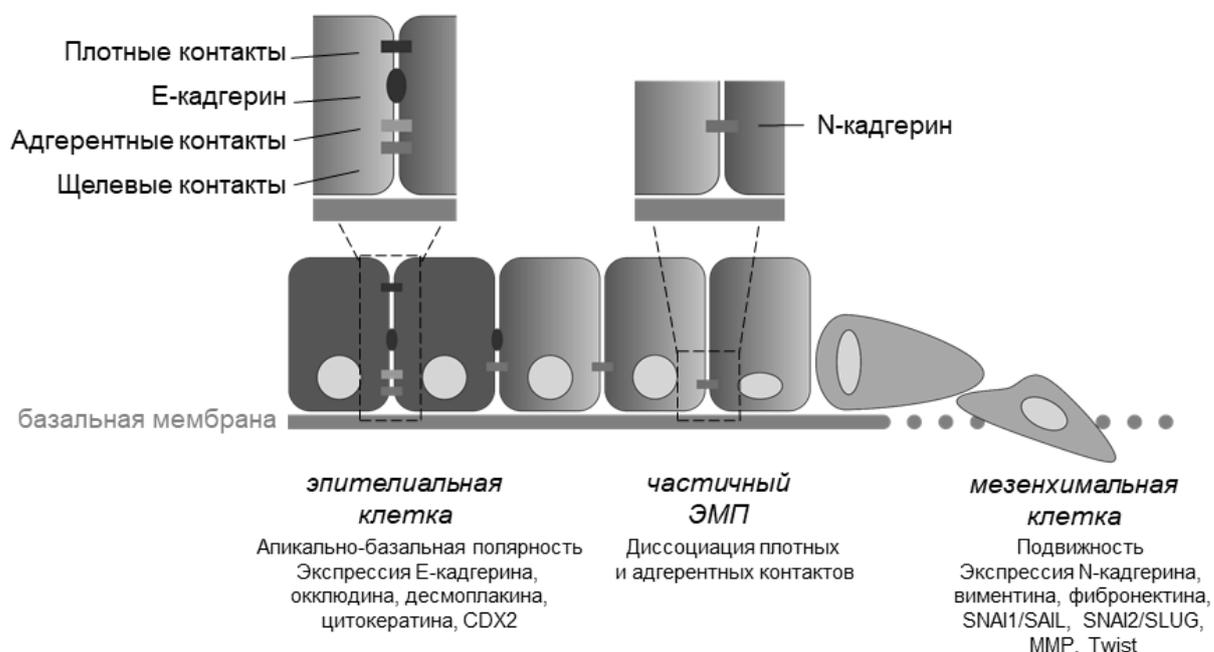


Рисунок 2 - Основные этапы активации ЭМП [94, 192, 218]

Как было сказано выше, способность к метастазированию зависит в том числе от молекулярно-биологического типа РМЖ [121, 261, 329, 416]. Экспрессия ER α в клетках РМЖ ассоциируется с активацией киназ Src, Ras, PI3K/Akt, MAPK [54] и, как следствие, высоким пролиферативным индексом и риском метастазирования, в связи с этим так важно провести максимально полную эрадикацию опухоли до стимуляции миграционной активности. В исследованиях *in vivo* показано, что гиперэкспрессия HER2 стимулирует метастазирование в мозг, лимфатические узлы, легкие, кости [242, 260, 363].

Наиболее часто метастазы РМЖ выявляются в костях (до 70% случаев) [107, 242, 244, 391]. Печень является второй по частоте случаев нишей метастазирования РМЖ (40-50%) [303]. Метастазы в центральную нервную систему (ЦНС) выявляют у 15-25% пациентов с РМЖ [59, 81]. Также нишами метастазирования РМЖ в более редких случаях становятся легкие и лимфатическая система [121, 261, 329, 416].

Большинство типов опухолей могут метастазировать в кости [76]. В том числе, кости являются приоритетной нишей для метастазирования РМЖ люминального В подтипа [107, 244, 329]. В исследовании, включавшем 7064 пациентов с ранним РМЖ, в течение 8,5 лет метастазы в костях обнаружили у 22% [129]. В среднем выживаемость таких пациентов составляет 40-70

месяцев [141, 326]. На молекулярно-генетическом уровне, с метастазированием в кости связывают усиление экспрессии генов *PTHRP*, *RANKL*, *SHH*, *ITGAV*, *NOTCH*, *TGFβ*, *VCAM-1*, *CXCR4* [12, 169, 238, 347, 381]. Печень является распространённым для всех солидных опухолей очагом метастазирования. На сегодняшний момент стратегия лечения метастазов РМЖ в печень основана на химио- или гормонотерапии в комплексе с паллиативной терапией [90], а медиана выживаемости таких пациентов составляет в среднем 4-8 месяцев [29]. Метастазирование РМЖ в печень во многом определяется индуцируемым TNFα повышением экспрессии E-селектина в клетках печени [400], а также гиперэкспрессией CXCR4, CD44 и E- и N-кадгерина [18, 400] и формированием интегриновых комплексов [350]. На сегодняшний день не выявлено четкой зависимости развития вторичного очага опухоли в печени от молекулярного подтипа РМЖ. Метастазы в легких чаще выявляются у пациентов с базальным фенотипом РМЖ [238]. Показано, что активация NOTCH, WNT и транскрипция генов *MMP1*, *ID1*, *CXCL1*, *EREG* и *COX-2* связаны с метастазированием РМЖ в легкие [220, 257]. Также, регулируя различные сигнальные пути, активация аутофагии может подавлять или способствовать ЭМП [143]. Метастазы в головной мозг, как правило, ассоциированы с плохим прогнозом и ухудшением качества жизни, что довольно часто является критическим показателем для пациентов с солидными опухолями, такими как РМЖ [59, 81]. Вероятность метастазирования в головной мозг зависит в том числе от гормонального статуса РМЖ [59, 81]. Известно, что HER2-позитивный и TN подтипы РМЖ обладают большим потенциалом для метастазирования в ЦНС по сравнению с ERα-позитивными опухолями [174, 261, 329, 359, 389]. Известно, что усиление экспрессии сиалилтрансферазы ST6GALNAC5, фактора роста HBEGF и циклооксигеназы COX2 в клетках РМЖ усиливает их адгезию к эндотелию мозга и облегчает переход сквозь гематоэнцефалический барьер [44].

Одним из факторов, определяющих мишень метастазирования, является формирование пре-метастатической ниши. Они формируются за счет изменений в регуляции иммунных клеток, ангиогенеза и сосудистой проницаемости, перепрограммирования метаболизма и ремоделирования стромы [205]. Ниша для метастазирования может быть сформирована как под действием первичного очага опухоли, так и под действием внешних факторов: воздействие ксенобиотиков (в том числе лекарственных препаратов), физических и химических повреждений, вызывающих хроническое воспаление и нарушения кровотока [205, 274].

Ранние этапы процесса метастазирования включают координацию микроокружения и межклеточных сигналов, изменение формы клеток. В основе процессов инвазии и метастазирования лежит дестабилизация межклеточных контактов опухоли [94, 192, 218]. Клеточные контакты – макромолекулярные структуры, соединяющие клетки друг с другом и с

внеклеточным матриксом [213, 328]. Межклеточные и фокальные контакты ассоциированы с актиновым цитоскелетом, десмосомы и полудесмосомы – с промежуточными филаментами. За образование разных типов межклеточных контактов отвечают специфические для каждого типа молекулы. Фокальные контакты представляют собой большие интегриновые комплексы, взаимодействующие с белками межклеточного матрикса (такими как паксиллин, винкулин, коллаген, ламинин, тромбоспондины, витронектин, фибронектин) [231, 390]. Плотные контакты полностью опоясывают клетку, регулируя проницаемость мембраны по всей ее площади [385]. Основными компонентами функциональных комплексов плотных контактов являются клаудины (CLDN), тетраспанины, окклюдины [385]. Помимо инвазии и метастазирования, плотные контакты играют роль в регуляции пролиферации клеток, путем формирования комплексов с циклином D1 [56]. Межклеточные контакты играют важную роль в проявлении миграционной активности клеток. В образование данного типа контактов вносят вклад трансмембранные белки: кадгеринины (CDH), нектины, везатины [213, 328]. Щелевые контакты (Gap Junctions, GJ) участвуют в процессах роста и дифференцировки молочной железы [30, 308]. Строительными единицами этого вида контактов являются белки семейства коннексинов. В клетках РМЖ обычно наблюдается пониженный уровень экспрессии белков семейства коннексинов. Однако несколько молекул данного класса играют роль в прогрессии и метастазировании и могут служить прогностическим фактором [354]. Коннексины 26 (GJB2) и 43 (GJA1) также играют противоречивую роль в прогрессии опухолей различного происхождения. В процессе РМЖ наблюдается гиперэкспрессия GJB2 [63]. Гиперэкспрессия коннексина 30 (GJB6) чаще наблюдается у пациентов с люминальным РМЖ и при этом связана с тенденцией к более длительной общей выживаемости в группе с ТН и HER2-позитивным РМЖ [354]. Повышение GJA1 за счет активации WNT1 [137] опосредует формирование адгезии клеток метастатического РМЖ к ткани легкого [98] и в целом связана с неблагоприятным прогнозом для пациентов с ER-негативным РМЖ [354]. Однако исследования *in vivo* в модельной системе РМЖ свидетельствуют о том, что GJA1 может также играть роль опухолевого супрессора [354].

В прогрессию РМЖ вовлечено большое число клеточных процессов. В частности, ряд исследований показал особую роль активации процесса аутофагии в развитии резистентности РМЖ к химиотерапии.

1.3. Роль активации аутофагии в развитии химиорезистентности РМЖ

Аутофагия – естественный процесс, регулируемый каскадом PI3K/Akt/mTOR, при котором клетка катаболизирует макромолекулы, в том числе, ксенобиотики [301, 375].

Активация аутофагии происходит посредством изменения экспрессии ряда генов семейства *ATG* (autophagy-related genes), изменения активности белков семейства беклинов [168, 365] и ферментов эпигенетической регуляции транскрипции (DNMT, GLP, KMT и др.) [322]. Различают три основных типа аутофагии: макроаутофагию, микроаутофагию и шаперон-опосредованную аутофагию (Рисунок 3). Запуск макроаутофагии приводит к сборке специализированных двухмембранных органелл – аутофагосом, которые впоследствии сливаются с лизосомами, образуя аутофаголизосомы. В аутофаголизосоме происходит расщепление компонентов клетки. Макроаутофагия способствует изменению профиля экспрессии онкогенов и генов супрессоров опухолевого роста, устранению поврежденных органелл и уменьшению хромосомной нестабильности и приводит к гибели клетки [39, 269, 405]. Макроаутофагия является инструментом для терапии опухолей, клетки которых устойчивы к индукции апоптоза [39, 159, 263].

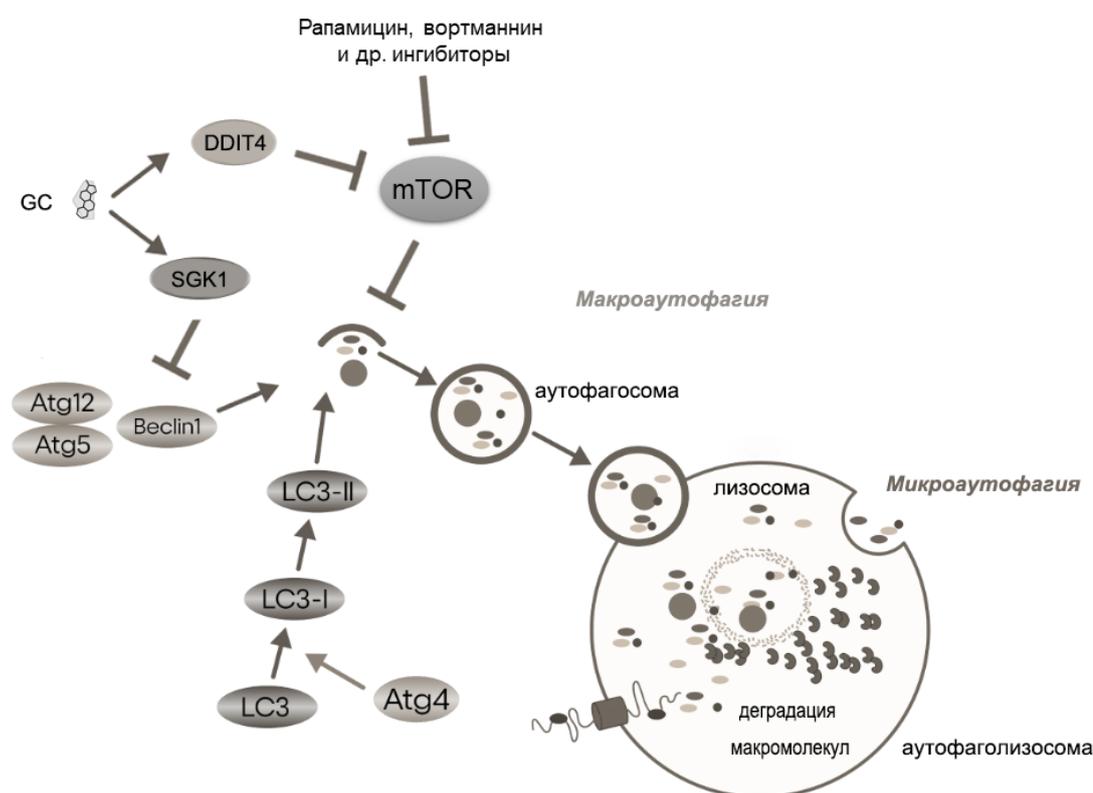


Рисунок 3 - Схема активации аутофагии в клетках (адаптировано из [39, 168, 269, 365, 375, 405])

В условиях недостатка питательных веществ и энергии, а также стресса, во многих опухолях происходит активация микроаутофагии, которая сопровождается развитием

устойчивости клеток к метаболическому стрессу и приобретением резистентности к терапевтическим препаратам (доксорубину, гемцитабину, доксициклину, антрациклинам, тамоксифену) [64, 68, 79, 301]. Индукция микроаутофагии позволяет клеткам избегать активации не только апоптоза, но и других типов клеточной гибели, например, аноикиса [106, 223]. При запуске микроаутофагии происходит сдвиг баланса в сторону блокировки апоптоза и поддержания цикла трикарбоновых кислот, в том числе за счет лизиса поврежденных органелл лизосомами [384]. Активация аутофагии приводит к усилению экспрессии N-кадгерина, виментина, IL6 [177] и стимулирует инвазию и метастазирование в легкие *in vivo* [210].

Как было сказано выше, в клетках РМЖ часто наблюдают мутации/нарушение экспрессии PI3K, PTEN, AKT, MYC, FOXA1, CTCF, SGK1, а также DNMT1, EZH2, GLP, KMT2a/b и др. опосредуют резистентность к терапевтическим препаратам [116, 256, 293]. Направленная регуляция mTOR-зависимого процесса аутофагии является потенциальным инструментом для устранения резистентности к химиопрепаратам. Так, ингибиторы PI3K (3-метиладенин, гидроксихлорохин) способствуют возобновлению чувствительности к лапатинибу клеток HER2-позитивного резистентного РМЖ [64], Ингибитор PI3K LY-294002 снижает ER-опосредованную резистентность опухоли к паклитакселу, а также усиливает чувствительность клеток к радиотерапии [217]. Ингибитор mTORC1 рапамицин способствует восстановлению чувствительности клеток различных ЗНО к химиотерапевтическим агентам [149, 338]. Применение ингибиторов DNMT1 восстанавливает чувствительность клеток ER-позитивного РМЖ к тамоксифену [286], а гидроксихлорохин в комбинации с ингибитором гистоновых деацетилаз улучшает выживаемость мышей с ксенографтами ТН РМЖ [291].

Многие исследования в области терапии РМЖ посвящены разработке препаратов, способных компенсировать данные нарушения и восстановить или усилить чувствительность клеток опухолей к химиотерапевтическим средствам.

1.4. Современные подходы к терапии рака молочной железы

Как было сказано выше, терапия гормон-зависимого (ER-позитивного) РМЖ основывается на операции и последующих длительных (более 5 лет) курсах антиэстрогеновых препаратов, в частности, тамоксифена и торемифена. HER2-позитивный РМЖ характеризуется более агрессивным фенотипом и худшим прогнозом [33, 105], однако амплификация и гиперэкспрессия HER2 при РМЖ ассоциирована с высокой эффективностью таргетной анти-HER2 терапии в комбинации с химиотерапией [282, 348]. В случае развития резистентности и рецидива гормон-зависимого РМЖ, а также для лечения эстроген-независимых подтипов РМЖ

назначают адъювантную терапию [5]. Адъювантная терапия предполагает проведение курса химио- или гормонотерапии после хирургического удаления опухоли.

У 25% пациентов прием тамоксифена курсами более 5 лет неэффективен в силу развития резистентности клеток РМЖ к препарату [74, 160, 256]. Также показано, что резистентность к тамоксифену опосредована изменениями в эпигеноме клетки. Например, aberrантная экспрессия KDM2B и EZH2 опосредует снижение экспрессии кофактора ER α белка GREB1 (gene regulated in breast cancer 1 protein) и ведет к развитию резистентности к лигандам ER α [319, 394]. Ткани матки подвержены гиперплазии под действием селективных модуляторов ER α [113]. В связи с этим, прием тамоксифена более 2 лет приводит к повышенному риску развития эндометриоза, аденомиоза, миомы матки, гиперплазии эндометрия [37], саркомы матки [178], и значимо повышает риск рака эндометрия [36].

В настоящий момент в терапии ТН и гормонрезистентного РМЖ применяют препараты группы антрациклинов (доксорубицин, эпирубицин) и таксанов (паклитаксел, доцетаксел). Противоопухолевая активность антрациклинов обуславливается их способностью интеркалировать между азотистыми основаниями в молекулы ДНК в ядре и митохондриях клетки и ковалентно связываться с белками-регуляторами репликации и транскрипции [47], ингибируя синтез ДНК, РНК или белка, что в итоге приводит к гибели клетки [62]. Таксаны, в свою очередь, обладают цитостатическим действием за счет ингибирования микротрубочек [233]. Применяемые в терапии ТН и гормон-резистентного РМЖ антрациклины и таксаны обладают высокой цитотоксичностью [115], их применение вызывает у пациентов тошноту, развитие стоматита, нарушение работы пищеварительной системы и алопецию, неврологические расстройства (галлюцинации, вертиго, головокружение), кардиотоксичность и аплазию костного мозга [62, 142, 209, 221].

Модуляторы активности ферментов эпигенетической регуляции транскрипции проходят клинические испытания в качестве средств комбинированной терапии РМЖ [225]. Реактивация эпигенетически измененного ER α при ТН РМЖ открывает перспективы для применения антиэстрогеновой терапии при данном типе РМЖ. Первые попытки использовать в качестве реактиватора ER α деметилятор децитабин были предприняты еще в 2015 году в клиническом испытании (КИ) NCT01194908. Также ингибиторы HDAC вориностат, LBH589 и азацитидин исследуют в качестве компонентов комплексной иммуно- и антиэстрогеновой терапии РМЖ в КИ NCT02395627, NCT04190056, NCT01194908, NCT02374099 [355, 356]

Общей проблемой для всех видов терапии солидных опухолей является развитие резистентности к используемым терапевтическим агентам. Молекулярные механизмы развития лекарственной устойчивости разнообразны и ведут к множественным изменениям в процессах

жизнедеятельности опухолевой клетки. Отбор наиболее устойчивых клонов при этом может происходить как под действием непосредственно противоопухолевого препарата, так в связи с перестройкой внутренних процессов под действием других компонентов терапии (включая лечение острых или хронических сопутствующих неонкологических заболеваний). Резистентность к гормональным препаратам, антрациклам и таксанам может развиваться в том числе за счет активации аутофагии в неопластических клетках.

Одной из глобальных проблем противоопухолевой терапии является не только увеличение показателей выживаемости, но и сохранение качества жизни больных за счет минимизации побочных эффектов лечения. Все подходы к терапии РМЖ разрабатываются индивидуально для каждого пациента и включают, помимо основных цитотоксических агентов, адъювантные препараты, направленные на улучшение терапевтического ответа и ослабления проявления нежелательных последствий.

Для расширения терапевтического интервала и снятия побочных эффектов (тошнота, рвота, снижение аппетита) терапевтических препаратов при комбинированной терапии РМЖ применяют ГС (дексаметазон и преднизолон).

1.5. Глюкокортикоиды: механизмы действия и применение в комбинированной химиотерапии РМЖ

ГС - стероидные гормоны, которые участвуют в таких физиологических процессах, как регуляция циркадных ритмов, поддержание водного и электролитного баланса, иммунный ответ, регуляция сердечно-сосудистой системы, настроения и когнитивных функций, а также половое созревание и лактация [38, 124, 140, 245, 323]. Рецептор ГС (GR) экспрессируется практически во всех клетках человеческого организма на различном уровне в зависимости от типа клеток или ткани, и опосредует не только ГС-зависимые реакции, но и большое количество процессов, регулируемых другими стероидными гормонами [248]. Синтетические аналоги эндогенных ГС широко применяются в лечении ЗНО. В терапии острого лимфобластного лейкоза они используются в качестве цитотоксических агентов первой линии терапии. В терапии РМЖ и других солидных ЗНО ГС применяют в качестве адъюванта для снижения побочных эффектов химиотерапевтических препаратов. ГС позволяют расширить терапевтический интервал основного препарата и снизить проявление его токсических эффектов. Синтетические ГС обладают иммуносупрессивным, противовоспалительным и противорвотным эффектами, а также антипролиферативным действием на клетки ЗНО

различных типов [170, 361]. Более того, GC способны устранять вызванную химиотерапевтическими препаратами гипертензию [297].

1.5.1. Механизмы действия рецептора глюкокортикоидов

Суперсемейство ядерных рецепторов насчитывает примерно 50 белков, регулирующих важнейшие метаболические процессы в клетках [300]. Действие GC опосредованно GR, который представляет собой ТФ, способный регулировать экспрессию более 10 тысяч генов. Интересно, что даже в отсутствие лиганда, GR способен подавлять экспрессию 260 и активировать экспрессию 343 генов [300]. Молекулярные эффекты GC реализуются быстро: в течение 10 мин после обработки GC дексаметазоном, можно наблюдать повышение транскриптов в ядрах чувствительных клеток [371]

Как и другие стероидные рецепторы, GR имеет доменную структуру, включающую [248, 316]:

1. N-концевой домен, в котором находится трансактивационный субдомен 1.
2. ДНК-связывающий домен, отвечающий за специфическое связывание рецептора с GC-респонсивными элементами (GRE) и содержащий субдомены димеризации и ядерной локализации 1.
3. Лиганд-связывающий домен, который отвечает за связывание с GC, а также с белками теплового шока, содержит субдомен ядерной локализации 2 и трансактивационный субдомен 2, обеспечивающий связывание с кофакторами.

В неактивной форме GR находится в цитоплазме клетки, в составе гетеромерного комплекса, в который входят белки теплового шока (HSP90, HSP70 или HSP56), FK506 – связывающий белок (FKBP), циклофилин СуР-40, белок р23 и другие [189, 212, 288]. Когда GC связывается с рецептором, цитоплазматический комплекс разрушается. Рецептор в комплексе с GC подвергается фосфорилированию и транслоцируется в ядро [41, 189, 212, 288]. В ядре GR активирует или подавляет экспрессию генов-мишеней путем прямого взаимодействия с GRE и nGRE (негативными GRE) в промоторах генов или путем связывания с композитными GRE (при образовании комплекса с другими ТФ); также возможно прямое подавление активности других ТФ – тетеринг (tethering) (Рисунок 4) [41, 189, 212, 288, 407]. Основные сайты связывания GR в геноме обнаружены в областях отдаленных энхансеров (distal enhancers). Для реализации трансактивационного механизма в ядре, GR связывается с хроматиновой петлей с GRE-содержащим энхансером, стерически приближенным к промоторной области целевого гена [84, 232].

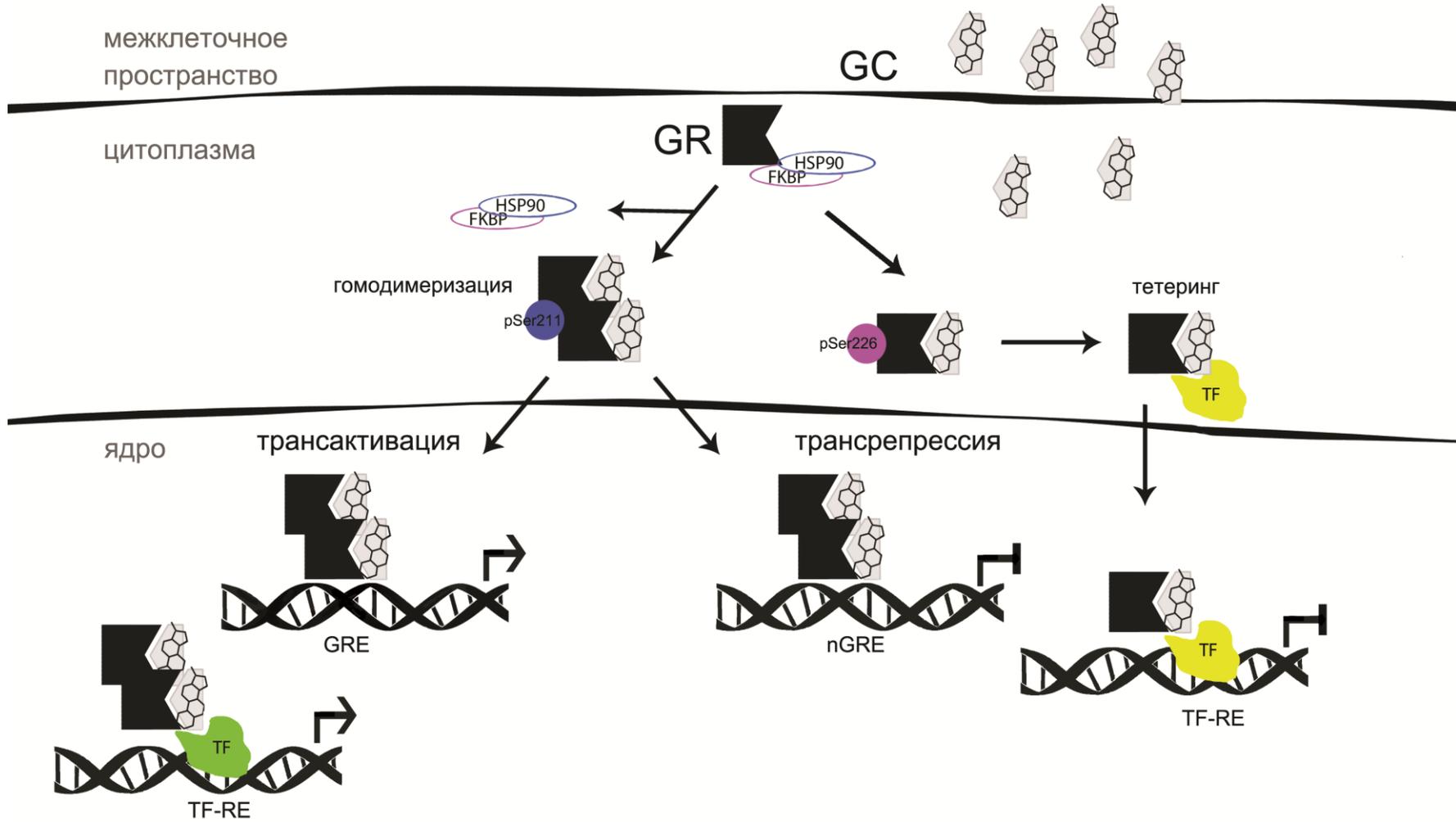


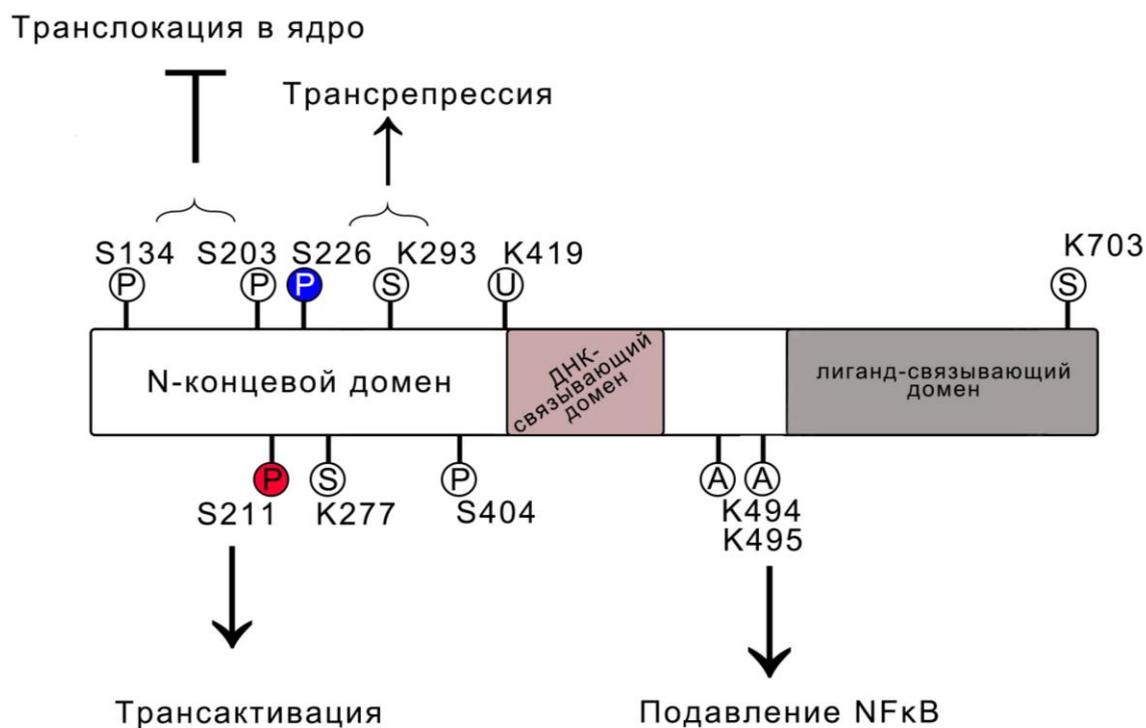
Рисунок 4 - Механизмы действия GR в клетке (адаптировано из [41, 189, 212, 288, 407])

Основной механизм действия GR заключается в связывании гомодимера GR-GR с GRE. GRE представляет собой последовательность 15 пар нуклеотидов (AGAACA_nnnnTGTTCT), с двумя палиндромными повторами, соединенными линкером из трех случайных оснований [214, 229, 234].

В результате альтернативного сплайсинга формируются две основные изоформы, GR α и GR β , которые имеют отличия в строении С-концевого участка [181]. GR α содержит 50 аминокислот, в то время как изоформа GR β является «укороченным» сплайсинговым вариантом и содержит 15 аминокислот [202]. Поскольку лиганд-связывающий домен располагается именно на С-конце GR, при его укорочении рецептор теряет способность связываться с GC, при этом сохраняя способность связываться с некоторыми агонистами GR, например, с RU486 [181, 202]. Также особенностью GR β является его способность присутствовать в ядре клеток в свободной форме и подавлять экспрессию GR-зависимых генов за счет привлечения белков семейства HDAC [173, 249, 404]. Соотношение изоформ GR α и GR β определяет чувствительность клеток к GC [248], причем усиление экспрессии укороченного варианта является одним из механизмов развития резистентности к GC [378]. Опосредованная повышением уровня GR β резистентность к GC описана при таких заболеваниях как астма [127], ревматоидный артрит [86], язвенный колит [351], системная красная волчанка [279], острый лимфобластный лейкоз и хронический лимфоцитарный лейкоз [186].

Функциональная активность GR регулируется модификацией аминокислотных остатков. Фосфорилирование GR осуществляется по различным положениям, и определяет дальнейший спектр функциональной активности рецептора (Рисунок 5) [108]. Гиперфосфорилирование по Ser134 происходит вследствие клеточного стресса (недостаток глюкозы, оксидативный стресс, действие ультрафиолета, осмотический шок) и ассоциировано с экспрессией специфической группы генов стрессового ответа [108]. Лиганд-независимое фосфорилирование по Ser134, а также ацетилирование по Lys154 опосредует протеасомную деградацию GR в ядре [108, 157]. Фосфорилирование по Ser211 связано с транслокацией GR в ядро, связыванием с кофакторами и усилением транскрипции [24, 379] и является маркером трансактивации GR. Ядерный экспорт, а также трансрепрессорная активность GR ассоциированы с фосфорилированием по Ser226 под действием киназы JNK [379]. Фосфорилирование по Ser404 происходит при реализации как трансактивации, так и трансрепрессии. Функциональная активность GR также регулируется ацетилированием по положениям Lys494 and Lys495, и сумоилированием по положениям Lys297, Lys313, Lys721, Lys293 [108, 147]. Именно ацетилирование определяет способность GR связываться с p65 субъединицей NF κ B [156], а сумоилирование придает рецептору конформацию, обеспечивающую реализацию трансрепрессорного механизма как за

счет связывания с pGRE, так и за счет белок-белковых взаимодействий с другими ТФ [147, 379].



S – серин, K – лизин, P – фосфорилирование, S – сумоилирование, U – убиквитинилирование

Рисунок 5 – Посттрансляционные модификации GR, адаптировано из [408]

GR экспрессируется в большинстве типов клеток, причем экспрессия и функции белка тканеспецифичны [295, 361]. Функциональная активность GR зависит от его количества, внутриклеточной локализации, а также уровня экспрессии регуляторных белков. В клетках РМЖ описан различный уровень GR (от 0 до 90% GR-позитивных клеток в образце ткани) [207, 35, 54]. В исследовании, проведенном иммуногистохимическими методами, на 287 интактных образцах РМЖ и 26 образцах нормальной ткани, не было показано статистически значимых различий в экспрессии GR в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. При этом более высокий уровень GR наблюдался в случаях дольковой, а не протоковой карциномы [14]. В других исследованиях показано, что высокий уровень экспрессии коррелирует с более короткой безметастатической выживаемостью пациентов с ТН РМЖ, получавших химиотерапию [125]. Исследование проводилось непосредственно в период проведения курсов химиотерапии, которые предполагают системное применение GC, из чего можно сделать вывод, что

показатели выживаемости связаны с активацией GR. Таким образом, активация GR может являться прогностическим фактором при РМЖ.

1.5.2. Участие рецептора глюкокортикоидов в регуляции сигнальных путей в клетках

GR является членом семейства стероидных рецепторов, представителями которого также являются ER α , PR, рецепторы андрогенов (AR), минералокортикоидов, витамина Д, рецептор гормонов щитовидной железы. Стероидные рецепторы обладают высокой консервативностью ДНК-связывающего домена, поэтому способны связываться с респонсивными элементами других рецепторов семейства [123, 151].

GR α способен образовывать гетеродимерный комплекс с AR и модулировать его активность [337]. GC вызывают активацию и ядерную транслокацию AR в клетках дермальных сосочков [190], эпителия почки обезьяны [50], клетках печени [53]. AR детектируется в 80% клеток РМЖ, причем чаще в опухолях люминального подтипа, чем в ТН РМЖ [112, 247] и его экспрессия ассоциирована с благоприятным прогнозом, ранними стадиями, меньшим поражением лимфатических узлов, более длительной безрецидивной выживаемостью [101, 144]. Ко-экспрессия AR и GR в клетках ТН РМЖ коррелирует с низким риском развития рецидива, а эксперименты *in vitro* показали, что дигидротестостерон подавляет дексаметазон-индуцированную миграцию клеток РМЖ [166].

GC и адреналин являются основными эндогенными регуляторами ответа организма на стресс. Активация соответствующих сигнальных путей практически всегда происходит синхронно. Поэтому синтетические аналоги GC, попадая в организм, могут повышать экспрессию бета-адренорецепторов (BAR), в то же время, катехоламины, содержание которых повышается в результате дистресса, часто сопровождающего течение ЗНО, активируют GR [66, 200, 204, 377]. Хронический стресс, приводящий к постоянной активации BAR, промотирует пролиферацию РМЖ [280], ангиогенез, развитие кахексии, изменения в опухолевом микроокружении [325]. Более того, GR и BAR имеют ряд общих генов-мишеней (в частности, гены ангиогенеза и пролиферации *VEGF*, *PTGS2*, *ERK*, *MMP1*, 2, 9, mTOR-зависимые гены, активация которых реализуется через сигнальный путь Wnt, ген, кодирующий стрессовый сенсор *DDIT4* и др.), ассоциированные с приобретением резистентности к химиопрепаратам, развитием атрофических побочных эффектов, а также регуляцией процессов васкуляризации, инвазии и диссеминации опухолевых клеток [8, 13, 32].

Гомология ДНК-связывающих доменов GR и рецептора прогестерона (PR) составляет 90%, что позволяет рецепторам иметь общие респонсивные элементы [273]. Гены, одновременно регулируемые GR и PR, включают в себя иммунофиллины, различные ядерные белки и ТФ, а также онкогены [372]. PR регулирует экспрессию киназы *GSKI* (glucocorticoid-regulated kinase) [102, 117, 193], которая играет роль в патогенезе РМЖ, стимулируя прогрессию, инвазию и метастазирование опухоли [306]. В присутствии дексаметазона GR и PR формируют гетеродимерные комплексы, регулируя PR-зависимую экспрессию генов *GREB1*, *STAT5A*, *ELF5* и *SNAI1* [252] [170], что приводит к ингибированию PR-зависимой пролиферации PR/GR-позитивных клеток *in vitro* [21].

Особый интерес представляют исследования зависимости активности GR и ER α , поскольку на ранних стадиях ER α -негативного РМЖ высокий уровень экспрессии GR коррелирует с худшим прогнозом [264]. GR связывается с респонсивными элементами ER α за счет белок-белковых взаимодействий мономеров рецепторов. GC способны подавлять активность ER α , экспрессию ER α -респонсивных генов [154, 237, 383, 398], что может объяснять антипролиферативное действие GC на клетки люминального РМЖ [264].

Взаимодействие между ER α и GR способствует прогрессии РМЖ [170, 239, 371] также за счет активации кофакторов TFF1 и GREB1 [43]. Однако также GR опосредует трансрепрессию ER α -респонсивных генов, в том числе, в клетках РМЖ [100, 398]. Так, дексаметазон активирует экспрессию сульфотрансферазы, которая участвует в процессе метаболической деактивации эстрогенов [118].

Способность препаратов вносить изменения в эпигеном клетки не затрагивает изменение последовательности ДНК в материнской клетке, однако приобретенные изменения наследуются дочерними клетками. GR, связываясь с ДНК, приобретает способность рекрутировать и влиять на активность различных ферментов эпигенетической регуляции. Так, GR влияет на гистоновые модификации, метилирование ДНК, экспрессию ферментов семейств гистоновых деацетилаз (HDAC), DNMT и TET [40]. После связывания GR с GRE происходит повышение активности ферментов TET, одновременно с подавлением DNMT [386]. В то же время комплекс GR-GC связывается с ТФ, привлекающими гистоновые ацетилтрансферазы, которые индуцируют ацетилирование и метилирование гистонов [406].

Трансрепрессорный механизм, как было сказано выше, может реализовываться как за счет прямого взаимодействия GR с pGRE, так и за счет тетеринга. Мономер GR, связываясь с pGRE, становится платформой для формирования мультибелкового комплекса, включающего корепрессор ядерных рецепторов SMRT/NCOR и белки семейства HDAC, что ведет к подавлению экспрессии [153].

Показано, что ДНК-связывающий домен GR взаимодействует с респонсивными элементами AP-1, p65 (субъединица NFκB), за счет чего реализуется подавление экспрессии ряда провоспалительных генов [104, 152, 164, 380]. Также мономер GR может взаимодействовать с NFκB и AP-1, когда они находятся в ДНК-связанном состоянии и также репрессировать экспрессию генов [152]. В целом, круг регулируемых GR процессов очень широк (Таблица 2), а гены, регулируемые GC, могут быть вовлечены сразу во многие клеточные процессы.

Таблица 2 – Избранные биологические мишени GR и регулируемые ими процессы [104, 152, 164, 208, 380]

Процесс	Эффекторы GR
Воспалительный ответ	NF-κB, AP-1
	PTGS2 (COX2), iNOS, EDN1, IL10, IL1RN, IL6, IL6R, TNF, ANXA4, HIF1α
Метаболизм	ASPH, GDPD1, GLUL, GOT1, H6PD, PDP1, CYB561, AK2, AMPD3, XDH, SPSB1 GLUT
Передача сигналов	BMPER, DIRAS2, DUSP1, NFKBIA, PIK3R1, PLD1, RASA3, RGS2, SESN1, SGK1, SPHK1, TNF, USP2
Циркадные ритмы	PER1, PER2
Ответ на стресс	BCL6, DDIT4 (REDD1), PDCD7, SESN1, SGK1
Транскрипция (факторы транскрипции)	ARID5B, CEBPB, FOSL2, KLF13, KLF9, NFKBIA, TBL1XR1, TNFAIP3, TSC22D3, VDR, ZFP36, ZHX3, ATF4, CEBPA, CEBPB, семейство CREB, семейство POU, семейство STAT, ELF5
Эпигенетическая регуляция транскрипции	HDAC, DNMT, TET
Внутриклеточный транспорт, эндо и экзоцитоз	ANXA4, EHD3, MERTK, PLEKHF1 AQP1, SLC10A6, SLC19A2, SLC22A5
Пролиферация	АКТ, TSC1, WNT, GSK1, DDIT4, ANGPTL4, семейство циклинов (CCN), ERFF1, ERK
Ангиогенез	VEGF, VEGFR, IL-8, IL-6, MMP-2, MMP-9
Аутофагия	mTOR, DDIT4, SGK1, MKP1, GJA1
ЭМП и миграция клеток	PLEKHF1, RHOV, RHOJ, SNTA1, SNAI1, MMP1, 2, 9, SLUG, e-cadherin, семейство GJ, COL4A2, HAS2, LOX

1.5.3. Специфика реализации механизма действия глюкокортикоидов в терапии рака молочной железы

В клетках молочной железы GR в основном транскрипционно активен и локализуется в ядрах миоэпителиальных клеток, выстилающих долько-протоковую единицу молочной железы [171, 230, 285]. GR обнаруживается и в неопластических клетках молочной железы [16, 171], причем экспрессия GR в клетках РМЖ наблюдается у пациентов старшего возраста [35]. Как было упомянуто ранее, GC обладают антипролиферативным эффектом в отношении клеток люминального РМЖ [130, 368]. Коактивация GR и ER α в клетках ER-позитивного РМЖ ассоциирована с благоприятным прогнозом [383]. GC способны подавлять пролиферацию, вызывая клеточный арест в фазе G0/G1 ER α -позитивных клеток *in vitro* (MCF-7, ZR-75-1, Con-8) [100, 119, 154, 170]. Схожие эффекты продемонстрированы на моделях ксенографтов РМЖ человека у мышей [118]. Однако ранних стадиях ER α -негативного РМЖ высокий уровень экспрессии GR коррелирует с менее благоприятным прогнозом [264], а также обладают широким спектром побочных эффектов.

1.5.4. Побочные эффекты глюкокортикоидов

GC регулируют большое количество основных физиологических процессов организма. Высокие дозы и длительные курсы GC приводят к развитию тканеспецифичных нежелательных побочных эффектов. GC влияют на сердечно-сосудистую систему, центральную нервную систему, регулируют настроение и поведение, память, когнитивные функции. Побочные эффекты приема GC разнообразны: метаболические (набор веса, развитие диабета), атрофические (атрофия мышц, тканей кожи и костей, остеопороз и костный некроз), синдром Кушинга, глаукома, катаракта, стероидное акне, дерматит, снижение иммунитета. Многие побочные эффекты развиваются через годы после окончания курса приема GC, в то время как другие возникают во время приема препарата и пропадают с прекращением терапии [57, 83, 255, 276]. Такая особенность связана с системным действием GC: высокие дозы GC необратимо меняют профиль экспрессии генов в чувствительных тканях, что делает их более уязвимыми к иным экзогенным повреждающим факторам. Так, со временем изначально измененная под действием GC ткань аккумулирует повреждения и становится более привлекательной в том числе в качестве метастатической ниши.

В популяционном когортном исследовании, проведенном в Великобритании с 2006 по 2010 год, включающем пациентов с различными неонкологическими нозологиями, среди

которых 557 человек длительно применяли ингаляционные кортикостероиды симптоматически, а 222 получали GC систематически, и группу контроля из 24106 человек, было показано, что терапия GC ассоциирована со снижением объема миндалевидного тела и повышенным проявлением депрессивных симптомов (беспокойство, вялость, усталость, сонливость и др.) [236]. В исследовании, включающем 17760 пациентов с ревматоидным артритом, 7421 (42%) из которых за время наблюдения (в течении 100 пациенто-лет) принимали GC, было показано, что прием GC в дозе 7,5 мг и выше ассоциирован с увеличением риска развития артериальной гипертонии на 17% [80]. Наблюдаемые эффекты могут объясняться описанным выше взаимодействием GR с BAR, как было описано выше.

Одним из наиболее распространенных побочных эффектов трансактивации GR является инволюция тимуса. GC вызывают апоптоз в тимоцитах [22, 296], что приводит к нарушениям нейроэндокринных и гуморальных взаимодействий. Также высокие дозы GC приводят к преждевременному облысению и потере фертильности у мужчин за счет гиперактивации AR [138, 289, 310].

Стоит отметить, что большинство онкопациентов имеют в анамнезе и семейной истории ряд коморбидных заболеваний, которые могут усугубляться под действием GC. Однако GC в настоящий момент назначаются практически во всех протоколах терапии солидных опухолей, что ведет к развитию отсроченных GC-опосредованных побочных эффектов.

1.5.5. Влияние глюкокортикоидов на прогрессию РМЖ

Побочные действия GC играют важную роль в качестве жизни пациентов с РМЖ. Помимо устранения побочных действий химиотерапии, GC могут вызывать собственные нежелательные эффекты.

Ретроспективные исследования показали, что прием GC способствует формированию химиорезистентности РМЖ [133]. GC ингибируют индуцируемый химиопрепаратами (доксорубицином, паклитакселом, трастузумабом) апоптоз в клетках РМЖ различных подтипов [179, 346, 393], а также снижают терапевтический эффект паклитаксела [266] и препаратов платины [345] на ксенографты РМЖ у мышей [361]. Эти эффекты подтверждаются также экспериментами на образцах клеток, выделенных из операционного материала опухолей различной локализации (РМЖ, рака яичников, предстательной железы, поджелудочной железы, печени и др.) [133, 134, 345, 409].

Высокая экспрессия GR коррелирует с более короткой безметастатической выживаемостью пациентов с ER-негативными формами РМЖ, в то время как у пациентов с ER-

позитивным РМЖ высокий уровень GR связан с лучшим прогнозом [264]. Данное явление может быть объяснено с описанными выше взаимодействиями GR-ER α , а также с тем, что активация GR приводит к усилению экспрессии эстроген сульфотрансферазы, которая участвует в инактивации эстрогена [118].

Как было сказано выше, активация аутофагии может приводить как к гибели, так и к стимулированию выживания опухолевых клеток. GC опосредуют ингибирование каскада IGF-1/PI3K/АКТ [128], который является ключевым регулятором баланса пролиферации и аутофагии в клетке.

В нормальных клетках молочной железы не связанный с лигандом GR опосредует экспрессию гена опухолевого супрессора *BRCA1*, связываясь с соответствующей промоторной областью в ДНК. При связывании с лигандом GR утрачивает способность активировать экспрессию *BRCA1*, что приводит к ингибированию данного пути супрессии опухолевого роста [299]. Также стоит отметить, что GC способны вызывать аутофагию в клетках костной ткани [320], которая является пре-метастатической нишей РМЖ.

К GR-зависимым генам относятся в том числе гены, белковые продукты которых регулируют целостность межклеточных контактов. К таким белковым продуктам относятся, например, CDH, CLDN, коннексины (GJ), MMP, окклюдин (OCLDN), плакоглобин (PLAC), киназы семейства Rho и др. [416]. Потеря или гиперэкспрессия этих генов может приводить к нарушению межклеточных контактов, активации эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и стимуляции процессов инвазии и метастазирования.

Активация киназы SGK1 способствует метастазированию РМЖ в кости [411]. Нокдаун SGK1 в устойчивых к ингибиторам АКТ клеточных линиях РМЖ (BT-549, JIMT-1, MDA-MB-436 и HCC-1937) снижает пролиферативную и инвазивную активности клеток [331]. Эти данные свидетельствуют о том, что резистентность к АКТ-ингибиторам может быть спровоцирована активацией SGK1. Исследования *in vivo* показали, что дексаметазон снижает ответ ксенографтов ТН РМЖ на химиотерапию [266, 345] за счет активации киназ GSK1 и MKP1 [393]. Дексаметазон на модели РМЖ у мышей *in vivo* усиливает метастазирование в легкие. Авторы работы предполагают, что данное действие опосредуется активацией сигнального каскада PI3K-GSK1-CTGF [410].

Стоит отметить, что высокая экспрессия и активация GR наблюдается в метастазах РМЖ [251]. Таким образом, введение GC в схемы терапии РМЖ может провоцировать прогрессию и метастазирование опухолей.

Как было сказано ранее, высокие дозы GC способствуют разрушению костной ткани, которая является приоритетной нишей метастазирования РМЖ. GC индуцируют аутофагию,

экспрессию провоспалительных цитокинов, а также экспрессию гена *DDIT4*, в остеокластах, что способствует формированию метастатической ниши для РМЖ [65, 318]. Другие GR-зависимые гены и сигнальные пути, изменение регуляции которых может способствовать метастазированию РМЖ в отдаленные органы, суммированы в таблице 3 [416].

Таблица 3 - Потенциальные мишени GR, участвующие в метастазировании РМЖ [416]

Орган	GC-зависимые гены и сигнальные каскады, изменяемые при метастазировании РМЖ
Кости	<i>DDIT4 (REDD1)</i> , IGF-1/PI3K/Akt
Печень	<i>CD62E, CXCR4, CD44, CDH1, CDH2</i>
Мозг	<i>ST6GALNAC5, HBEGF, COX-2, IL8, ICAM</i>
Легкие	<i>MMP1a, MMP2, ID1, CXCL1, EREG, COX-2, TGF-beta, LOX</i>

Несмотря на обилие зарегистрированных побочных действий, опосредованных активацией GR, и понимание отдельных ключевых регуляторов того или иного процесса, детальные молекулярные механизмы, лежащие в основе развития GC-зависимых осложнений, остаются до конца не изученными.

1.5.6. Способы снижения побочных эффектов и повышения терапевтического действия глюкокортикоидов

Принято считать, что терапевтический эффект от приема GC превышает риски развития осложнений. Это связано в том числе с отсутствием альтернативных лекарственных средств. Основной стратегией по устранению негативных эффектов GC является отмена препарата и симптоматическое лечение, целью клинических исследований является снижение негативных последствий применения GC путем подбора доз препарата или времени проведения курса терапии. Однако показано, что в рамках проведения неoadьювантной терапии, однократное введение GC в высокой дозе обладает таким же эффектом, как курсовое введение препарата в течение 10-14 суток (КИ NCT00293384, NCT01913990) [6, 75]

Для снятия побочных эффектов на молекулярном уровне перспективным является комбинирование GC с другими препаратами. Так, ингибиторы сигнального пути PI3K/AKT/mTOR (LY-294002, рапамицин, 3-MA), снижают GC-индуцированную аутофагию в клетках костной ткани [320]. Также на модели ксенографтов мантийноклеточной лимфомы показано, что LY-294002 и рапамицин усиливают противоопухолевое действие дексаметазона

[198]. В нескольких клинических испытаниях в настоящее время оценивают эффективность антагонистов GR в сочетании с химиотерапией у пациентов с РМЖ.

В последние годы разрабатываются подходы к снижению степени запуска механизма трансактивации и повышения уровня GR-зависимой транскрипции. Так, за последние 20 лет разработано более 30 новых препаратов, обладающих способностью селективно модулировать активность GR [197].

1.6. Селективные модуляторы рецептора глюкокортикоидов

Первые успешные лабораторные разработки лигандов GR, которые способны селективно модулировать GR, описаны еще в 1997 г. [364]. Такие препараты, способные направленно активировать GR-зависимую транскрипцию (Рисунок 6), объединяют в группу селективных активаторов GR (SEGRA) [333]. В последние два десятилетия разработано и протестировано десятки различных по структуре SEGRA, имеющих различное химическое строение и сродство к рецептору [197, 243]. Стоит отметить, что, несмотря на полученные в исследованиях *in vivo* и *in vitro* данные о высокой селективности и эффективности многих соединений класса SEGRA, до стадии клинических испытаний дошли всего несколько препаратов (Рисунок 6).

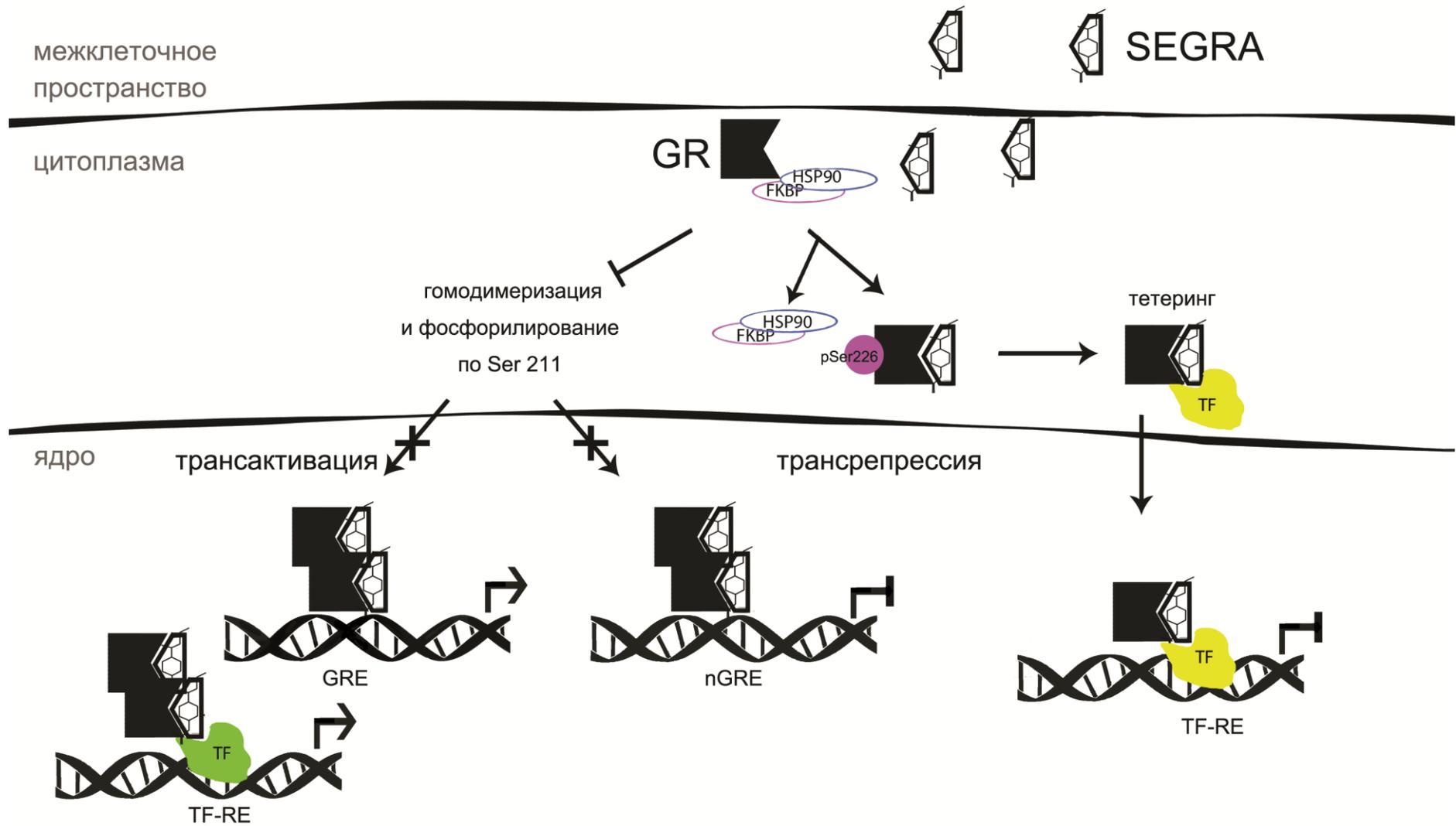


Рисунок 6 – Механизм действия SEGRA [243, 311, 336]

Marгасогаг имеет сравнимую с дексаметазоном аффинность к GR и ингибирует экспрессию ряда интерлейкинов, простагландина-E2 и E-селектина, проявляет противовоспалительные эффекты *in vivo* [313, 314, 335]. Для данного препарата завершено 12 КИ активности в отношении больных с диагнозами псориаз, атопический дерматит, экзема, воспаление, конъюнктивит, аллергия [197]. Для другого нестероидного SEGRA фирмы Pfizer Fosdagrosorat завершены КИ на здоровых добровольцах, а также завершен ряд КИ в отношении пациентов с диагнозом ревматоидный артрит [52, 197, 339] и здоровых волонтерах (КИ № NCT00812825). Показано, что в отношении пациентов с ревматоидным артритом Fosdagrosorat обладает схожей с преднизолоном эффективностью, однако также вызывает побочные эффекты, ассоциированные с трансактивацией GR [52]. Ингаляционные формы SEGRA, разработанных фирмой AstraZeneca (AZD5423, AZD7594 и AZD9567), также успешно прошли I и II фазы клинических испытаний на пациентах с различными заболеваниями верхних дыхательных путей и КИ на здоровых добровольцах [114, 191, 197]. Так, в 2023 году завершилось рандомизированное исследование, включающее группы пациентов с ревматоидным артритом, принимавших 40 мг AZD9567 или 20 мг преднизолона один раз в день на протяжении 14 суток. При транскриптомном анализе влияния 4-часового воздействия AZD9567 (9–949 нМ), преднизолона (32–3162 нМ), или дексаметазона (3–316 нМ), с предварительной стимуляцией воспалительного ответа при помощи TNF α , на моноцитах здоровых доноров было продемонстрировано противовоспалительное действие AZD9567, схожее с действием GC по молекулярным механизмам реализации эффектов [191, 197]. LEO 134310 является высокоаффинным лигандом GR, обладает противовоспалительным действием, и не вызывает трансактивации GR в экспериментах *in vitro* [97]. Завершена I фаза КИ лекарственной формы для местного применения в отношении псориаза (КИ № NCT03669757, данные не опубликованы) [197].

Многие природные соединения и их синтетические аналоги обладают свойствами лигандов GR [197]. Так, флавоноид байкалеин, извлекаемый из корней *Scutellaria baicalensis*, связывается с GRE и активирует экспрессию GC-респонсивных генов *FKBP5* и *GILZ* *in vitro* и *in vivo* [23, 197]. При скрининге миметиков кортизола природного происхождения с применением генно-модифицированных клеток для детекции ядерной транслокации GR, было показано, что декурсин, производное кумарина, полученное из растения *Angelica sinensis* семейства женьшеней, и L-лимонен, содержащийся в маслах перечной мяты индуцировали транслокацию GR в ядро на уровне, сравнимом с эффектами кортизола [167, 197, 304]. Еще один стероидный флавоноид сапонинового ряда, полученный из женьшеня, гинзенозид Re, а также компонент

розового масла β -ионон показали сродство к GR в бесклеточной системе [69, 197, 201]. Стоит отметить, что данные соединения имеют различную химическое строение (Рисунок 7).

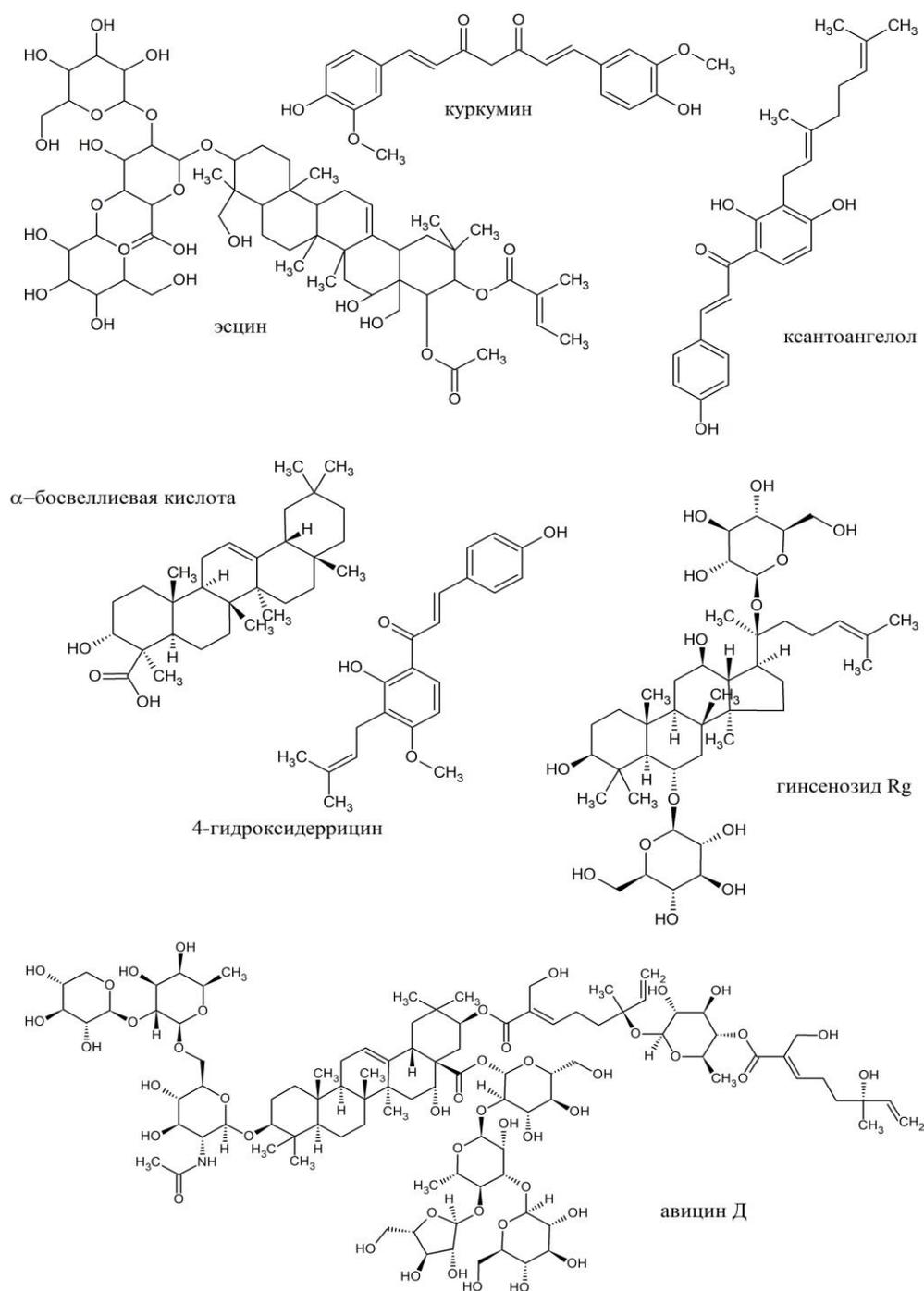


Рисунок 7 – Химические структуры SEGRA природного происхождения: куркумин, эсцин, ксантоангелол, α -босвеллиевая кислота, 4-гидроксидеррицин, гинсенозид Rg, авицин Д

Для ряда молекул растительного происхождения было показано модулирование функциональной активности GR в сторону стимуляции трансрепрессии, но не трансактивации.

Так, для эсцина, компонента вытяжки конского каштана *Aesculus hippocastanum*, были показаны противовоспалительные свойства за счет ингибирования NFκB и AP-1 [412]. Для куркумина, 4-гидроксидеррицина, босвелиевых кислот и ксантоангелола была продемонстрирована способность подавлять запуск трансактивационного механизма [162, 402, 412]. Гинзенозид Rg и авицин D также проявляли способность к селективному запуску трансрепрессии [132]. Стоит отметить, что некоторые лекарственные препараты, содержащие большое количество босвелиевых кислот, используют в Китае в настоящее время для лечения ревматоидного артрита и других воспалительных заболеваний [155]. Были инициированы КИ на пациентах с РМЖ, которые до оперативного вмешательства на ночь принимали экстракт *Boswellia serrata* в дозе 2400 мг/сутки перорально в течение 5-23 дней. При иммуногистохимическом анализе маркера пролиферации Ki-67 на биопсийных образцах от 18 пациентах было показано, что экстракт, содержащий босвелиевые кислоты, снижает пролиферацию опухолевых клеток на $13,8 \pm 11,7\%$ [362]. Ряд исследований *in vitro* на клеточных линиях РМЖ показал антипролиферативную и антиметастатическую активность куркумина [374]. Гинзенозид Rg индуцирует апоптоз в клетках РМЖ *in vitro*, при этом снижая экспрессию провоспалительных генов как в клетках нормального эпителия молочной железы, так и в клетках РМЖ [73, 175].

В заключение данного раздела необходимо отметить, что, при обширном списке известных соединений с GC-подобным действием и большом количестве описанных исследований, не описаны ни научно-исследовательские работы, ни КИ вышеописанных молекул на моделях ЗНО.

1.6.1. Compound A и его синтетические аналоги

Одним из наиболее изученных SEGRA нестероидной структуры является соединение 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмонийхлорид (Compound A, CpdA). Данное соединение растительного происхождения получено из растения *Salsola tuberculatiformis*, произрастающего в Намибии [349]. CpdA активно используется в фундаментальных биохимических исследованиях, посвященных биологическим функциям GR. Так, CpdA является основным инструментом в исследованиях группы Сюзанн Конзен (Suzanne D. Conzen, Department of Medicine, Section of Hematology Oncology, The University of Chicago, Chicago, Illinois, USA), направленных на выявление роли GR в различных типах опухолей, в том числе, репродуктивной системы [250, 366, 370].

Степень аффинности к GR для CpdA в сравнении с GC была исследована в нескольких независимых исследованиях [46, 382, 401]. Однако данные исследования были проведены на разных модельных системах, в связи полученные результаты довольно противоречивы. Так, по данным [401] сродство CpdA к GR в 6 раз слабее, чем GC к GR, что подтверждается биоинформатическими данными о том, что CpdA способен образовывать только 3 водородные связи с аминокислотными остатками GR [401], в то время как дексаметазон и другие стероиды связывают 5 аминокислотных остатков [401]. В то же время по данным [46] CpdA имеет в 4 раза более высокую аффинность к GR, чем дексаметазон. Однако стоит отметить, что данные эксперимента в [46] приведены в формате относительных $\% \pm SEM$, и точки в области 50% имеют довольно высокое значение SEM, а аппроксимированные кривые связывания для CpdA и дексаметазона располагаются на незначительном расстоянии, что дает основание полагать, что результат эксперимента может сильно варьировать при выборе иных методов для статистической обработки данных. В бесклеточной системе, основанной на изменении поляризации флуоресценции, в работе [382] CpdA не способен вытеснять меченный лиганд из лиганд-связывающего домена рецептора. В связи с этим авторы работы выдвигают предположение, что CpdA способен активировать GR без ассоциации с лиганд-связывающим доменом [382].

CpdA также обладает сродством к AR, причем механизм взаимодействия CpdA с AR схож с действием анти-андрогенов [46, 88, 315]. Следует также отметить, что не выявлено влияния CpdA на активацию других стероидных рецепторов (ER и PR).

CpdA обладает противовоспалительным действием. В системах *in vitro* и *in vivo* CpdA подавляет активность NFκB и его зависимых генов [46, 292, 312, 417]. Помимо противовоспалительного, CpdA обладает противоопухолевым действием. Показано, что CpdA подавляет рост и жизнеспособность ряда опухолевых клеточных линий, включая клетки рака простаты, лимфомы, лейкозов и множественной миеломы [196, 199, 352, 417]. В отделе химического канцерогенеза НИИЦ онкологии им Н.Н. Блохина было показано, что CpdA вызывает транскрепессию GR-зависимых генов, а также оказывает цитотоксическое и проапоптотическое действие на клеточные линии опухолей кроветворной системы *in vitro*, не запуская при этом механизм трансактивации GR в модельных линиях [417]. Также было показано противоопухолевое действие CpdA в отношении перевиваемых мышинных опухолей *in vivo*. Сравнительный анализ эффектов CpdA и дексаметазона, проведенный исследовательским коллективом отдела химического канцерогенеза и другими исследователями, показал, что SEGRA обладает сопоставимым с GC по силе противоопухолевым действием в отношении опухолей кроветворной системы [404, 408].

Ранее было показано, что CpдA в высоких дозах (более 0,1 мМ) обладает мутагенным эффектом в тесте Эймса на штамме *Salmonella Typhimurium* TA98, чувствительном к мутагенам, индуцирующим типа сдвига рамки считывания [4]. Это связано с тем, что молекула CpдA обладает невысокой химической стабильностью и в водной среде циклизуется с образованием производного азиридина – высокореакционного соединения, проявляющего мутагенные и тератогенные свойства [367]. При длительном хранении в водной среде молекула CpдA преобразуется в ацетилсинефрин, после чего за несколько недель или месяцев гидролизуется до молекулы синефрина. В то же время, растворение CpдA в буферных растворах (рН 7,4) приводит к образованию смеси производных азиридина за нескольких минут (Рисунок 8). В течение нескольких дней в буферных растворах и воде азиридин гидролизуется с образованием ацетилсинефрина, который в течение недели трансформируется в стабильный синефрин [395].

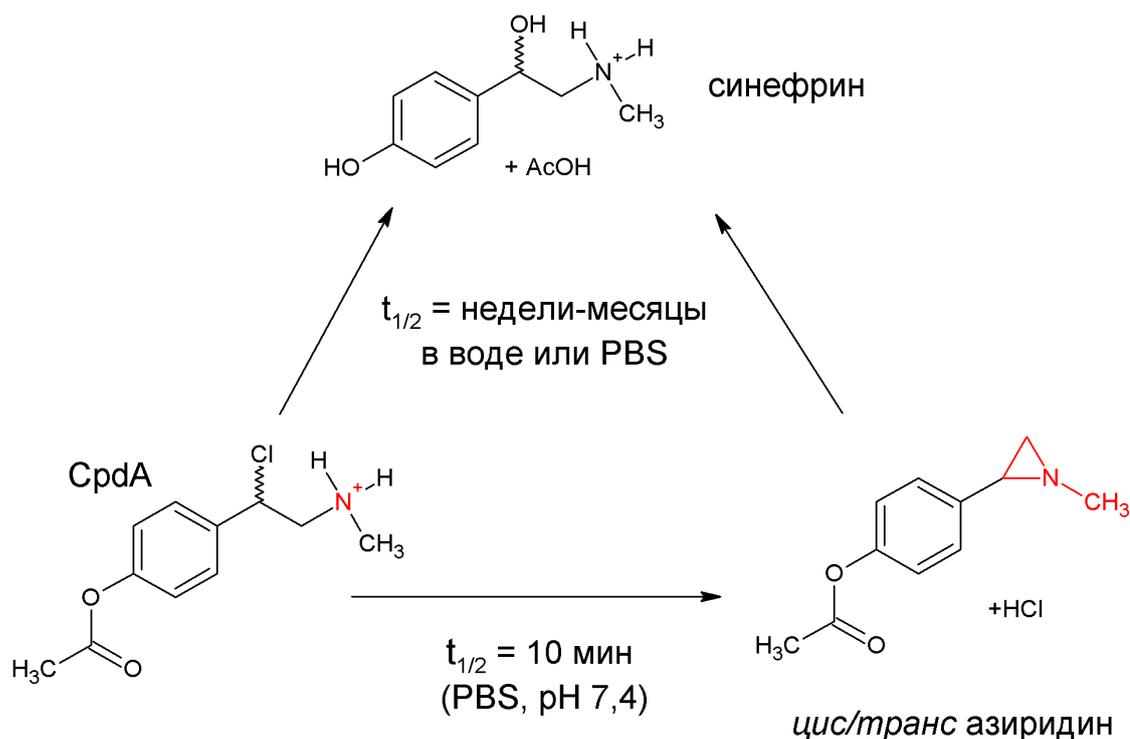


Рисунок 8 - Схема распада Compound A (CpdA) на производные азиридина и синефрина в зависимости от времени и условий среды [395]

Такие превращения CpдA дают основание полагать, что терапевтические эффекты соединения (в частности, противовоспалительные) могут быть действием образовавшегося ацетилсинефрина, в то время как мутагенный эффект опосредован азиридиновым метаболитом.

Химическая нестабильность является фактором, из-за которого невозможно применение CpdA в клинической практике.

В биологически активной конформации p -синефрин является селективным антагонистом β -3-адренорецептора, одного из членов семейства BAR. Он содержится в плодах растений рода цитрусовых, активно применяется спортсменами в качестве компонента комплексного диетического питания [344]. Синефрин структурно схож с молекулами эpineфрина и эфедрина. Однако эфедрин является производное фенилпропаноламина, тогда как p -синефрин производное фенилэтанолamina, содержит гидроксильную группу в пара-положении. За счет этого структурного различия синефрин легче проникает через гемато-энцефалический барьер, и при этом практически не обладает сродством к α -1, α -2, β -1, и β -2 изоформам AR и не влияет на сердечно-сосудистую систему [341–343]. Стоит отметить, что синефрин активно используется в качестве пищевой добавки для снижения веса. Ряд клинических испытаний синефрина как препарата для снижения веса, проведенных на здоровых добровольцах, не выявил серьезных побочных эффектов при приеме синефрина в дозах 60-150 мг в день [163, 340, 342].

Масло апельсина, содержащее высокое содержанием синефрина, используется в народной медицине для лечения лихорадки, эпилепсии и тревожных расстройств [92]. Синефрин усиливает термогенез, метаболизм углеводов (гликогенолиз, глюконеогенез, гликолиз), облегчает захват кислорода и глюкозы клетками мышечной ткани [60, 61, 148, 235, 254, 275].

Наряду с другими фитонутриентами синефрин обладает выраженным противовирусным действием [258], способен облегчать спазмы бронхов [321]. Описано противовоспалительное и антиоксидантное действие данной молекулы: синефрин ингибирует производство реактивных форм кислорода [185]. В эксперименте *in vivo* на модели индуцированного липополисахаридом воспаления у мышей показано, что синефрин подавляет воспаление, уменьшая активность TNF α , IL6 и усиливая активность IL10, ингибируя фосфорилирование NF κ B и деградацию I κ B [392]. Синефрин *in vitro* подавляет пролиферацию и метастазирование клеток плоскоклеточного рака пищевода [397], а также ангиогенез [180]. Также стоит отметить, что p -Синефрин обладает антиэстрогенным потенциалом [20].

По причине высокой стабильности и активности данной молекулы, исследования в нашей лаборатории были смещены в сторону разработки более стабильных аналогов синефрина и CpdA , являющихся лигандами GR. В сотрудничестве с ФГБУН «Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского» РАН был проведён синтез ряда производных синефрина, а затем исследование их биохимических свойств и противоопухолевой эффективности *in vivo* и *in vitro* на моделях опухолей кроветворной системы [4, 417]. Наиболее выраженным

трансрепрессорным действием *in vitro*, а также противоопухолевым потенциалом *in vivo* обладал SEGRA: 4-[1-гидрокси-2-(пиперидин-1-ил)этил]фенола (CpdA-03) (Рисунок 9) [4, 417].

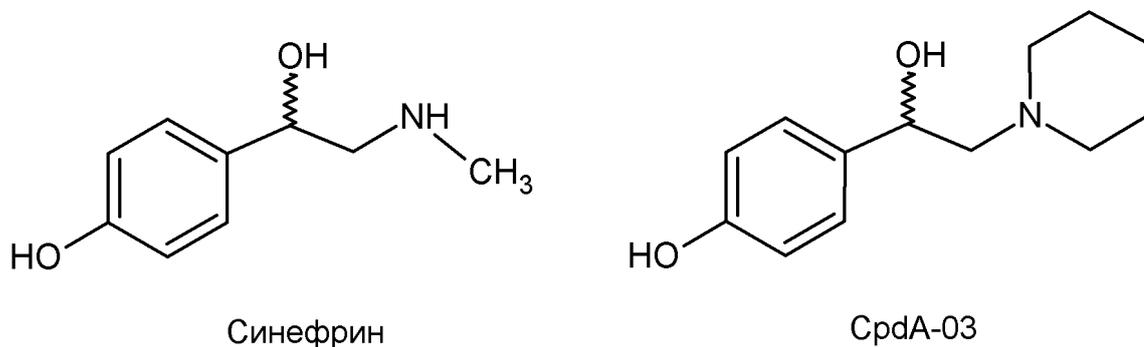


Рисунок 9 - Структура синефрина и CpdA-03 (4-[1-гидрокси-2-пиперидин-1-илэтил]фенол)

Ранее в нашей лаборатории в исследовании на модели клеток острого миелоидного лейкоза и мантийноклеточной лимфомы была показана способность CpdA-03 селективно запускать трансреессию GR, подавлять экспрессию ряда GR-зависимых провоспалительных цитокинов [4, 417]. Также показаны антипролиферативные свойства CpdA-03 *in vitro*. На модели перевиваемой лимфомы P388 у мышей *in vivo* CpdA-03 проявляет противоопухолевую активность: в дозе 7,5 мг/кг индуцирует торможение роста опухолевого узла на 78% при терапии в течение 21 суток [4, 417].

1.7 Заключение к обзору литературы

Представленные в данном разделе работы данные свидетельствуют о том, что активация GR по-разному влияет на прогноз, а также может вызывать резистентность к терапии в определенных подгруппах солидных опухолей. Однако обилие противоречивых и неполных данных в мировой и отечественной литературе указывает на необходимость комплексного сравнительного анализа в контролируемой биологической системе для определения влияния введения GC на прогрессию РМЖ различных подтипов, что является основной целью настоящего исследования. Помимо определения роли GC в прогрессии и метастазировании РМЖ, настоящая работа также посвящена оценке действия двух SEGRA, CpdA и CpdA-03, на функциональную активность GR, а также на пролиферацию, миграцию и транскрипцию широкого спектра генов в клетках РМЖ с различным гистотипом.

Несмотря на активное изучение как фундаментальных механизмов действия соединений класса SEGRA, так и возможностей их практического использования, довольно ограниченное количество молекул дошло до доклинических и клинических исследований. Более того, только малая часть этих соединений были исследованы *in vitro* и *in vivo* на моделях ЗНО, ни одна подобная молекула не была включена в клинические исследования терапии нозологий опухолевой природы. В связи с этим, разработка новых препаратов, аналогов GC со сниженными побочными эффектами, по-прежнему является актуальной.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Приборы и реактивы

Используемые приборы:

Центрифуга настольная с охлаждением (Hettich, Германия), амплификатор Real-time CFX Connect (BioRad Laboratories, США), микроскоп ECLIPSE TS 100-F (Nikon, Япония), спектрофотометры Multiskan SkyHigh и NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США), камеры для вертикального и горизонтального электрофореза и источники тока (BioRad, США), проточный цитофлуориметр BD FACS Canto II (BD Bioscience, США), система визуализации ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare, США), вортекс, мультивортекс и магнитная мешалка (BioSan, Латвия), жидкостной сцинтилляционный спектрометр RackBeta 1215 (LKB, Финляндия).

Реактивы:

Агар бактериологический, триптон, агароза (Fisher Biotech, Испания); фетальная бычья сыворотка (FBS, Biosera, Франция); дрожжевой экстракт, ампициллин, культуральные среды DMEM и RPMI-1640, диметилсульфоксид (ДМСО), гентамицин, пенициллин/стрептомицин, L-глутамин, раствор Версена, раствор трипсина-ЭДТА (0,25%), пируват натрия, трипановый синий, борная кислота, бромфеноловый синий, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), фосфатный буфер (PBS), полиакриамид, L-глицин (ПанЭко, Россия), N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония, SYBR Gold 10000x (Thermo Scientific, США); этиловый (EtOH), изоамиловый, изопропиловый спирты, натрий гидроксид, натрий хлорид (NaCl), кальций хлорид, хлороформ, натрий ацетат, калий ацетат, аммоний ацетат, соляная кислота, калия бихромат (Химмед, Россия); этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевая соль (ЭДТА), Tween-20, тритон-X100, β-меркаптоэтанол, ингибитор протеиназ и ингибитор фосфатаз, тетрадеcanoил-форбол-13-ацетат (ТРА), пуромицин, (Sigma Aldrich, США); глицерин, ронсеау С, додецилсульфат натрия (SDS), этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N,N-тетрауксусная кислота (ЭГТА), дезоксихолат натрия (SERVA, Германия); азид натрия (Merck, Германия); N,N'-метилен-бис-акриламид, акриламид, нитроцеллюлозные мембраны (0,22 и 0,45 мкм), маркер молекулярного веса Page Ruler Plus, набор реагентов для проявления белков Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, США), РНКзаа (Биолабмикс, Россия), пропиций йодид (PI) (Macklin, Китай), TRI-реагент для выделения РНК, наборы для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) MMLV RT и ПЦР в реальном времени qPCRmix-HS (Евроген, Россия); комплект пакующих

плазмид GAG, REV и VSVg (Addgene, США), плазмиды, несущие NanoLuc® репортерный вектор pNL3.2.NF-κB-RE[NlucP/NF-κB-RE/Hygro] и pNL3.2.CMV (Promega, США), люцифер желтый, реагенты для трансфекции Mirus Bio TransIT (BioLynx Inc., Канада) и TurboFect (Thermo Fisher Scientific, США), наборы для выделения плазмидной ДНК Zymppu™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, США) и Plasmid Miniprep Kit (Евроген, Россия), сцинтилляционная жидкость Ultima Gold (PerkinElmer, Германия), культуральные вставки (камера Бойдена), размер пор 8 мкм PET мембрана (Millipore, Швейцария).

Препараты:

Дексаметазон фосфат (Dex) – Macklin, Китай, Compound A (CpdA) – Sigma Aldrich, США, [³H]дексаметазон ([³H]Dex) получен методом термической активации [28], CpdA-03 синтезирован как описано ранее [417].

Эукариотические и бактериальные культуры

В работе использовались клетки аденокарциномы молочной железы линий MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, HCC-1954, клетки из эмбриональных почек человека HEK-293T, клетки печени крысы IAR2, а также клетки хронического миелолейкоза K562. Клетки MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, IAR2 и HEK-293T культивировали в стандартной среде DMEM, линии K562 и HCC-1954 культивировали в стандартной среде RPMI-1640 при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Культуральные среды содержали 10% FBS, пенициллин (50 мкг/мл) и стрептомицин (50 ед/мл). Все экспериментальные работы, если не указано иное, были проведены в средах с пониженным содержанием сыворотки (5%) для предотвращения сорбции исследуемых препаратов на сывороточных белках. Для всех используемых клеточных линии проведено генотипирование и подтверждено соответствие паспортам ATCC (ООО «ГОРДИЗ», Россия).

Для наработки плазмидной ДНК (плДНК) использовали штамм E.coli XL-1. Состав твердой питательной среды: 1% NaCl, 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% агар, 0,1 мг/мл ампициллина. Состав жидкой питательной среды (LB): 1% NaCl, 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,1 мг/мл ампициллина.

2.2. Радиолигандный анализ конкурентного связывания

Условия проведения эксперимента подобраны ранее [28, 417]. Клетки линии K562 центрифугировали, ресуспендировали (2,5 млн кл./мл) в культуральной среде без сыворотки, вносили 0,5 мкМ [³H]Dex, затем вносили Dex, CpdA или CpdA-03 в диапазоне концентраций от 0,001 мкМ до 100 мкМ и инкубировали 90 мин при 37°C. Затем клетки отмывали дважды центрифугированием в холодной культуральной среде без сыворотки и лизировали 30 мин в

буфере RIPA (10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 0,1% SDS, 0,5% дезоксихолат натрия, 1% Тритон-Х 100, 10% глицерин). Лизат переносили во флаконы с сцинтилляционной жидкостью. Уровень радиоактивности измеряли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра. Результаты представляли в % от максимального наблюдаемого сигнала (после инкубации с 0,5 мкМ [³H]Dex без добавления немеченных лигандов). При анализе IC50 использован метод нелинейной регрессии [28, 417].

2.3. Оценка пролиферативной активности

Клетки высевали в 96-луночные планшеты по 500 клеток на лунку и инкубировали 16-24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После прикрепления клетки обрабатывали Dex, SpdA или SpdA-03 в концентрации 10 мкМ. Обработку клеток с частичной сменой среды проводили каждые 24 ч. Подсчет клеток производили через 5 суток (120 ч) от первой обработки. Клетки снимали с подложки раствором трипсина и смешивали 1:1 с 0,4%-ым раствором трипанового синего. Анализ жизнеспособности клеточной культуры проводили методом прямого подсчета живых клеток в камере Горяева или на автоматическом счетчике ТС-20 как описано в [413, 414]. Количество живых клеток в контрольных образцах принимали за 100%.

2.4. Получение трансформированных клеток

2.4.1. Трансформация компетентных клеток и выделение плазмидной ДНК

Для получения трансформированных клеток с подавленной экспрессией GR использовали вектор, несущий ген, кодирующий короткую шпилечную РНК (shRNA) к РНК гена *NR3C1* (Рисунок 10) [196, 199, 417]. В качестве контроля дополнительно был использован вектор аналогичной конструкции без последовательности shRNA. К суспензии компетентных клеток штамма *E.coli* XL-1 добавляли 2 мкг плДНК, перемешивали пипетированием и инкубировали при 4°C 30 мин, далее инкубировали 3 мин при 42°C, затем 15 мин при 4°C. В пробирки добавляли 800 мкл LB, перемешивали и инкубировали 1 ч при 37°C. Содержимое пробирок растирали на чашках Петри с твердой питательной средой. Бактерии культивировали в термостате при 37°C в 16-24 ч. Накопительную культуру трансформированных бактерий выращивали в среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) на шейкере-инкубаторе при 37°C в течение 12-16 ч. Полученную бактериальную суспензию центрифугировали при 4°C, 7000 об/мин, 10 мин. Выделение плазмиды осуществляли с помощью наборов Plasmid Miniprep

Kit. Концентрацию плДНК в образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop при длине волны 260 нм.

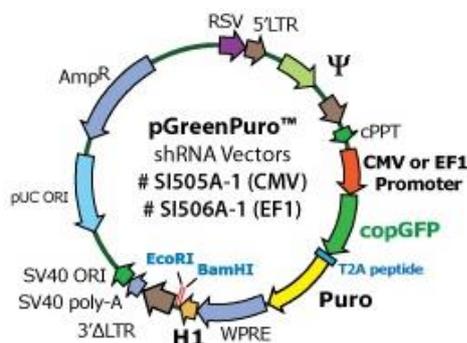


Рисунок 10 - Структура вектора, кодирующего шпилечную РНК к мРНК GR

2.4.2. Получение вируса и инфекция клеток

Вирусные стоки высокого титра получали путем трансфекции клеток линии HEK 293T векторами, описанными в п.п. 2.4.1. совместно с набором пакующих плазмид GAG, REV и VSVg [196, 199, 417] с помощью трансфекционного реагента TurboFect по протоколу производителя. Культуральную среду, содержащую вирусные частицы, собирали через 24-48 ч после трансфекции, центрифугировали (1200 об/мин, $t_{\text{комн}}$, 5 мин), фильтровали через полистероловый фильтр (размер пор 0,45 мкм). Клетки линий MCF-7 и MDA-MB-231 инкубировали 24 ч в полученной культуральной среде. Далее полученные модифицированные клетки культивировали на среде для селекции, с добавлением антибиотика пурамицина (в концентрации 1 и 1,5 мкг/мл для линий MCF-7 и MDA-MB-231 соответственно). Минимальная концентрация пурамицина, необходимая для селекции несущих ген интереса клеток была подобрана эмпирически для каждой клеточной линии. Подавление экспрессии GR в полученных сублиниях регистрировали с помощью вестерн-блоттинга.

2.5. Анализ клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии

Клетки высевали в 24-луночный планшет по 50 тыс. клеток в лунку и инкубировали 16-24 х при 37°C в атмосфере 5%-ого CO₂. После прикрепления клетки обрабатывали 10 нМ CpdA, CpdA-03, Dex или растворителем (0,1% v/v) как описано в [414]. Инкубировали в течение 120 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем клетки снимали с подложки раствором трипсина-ЭДТА, дважды отмывали центрифугированием в холодном PBS с добавлением 0,2% FBS (1800

об/мин, 4°C, 5 мин). Далее клетки фиксировали EtOH (70%), 2 ч при 4°C. Фиксированные клетки отмывали от спирта центрифугированием в холодном PBS с добавлением 0,2% FBS, ресуспендировали осадок в PI-буфере (0,1% Тритон-X100, 0,5 ед/мл RNКазаА, 50 мг/мл PI в PBS). Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре. Результаты представлены в виде диаграмм, суммирующих распределение клеток в каждой группе образцов по фазам клеточного цикла.

2.6. Выделение белка и вестерн-блоттинг

Для анализа ядерной транслокации и фосфорилирования GR белков клетки рассеивали в 6-луночные планшеты по 1 млн клеток в лунку. После прикрепления к подложке (через 16-24 ч), в культуральную среду вносили исследуемые препараты или ДМСО, затем инкубировали 2, 4 или 8 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ как описано в [414]. Для выделения белков клетки, не открепляя от подложки, дважды отмывали от среды PBS (pH 7,8). Для выделения цитоплазматической фракции белка лизис клеток проводили в буфере RIPA с добавлением ингибитора протеиназ и ингибитора фосфатаз. Лизис проводили при интенсивном перемешивании в течение 1 часа при 4°C. Лизат отделяли центрифугированием (6000 об/мин, 4°C, 5 мин). Для получения ядерной фракции белка клетки отделяли от подложки скребком и ресуспендировали в буфере F, имеющем следующий состав: 6 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM ЭДТА, 2 mM ЭГТА, ингибитор протеинкиназ), лизировали путем пропускания через иглу диаметра 26 мкм, инкубировали при 4°C 20 мин, центрифугировали (720g, 4°C, 20 мин). Осадок ресуспендировали в буфере F и пропускали 10 раз через иглу диаметра 23 мкм. Центрифугировали в тех же условиях, осадок ресуспендировали в буфере TBS (50 mM трис-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl), затем обрабатывали ультразвуком (4°C, мощность 2 амплитуды). Контроль содержания белка и уравнивание концентраций проб для последующего электрофореза осуществляли окрашиванием по классическому методу Бредфорд [48]. Белки разделяли методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле в трис-глициновом буфере с 1% SDS в течение 2 ч, при 4 В/см. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли мокрым способом в трис-глициновом буфере без SDS 45-60 мин, при силе тока 220-250 мА. Для предотвращения неспецифической сорбции антител мембрану в течение 30 мин инкубировали с раствором BSA (5% в TBS). Затем проводили гибридизацию с первичными антителами (Таблица 4) в буфере TBS-Tween (50 mM трис-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) 16-20 ч при 4°C, при постоянном перемешивании. После инкубации мембрану 3 раза промывали в TBS-Tween по 10 мин. Далее

проводили гибридизацию со вторичными антителами 2 ч при 4°C с последующей промывкой TBS-Tween. Белки проявляли, нанося на мембрану реагент для проявления Clarity™ Western ECL Substrate. Анализ проводился путем детекции интенсивности хемилюминесценции с использованием ImageQuant Las 4000 с последующей обработкой изображений с помощью программы ImageJ как описано в [196, 199, 417]. Результаты нормировали на экспрессию белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) или гистон H3 и представляли в виде относительных долей, принимая экспрессию в контрольных образцах за 1.

Таблица 4 - Перечень антител, использованных в работе

Антитело	Фирма производитель, каталожный номер
<i>Оценка трансактивационного потенциала и транслокации GR в ядро клеток</i>	
GR/NR3C1/Glucocorticoid Receptor Antibody (FiGR)	Santa Cruz Biotechnology, sc-12763
Phospho-Glucocorticoid Receptor (Ser211) Polyclonal Antibody (pGR(Ser211))	Invitrogen, PA5-17668
<i>Исследование белков межклеточных контактов</i>	
Connexin 26 Monoclonal Antibody (CX-12H10) (13-8100)	Invitrogen, ThermoFisher, #13-8100
Connexin 30 Recombinant Rabbit mAb (16H9L8)	Invitrogen, ThermoFisher, #700258
Connexin 43 (E7N2R) XP® Rabbit mAb	CellSignaling, 83649S
Connexin 46 Rabbit pAb	Invitrogen, ThermoFisher, #PA5-75883
<i>Оценка уровня экспрессии HER2</i>	
Recombinant Anti-ErbB 2 antibody [EPR19547-12]	Abcam, ab214275
<i>Референсные белки</i>	
GAPDH	Abcam, ab 181602
Anti-Histone H3 antibody - Nuclear Marker	Abcam, ab1791
<i>Вторичные антитела</i>	
Rabbit Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	Abcam, ab6728
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	Abcam, ab97051

2.7. Выделение РНК и обратная транскрипция

Для выделения РНК клетки, не открепляя от подложки, дважды отмывали от среды PBS (рН 7,8). Затем к монослою клеток добавляли тризол, при помощи скребка отделяли лизат от подложки и переносили в пробирки, добавляли хлороформ в соотношении 1:5, перемешивали на вортексе, инкубировали 15 мин при комнатной температуре как описано в [415, 417]. Смесь центрифугировали 10 мин при 4°C, отбирали верхнюю фазу смеси в чистые пробирки, добавляли ледяной изопропанол, инкубировали 15 мин, затем центрифугировали (4°C, 12000 об/мин, 10 мин), сливали супернатант, промывали осадок дважды центрифугированием с 98% этиловым спиртом и растворяли в воде. Концентрацию и чистоту РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop. Реакцию обратной транскрипции проводили набором MMLV RT (Евроген, Россия) по протоколу производителя.

2.8. Количественная полимеразная цепная реакция

2.8.1 Оценка экспрессии генов - регуляторов миграции и метастазирования

Клетки культивировали в присутствии 10 нМ Dex, CpдA, CpдA-03 в течение 120 ч, после чего выделяли тотальную РНК, проводили реакцию ОТ (как описано в п. 2.6). Для оценки влияния на гены, кодирующие белки фокальных адгезий (*CAV1*, *CAV2*, *CAV3*, *ITGA1*, *ITGA2*, *ITGA3*, *ITGA4* (*CD49D*), *ITGA5*, *ITGA6*, *ITGA7*, *ITGA8*, *ITGA9*, *ITGAL*, *ITGAM*, *ITGAV*, *ITGB1*, *ITGB2*, *ITGB3*, *ITGB4*, *ITGB5*, *ITGB6*), плотных контактов (*CLDN1*, *CLDN10*, *CLDN11*, *CLDN12*, *CLDN14*, *CLDN15*, *CLDN16*, *CLDN17*, *CLDN18*, *CLDN19*, *CLDN2*, *CLDN3*, *CLDN4*, *CLDN5*, *CLDN6*, *CLDN7*, *CLDN8*, *CLDN9*, *ESAM*, *F11R*, *ICAM1*, *ICAM2*, *JAM2*, *JAM3*, *OCLN*, *TJP1*, *TJP2*, *TJP3*), щелевых контактов (*GJA1* (*CX43*), *GJA3*, *GJA4*, *GJA5*, *GJA8*, *GJB1* (*CX32*), *GJB2* (*CX26*), *GJB3*, *GJB4*, *GJB5*, *GJB6*, *GJC2*, *GJC3*, *GJD2*), адгерентных контактов (*CDH1* (Е-кадгерин), *CDH2* (N-кадгерин), *DLL1* (*DELTA1*), *NECTIN1*, *NECTIN2*, *NECTIN3*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*), десмосом (*DSC1*, *DSC2*, *DSC3*, *DSG1*, *DSG2*, *DSG3*, *DSG4*, *DSP*, *JUP* (*CTNNG*)), гемидесмосом (*DST*, *PLEC*) была использована панель лиофилизованных праймеров RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, кат. № PAHS-213Z). Для проведения реакции ПЦР к лиофилизованному праймеру добавляли кДНК, смесь для ПЦР qPCRmix-HS и проводили амплификацию в соответствии с рекомендациями производителя (95°C 15 мин, 40 циклов: 95°C 15 сек, 60°C 60 сек). Результаты представляли в виде тепловой диаграммы, отражающей изменений экспрессии генов относительно контроля [417].

2.8.2. Оценка экспрессии GR-зависимых генов

Клетки культивировали в присутствии 10 нМ Dex, CpдA или CpдA-03 в течение 120 ч, после чего выделяли тотальную РНК, проводили реакцию ОТ (как описано в п. 2.6). В работе была использована панель лиофилизированных праймеров RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, кат. № PAHS-154Z) включающая: кофакторы GR (*ATF4*, *CEBPA*, *CEBPB*, *CREB1*, *CREB3*, *CREB3L4*, *NR3C1 (GR)*, *POU2F1*, *POU2F2*, *STAT5A*, *STAT5B*), регуляторы метаболизма глюкозы и жирных кислот (*ASPH*, *GDPD1*, *GLUL*, *GOT1*, *H6PD*, *PDP1*), цитоскелета (*PLEKHF1*, *RHOB*, *RHOJ*, *SNTA1*), эндо- и экзоцитоза (*ANXA4*, *EHD3*, *MERTK*, *PLEKHF1*), ответа на стресс (*BCL6*, *DDIT4 (REDD1)*, *PDCD7*, *SESNI*, *SGK1*), циркадных ритмов (*PER1*, *PER2*), процессинга РНК (*ADARB1*, *AFF1*, *HNRNPLL*), фолдинга белка (*FKBP5*, *LOX*), факторы транскрипции (*ARID5B*, *CEBPB*, *FOSL2*, *KLF13*, *KLF9*, *NFKBIA*, *TBL1XR1*, *TNFAIP3*, *TSC22D3*, *VDR*, *ZFP36*, *ZHX3*), рецепторы клеточной поверхности (*CALCR*, *GHRHR*, *PDGFRB*, *VLDLR*), каналы и транспортные белки (*AQP1*, *SLC10A6*, *SLC19A2*, *SLC22A5*), регуляторы передачи сигналов (*BMPER*, *DIRAS2*, *DUSP1*, *NFKBIA*, *PIK3R1*, *PLD1*, *RASA3*, *RGS2*, *SESNI*, *SGK1*, *SPHK1*, *TNF*, *USP2*), метаболизма нуклеотидов (*AK2*, *AMPD3*, *XDH*), цитокины и хемокины (*EDN1*, *IL10*, *IL1RN*, *IL6*, *IL6R*, *TNF*), факторы роста (*ANGPTL4*, *CCN2*), молекулы внеклеточного матрикса (*COL4A2*, *HAS2*, *LOX*), металлопротеины (*MT1E*, *MT2A*) и другие GR-респонсивные гены (*CYB561*, *ERRF11*, *SPSB1*, *USP54*, *ZNF281*) [42-44, 55]. Для проведения реакции ПЦР к лиофилизованному праймеру добавляли кДНК, готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS и проводили амплификацию в соответствии с рекомендациями производителя (95°C 15 мин, 40 циклов: 95°C 15 сек, 60°C 60 сек). Результаты представляли в виде тепловой диаграммы, отражающей изменений экспрессии генов относительно контроля.

Дополнительно, на основании литературного поиска среди GR-зависимых генов, были отобраны для анализа ряд генов, связанных с активацией воспаления (*INOS*, *COX2*, *IL6*, *IL8*, *IL17R*), прохождением клеток по фазам клеточного цикла (*CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *c-JUN*), целевыми контактами (*GJB1*, *GJB2*), миграцией клеток ПМЖ (*DSC1*, *RHOB*, *SK1*, *MMP9*, *MMP13*, *ICAM1*, *ANXA1*, *CSF1*, *COL1A1*, *FIBL1*, *MKP1*, *c-JUN*), трансактивацией GR (*FKBP51*, *GILZ*, *ALOX5AP*, *CD86*, *CRY*) [25, 31, 38, 42-44, 55, 63, 81, 84, 85, 87, 96, 98, 102, 107, 109, 117, 125, 129, 135, 137, 147, 150, 166, 179, 184, 187, 301, 345, 358]. Клетки культивировали в присутствии Dex, CpдA или CpдA-03 в течение 4 или 24 ч, после чего выделяли тотальную РНК, проводили реакцию ОТ (как описано в п. 2.6). Для проведения реакции ПЦР к 10 нМ смеси прямого (F) и обратного (R) праймера (Таблица 5) добавляли 500 мкг кДНК, готовую

смесь для ПЦР qPCRmix-HS и проводили амплификацию (95°C 5 мин, 40 циклов: 95°C 15 сек, 56/58°C 20 сек, 72°C 30 сек). Относительное изменение экспрессии исследуемой мРНК вычисляли методом $\Delta\Delta C_t$, где $\Delta\Delta C_t$ определяли путем вычитания среднего значения ΔC_t для контрольного гена из ΔC_t для экспериментальных образцов [188]. Для каждого гена интереса ПЦР-анализ был проведен в трех повторах. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта генов *RPL27* и *RPLP0*. Результаты представляли в относительных долях, принимая экспрессию в контрольных образцах за 1.

Таблица 5 - Последовательности используемых в работе праймеров

Ген	Кодируемый белок	Последовательности праймеров 5'-3'
<i>INOS</i>	Индукцибельная синтаза оксида азота	F: CGGCCATCACCGTGTCCCC R: TGCAGTCGAGTGGTGGTCCA
<i>COX2</i>	Циклооксигеназа-2	F: CCGGGTACAATCGCACTTAT R: GGCGCTCAGCCATACAG
<i>IL6</i>	Интерлейкин 6	F: ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG R: CCATCTTTGGAAGG TTCAGGTTG
<i>IL8</i>	Интерлейкин 8	F: TCCTGATTTCTGCAGCTCTGTG R: TCCAGACAGAGCTCTCTTCAAT
<i>IL17R</i>	Рецептор интерлейкина 17	F: TGTCGTCTATCGGGAAGGAG R: CGGTAAGCTACATCGTGCATTA
<i>CCND1</i>	Циклин Д1	F: GCTGGAGCCCGTGAAAAAGA R: CTCCGCCTCTGGCATT TTG
<i>CCND2</i>	Циклин Д2	F: CTACCTCCGCAGTGCTCCTA R: CCCAGCCAAGAAACGGTCC
<i>CCND3</i>	Циклин Д3	F: TACCCGCCATCCATGATCG R: AGGCAGTCCACTTCAGTGC
<i>GJB1</i>	Коннексин	F: TGGAAGAGGTAAAGAGACACAAGG R: CGGGGTAGAGCAGATAGAAGACA
<i>GJB2</i>	Коннексин	F: AGCATCCTCGGGGGTGTCAAC R: CCGGAAGAAGATGCTGGTGGTGTA
<i>DSC1</i>	Десмоколлин 1	F: ATGGGCTCCTATTCCAGCTT R: TCTGCAGTTGTTGCATAGCC
<i>RHOV</i>	Киназа В семейства генов-гомологов Ras	F: CTGCTGATCGTGTTCAGTAAGG R: TCAATGTCCGCCACATAGTTC

<i>SKI</i>	Сфингозин киназа 1	F: AGAGTGGGTTCCAAGACACCT R: GGGTGCAGCAAACATCTCAC
<i>MMP9</i>	Металлпротеиназа 9	F: TGTACCGCTATGGTTACACTCG R: GGCAGGGACAGTTGCTTCT
<i>MMP13</i>	Металлпротеиназа 13	F: TCCTGATGTGGGTGAATACAATG R: GCCATCGTGAAGTCTGGTAAAT
<i>ICAM1</i>	Молекула межклеточной адгезии 1	F: ATGCCCAGACATCTGTGTCC R: GGGGTCTCTATGCCCAACAA
<i>ANXA1</i>	Аннексин А1	F: CTAAGCGAAACAATGCACAGC R: CCTCCTCAAGGTGACCTGTAA
<i>CSF1</i>	Колониестимулирующий фактор	F: TGGCGAGCAGGAGTATCAC R: AGGTCTCCATCTGACTGTCAAT
<i>COL1A1</i>	Коллаген А1	F: GTGCGATGACGTGATCTGTGA R: CGGTGGTTTCTTGGTCGGT
<i>FIBL1</i>	Фибуллин	F: AGAGCTGCGAGTACAGCCT R: CGACATCCAAATCTCCGGTCT
<i>MKP1</i>	Фосфатаза MAP-киназы	F: GCCTTGCTTACCTTATGAGGAC R: GGGGAAGTTGAACACGGTG
<i>c-JUN</i>	ТФ JUN	F: GTCCTCCATAAATGCCTGTTCC R: GATGCAACCCACTGACCAGAT
<i>FKBP51</i>	Белок, связывающий FK506-51	F: GAATGGTGAGGAAACGCCGAT R: TGCCAAGACTAAAGACAAATGGT
<i>GILZ</i>	ГС-индуцибельная лейциновая молния	F: AACACCGAAATGTATCAGACCC R: TGTCCAGCTTAACGGAAACCA
<i>ALOX5AP</i>	Активирующий 5-липоксигеназу	F: TTGCCTTTGAGCGGGTCTAC R: GCCTCACAAACAAGTACATCAGT
<i>REDD1 (DDIT4)</i>	Транскрипт 4, индуцируемый повреждением ДНК	F: TAGCCTTTGGGACCGCTTCTCGT R: CAGGTAAGCCGTGTCTTCTCCG
<i>RPLP0</i>	Рибосомный белок LP0	F: CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCATCCA R: CAGACACTGGCAACATTGCGGACAC
<i>RPL27</i>	Рибосомный белок L27	F: ACC GCT ACC CCC GCA AAG TG R: CCC GTC GGG CCT TGC GTT TA

2.9. Люциферазный репортерный анализ

Для получения сублиний (NFκB-Nluc), используемых в люциферазном репортерном анализе использовали вектор, несущий пять кодирующих последовательностей NFκB-RE и белок люциферазы NlucP (Рисунок 11). В качестве контроля дополнительно был использован вектор аналогичной конструкции без последовательности NFκB-RE (сублинии mCMV-Nluc). Трансфекцию клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 проводили с помощью трансфекционного реагента TurboFect по протоколу производителя. Полученные сублинии рассевали в 96-луночные планшеты по 20 тыс. клеток на лунку, через 16-24 ч вносили 10 нМ Dex, CpдA, CpдA-03 или 0,1% ДМСО, инкубировали 24 ч. Детекцию интенсивности экспрессии люциферазы проводили на люминометре, используя набор NanoLuc detection kit. Затем проводили нормировку на интенсивность сигнала в линиях mCMV-Nluc. Результаты представляли в виде относительных долей, принимая активацию NFκB в контрольных образцах за единицу.

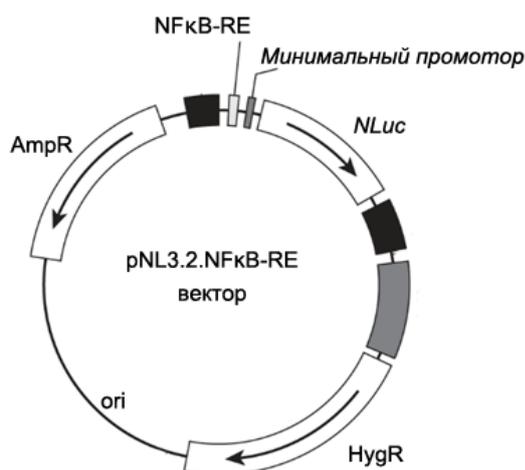


Рисунок 11 - Структура вектора, кодирующего NanoLuc® люциферазу и NFκB-RE

2.10. Исследование миграционной активности

2.10.1. Миграция клеток через поры камеры Бойдена

Клетки культивировали в присутствии 10 нМ Dex, CpдA, CpдA-03 или растворителя (0,1% DMSO) в течение 120 ч, затем открепляли от подложки раствором трипсина-ЭДТА, ресуспендировали в среде без сыворотки (25000 клеток в 200 мкл) и вносили в верхнюю часть камеры Бойдена. Камеру размещали в лунке 24-луночного планшета, содержащей 500 мкл

культуральной среды. Через 24 ч вставки промывали в PBS, ватной палочкой удаляли непромигрировавшие клетки с поверхности мембраны, фиксировали 4 мин в формалине (4% в PBS), отмывали PBS. Затем клетки окрашивали SYBR Gold 4 мин. Далее вставку помещали на предметное стекло и с помощью микроскопа подсчитывали число промигрировавших клеток на внешней стороне мембраны. Число клеток в контрольных образцах принимали за 100%.

2.10.2. Тест на застание раны

Клетки культивировали в присутствии 10 нМ Dex, CpдA, CpдA-03 или растворителя (0,1% DMSO) в течение 120 ч, затем открепляли от подложки раствором трипсина-ЭДТА, ресуспендировали и высевали на чашки в количестве, достаточном для достижения монослоя через 16-24 ч. Затем в монослое клеток наконечником дозатора проводили 3 параллельные раны, проводили смену культуральной среды и вносили в культуральную среду 10 нМ Dex, CpдA, CpдA-03 или растворителя (0,1% ДМСО). Наблюдали под микроскопом через 4 и 24 ч. Для анализа динамики изменения межклеточного расстояния измеряли межклеточное расстояние в 5 областях в 5 полях зрения.

2.11 Ядерно-магнитный резонанс

Соединение растворяли в концентрации 5 мг/мл в дейтерированной воде (pH 7,3) без или с добавлением трифторуксусной кислоты (до pH 2,0), или металлического натрия (до pH 12,0). Инкубировали в темноте или подвергали действию ультрафиолетового света (УФ), длина волны 254 нм в течение 8 ч. ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР спектры регистрировали дважды: в первый день и после 30-дневной инкубации при комнатной температуре. Анализ был проведен с помощью прибора Bruker DPX-300 (резонансные частоты ¹H=300 МГц, ¹³C=75 МГц). О стабильности соединения судили по соотношению полученных спектров до и после инкубации в различных условиях.

2.12 Анализ целостности щелевых контактов

Клетки IAR2 рассаживали по 100 тыс. в лунки 24-луночного планшета. После формирования клетками монослоя в лунки вносили Dex, CpдA, CpдA-03 в субтоксичной концентрации (10 мкМ) и инкубировали еще 24 ч. В качестве положительного контроля разобщения щелевых контактов за 4 ч до окончания инкубации в 2 лунки вносили 5 мкг/мл

тетрадеканоил-форбол-13-ацетата (ТРА). Затем удаляли культуральную среду, отмывали PBS. Затем в центр лунки вносили 0,5 мг/мл (рН 7,2) раствор люцифера желтого (Lucifer yellow), скальпелем проводили 3 вертикальные и 3 горизонтальные повреждающие царапины по монослою клеток [27]. Инкубировали при 37°C 5 мин. Затем лунки промывали PBS, фиксировали клетки 4 мин в формалине (4% в PBS). Производили фотосъемку в области раны. Регистрировали степень целостности межклеточных контактов по миграции красителя от раны в монослой путем подсчета количества слоев клеток от края раны [27].

2.13 Молекулярный докинг

Для оценки аффинности *in silico* использовали метод молекулярного докинга. Структуры Dex и CpdA-03 были оптимизированы с помощью пакета программ Avogadro 1.2.0. Структура GR в активной конформации была получена из открытой базы ProteinBank. Докинг осуществляли с помощью пакета программ Molegro Virtual Docker 6.0. в отношении лиганд-связывающего домена.

2.14. Статистическая обработка данных

Эксперименты на клеточных культурах проведены в 3 биологических и 2 технических повторях. Статистическая обработка полученных данных была проведена с помощью пакета программ GraphPad Prism версии 8.2.1. Нормальность полученных выборок значений проверяли по критерию Колмогорова-Смирнова. Для сравнения выборок нормального распределения и равных дисперсий применялся тест Стьюдента; для трех и более выборок сравнение проводили с помощью дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия Даннета. Результаты, представленные в формате столбчатых диаграмм, отражают средние значения (M), а планки погрешностей – стандартные отклонения (SD). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

В представленном исследовании был проведен анализ эффектов нового соединения CpдA-03 в сравнении с хорошо изученным SEGRA CpдA и применяемым в клинической практике лигандом GR - Dex. В связи с этим, первая часть исследования была посвящена подтверждению аффинности CpдA-03 к GR в клетках, а также изучению стабильности CpдA-03 в различных условиях. Затем было проанализировано действие Dex, CpдA и CpдA-03 на пролиферацию клеток РМЖ. На следующем этапе была проведена оценка трансаактивационного потенциала CpдA-03 в сравнении с Dex и CpдA. В завершении работы был проведен ряд экспериментов по оценке влияния Dex, CpдA и CpдA-03 на миграционную активность клеток РМЖ и экспрессию генов и белков, участвующих в регуляции межклеточных контактов.

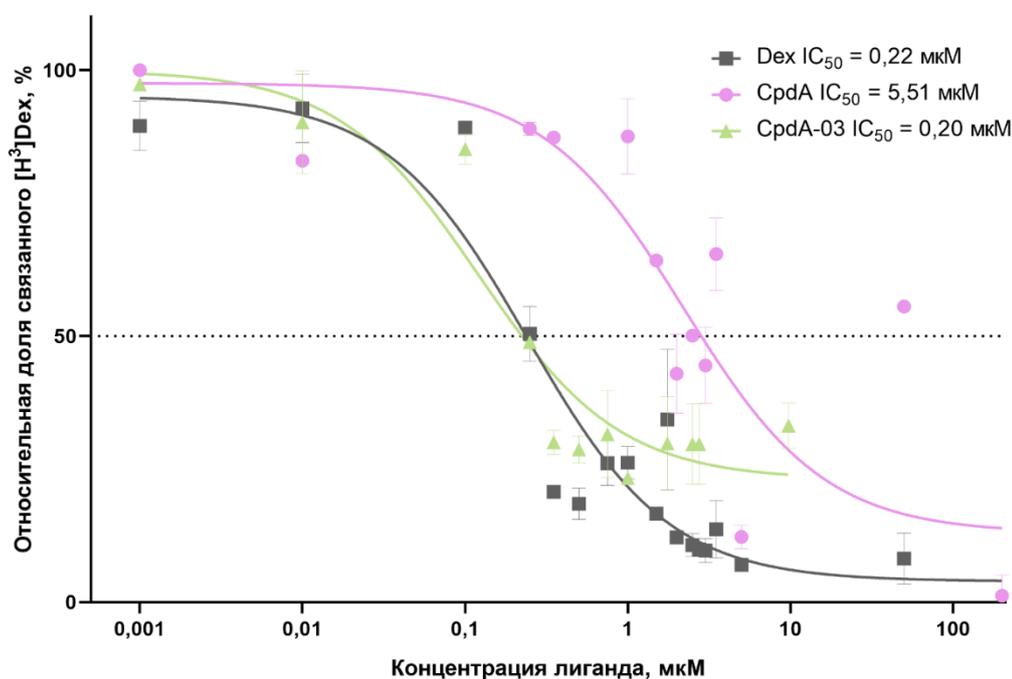
3.1 Оценка аффинности CpдA-03 к GR

В работе были использованы клеточные различного происхождения. Для сравнительной оценки аффинности лигандов к рецептору была использована линия хронического миелолейкоза K562, которая на стабильно высоком уровне экспрессирует GR. Более того, ранее данная клеточная модель была использована для исследования противоопухолевого потенциала CpдA-03 и продемонстрировала высокую чувствительность к препарату [417].

На первом этапе работы был проведен сравнительный анализ аффинности CpдA-03 и известных лигандов, CpдA и Dex, к GR. Для этого использован классический радиолигандный анализ в клеточной системе. Для проведения эксперимента ранее в сотрудничестве с кафедрой радиохимии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова был получен меченный тритием Dex ($[^3\text{H}]\text{Dex}$), а также подобраны условия инкубации и получены калибровочные кривые [28]. Клетки инкубировали с 0,5 мкМ $[^3\text{H}]\text{Dex}$ 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 $[^3\text{H}]\text{Dex}$ в клетках. Результаты представляли в процентах от максимального сигнала (при инкубации в присутствии $[^3\text{H}]\text{Dex}$ без добавления конкурентов).

Полученные зависимости доли связанного $[^3\text{H}]\text{Dex}$ от концентрации конкурирующего лиганда имеют вид классических кривых насыщения (Рисунок 12). IC₅₀ связывания составила для Dex - 0,22±0,08 мкМ, для CpдA - 5,51±2,21 мкМ, для CpдA-03 - 0,20±0,06 мкМ. CpдA и CpдA-03 обладают высокой цитотоксичностью в отношении клеток K562 [417], что объясняет

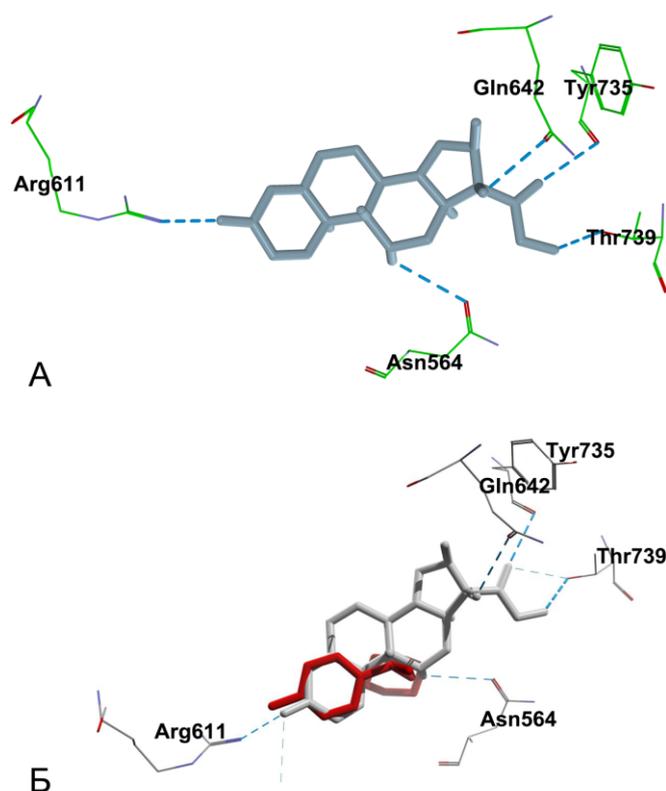
низкую сходимость значений, полученных для образцов, инкубированных с CpдA в концентрациях выше 1 мкМ.



Клетки инкубировали 90 мин с [³H]Dex в присутствии Dex, CpдA или CpдA-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 только с [³H]Dex принят за 100%

Рисунок 12 – Оценка аффинности Dex, CpдA и CpдA-03 к GR радиолигандным методом

В дополнение к экспериментам в клеточной системе, было проведено компьютерное моделирование взаимодействия CpдA-03 с лиганд-связывающим доменом GR (Рисунок 13). Результаты *in silico* моделирования свидетельствуют о том, что молекула CpдA-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 Cpda-03 с GR.

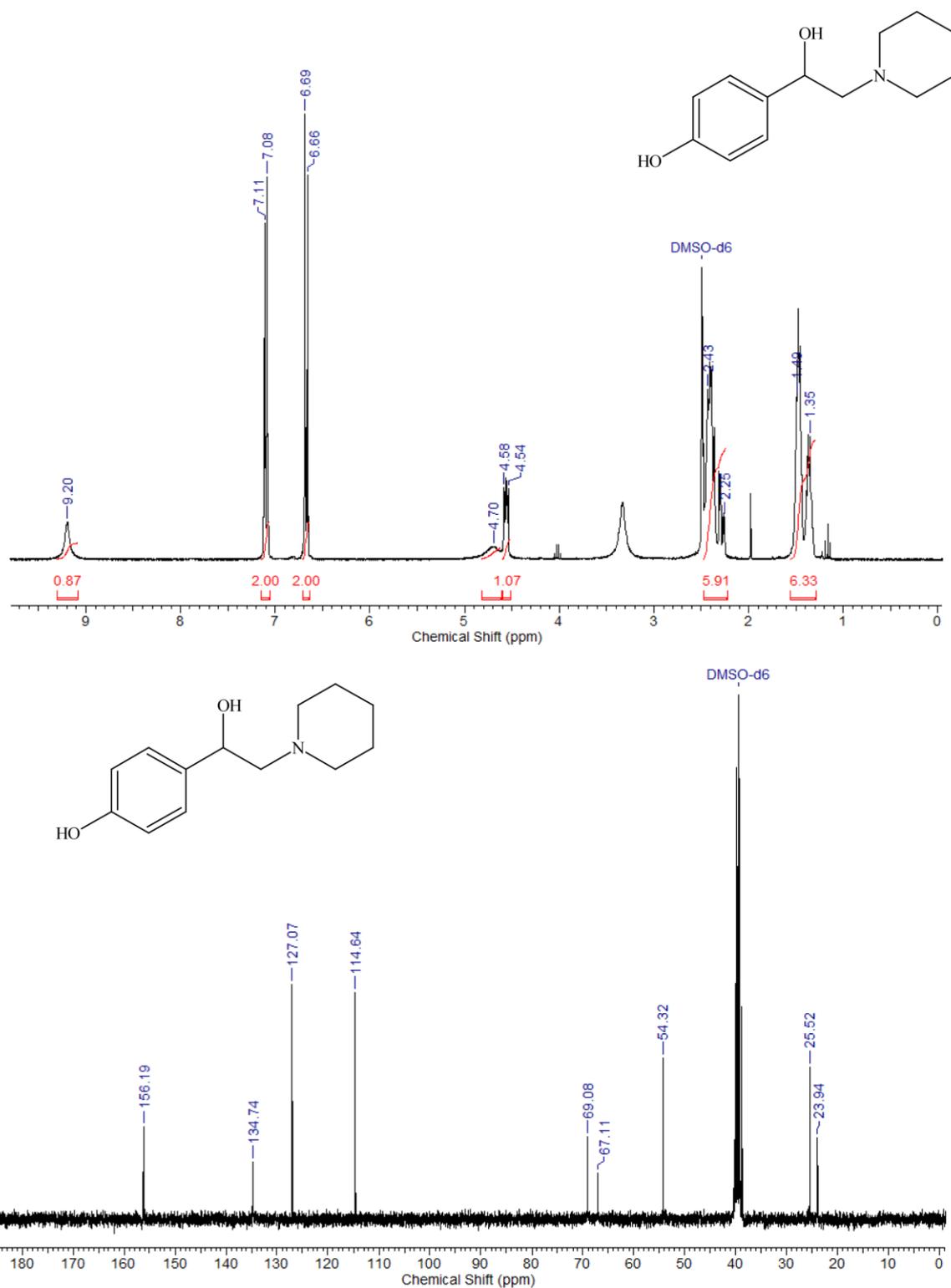
Рисунок 13 – Модель взаимодействия Dex и Cpda-03 с лиганд-связывающим доменом GR

Таким образом было показано, что Cpda-03 обладает сравнимой с Dex аффинностью к GR, что обусловлено связыванием молекулы с аминокислотными остатками в лиганд-связывающем домене GR.

3.2 Оценка стабильности молекулы Cpda-03

Одним из основных критериев одобрения соединения к применению в клинической практике является его стабильность. Министерство Здравоохранения Российской Федерации рекомендует исследовать стабильность соединений при длительном (от 1 месяца) хранении при комнатной температуре, при действии УФ-излучения, а также при различных значениях pH растворителя [2]. С помощью метода ЯМР-спектроскопии в сотрудничестве с ЦКП ИТХТ РТУ

МИРЭА была проанализирована стабильность молекулы в перечисленных выше условиях. Во всех экспериментах при анализе структуры соединения было показано, что полученные спектры полностью идентичны спектрам исходного соединения. На рисунке 14 приведены спектры ^1H (верхняя панель) и ^{13}C (нижняя панель) 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.



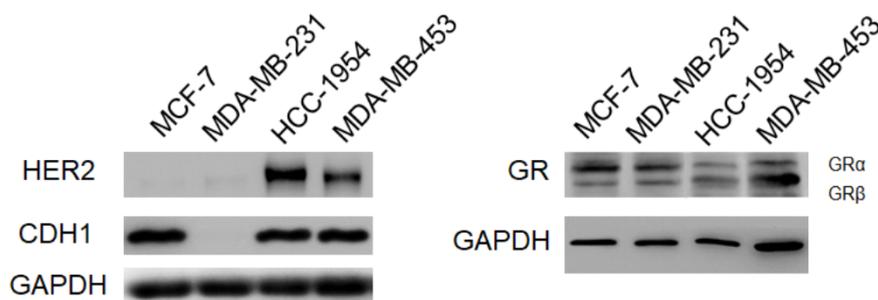
Соединение CrdA-03 (5 мг/мл) инкубировали в растворителях при значениях pH 2,0-10,0 в течение 30 дней при комнатной температуре, а также под действием УФ света (длин волны 254 нм) в течение 8 ч. Спектры регистрировали на приборе Bruker DPX-300 (резонансные частоты ^1H =300 МГц, ^{13}C =75 МГц)

Рисунок 14 – ЯМР спектры CrdA-03, полученные при растворении соединения в D₂O

Таким образом было показано, что CpдA-03 обладает высокой стабильностью при долговременном хранении в водных растворах в широком диапазоне pH, а также при действии УФ-излучения.

3.3 Антипролиферативные эффекты SEGRA

Для проведения следующего этапа исследования были подобраны клеточные линии РМЖ, различные по своим морфологическим характеристикам и происхождению. Данные клеточные линии подробно охарактеризованы и широко используются для исследования молекулярных механизмов пролиферации и апоптоза при РМЖ. Линия MDA-MB-231 имеет базальное происхождение, относится к TN подтипу, имеет высокую экспрессию мезенхимальных маркеров, обладает высокой миграционной активностью и отсутствием детектируемого E-кадгерина (Рисунок 15). Линия MCF-7 характеризуется высокой экспрессией ER α и PR, а также E-кадгерина (CDH1), и относится к люминальному A подтипу. Линия MDA-MB-453 характеризуется отсутствием экспрессии ER α и PR, в то же время, экспрессирует HER2. Клетки линии HCC-1954 относятся к HER2-позитивному подтипу, в то же время характеризуются высокой экспрессией E-кадгерина. На первом этапе работы была оценена базальная экспрессия GR в модельных линиях. Было показано, что клетки линий MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, HCC-1954 стабильно экспрессируют основные изоформы белка GR на разном уровне.

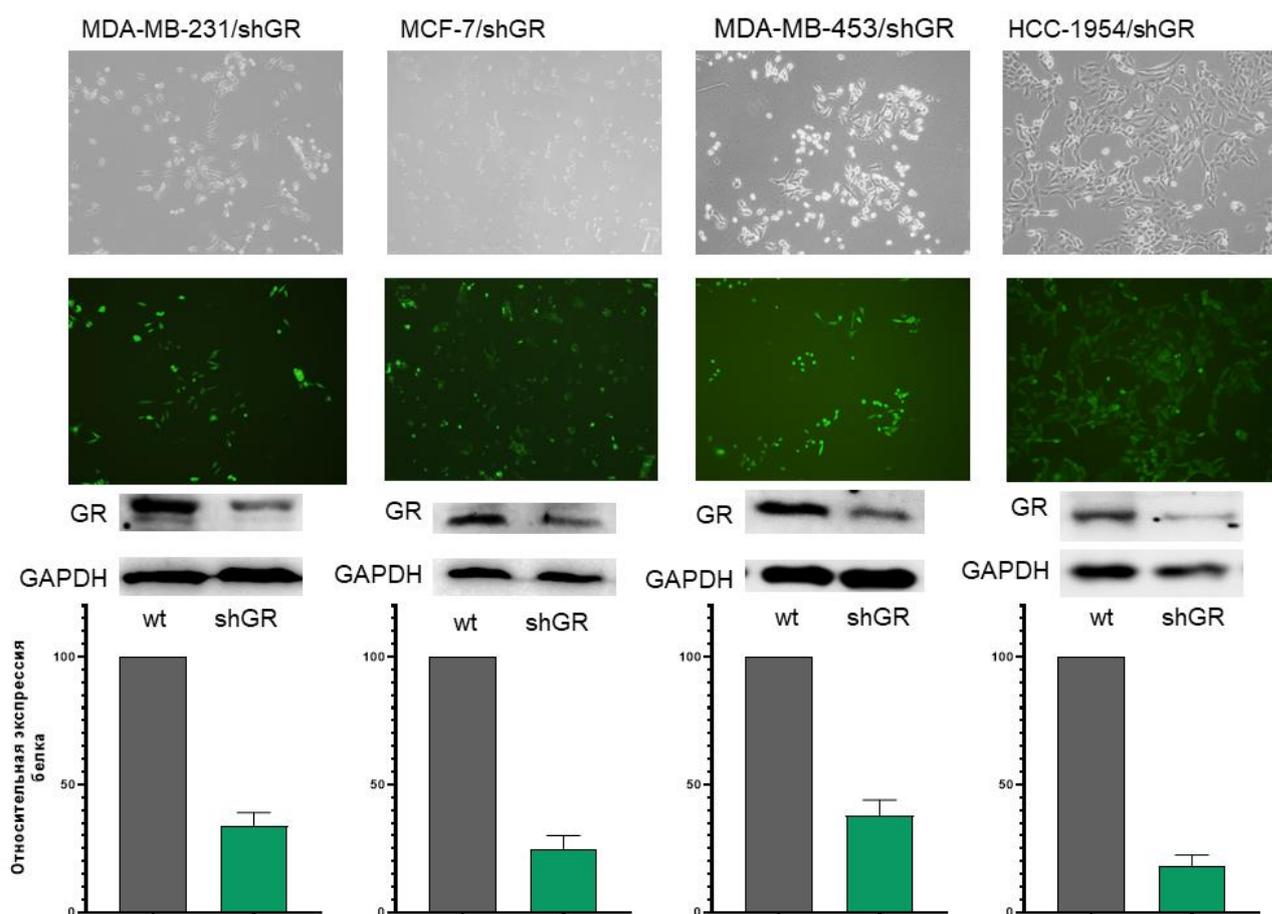


Экспрессия HER2, CDH1 и GR в клетках MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 и HCC-1954 была определена методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител

Рисунок 15 - Экспрессия белков HER2, CDH1 и GR в клеточных линиях

Одной из задач исследования был анализ роли GR в наблюдаемых эффектах. Для ее реализации с помощью лентивирусной трансдукции вектора, кодирующего shRNA к мРНК GR,

были получены стабильные субклоны клеток с подавленной экспрессией рецептора: MCF-7/shGR, MDA-MB-231/shGR, MDA-MB-453/shGR и HCC-1954/shGR (Рисунок 16). 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.

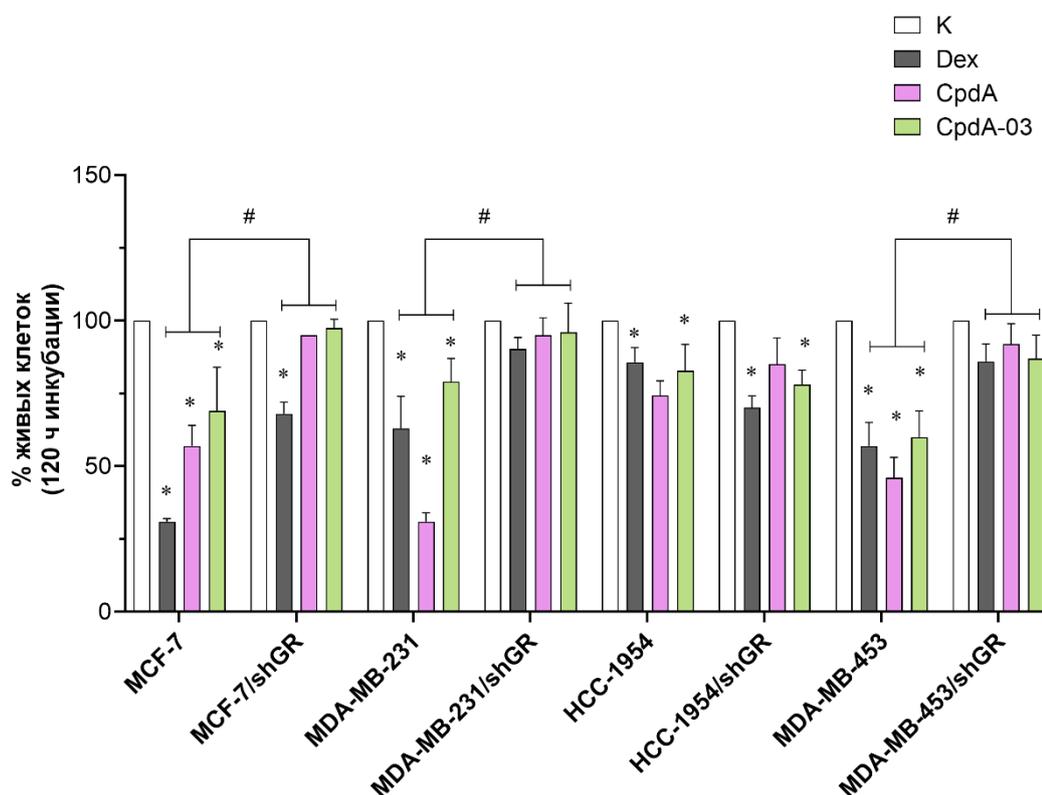


Экспрессия GR в клетках MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, HCC-1954, а также в полученных сублиниях MCF-7/shGR, MDA-MB-231/shGR, MDA-MB-453/shGR, HCC-1954/shGR оценивали методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител. Количественный анализ проводили путем денситометрического сканирования с использованием компьютерной программы Image Quant для Windows. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня GAPDH. Экспрессия GFP регистрировалась с помощью флуоресцентного микроскопа в УФ-свете

Рисунок 16 – Характеристика полученных сублиний клеток с нокдауном GR

ГС не обладают цитотоксическим действием в отношении эпителиальных клеток, однако проявляют антипролиферативный эффект в отношении клеток РМЖ [67, 414]. Поэтому одним из ожидаемых свойств разрабатываемого SEGRA является антипролиферативное действие. Предварительно был проведен МТТ-тест, в котором было показано, что при кратковременной (24 ч) инкубации в диапазоне концентраций 0,1 нМ - 10 мкМ СрдА-03 не достигается IC50. В концентрациях ниже 10 нМ соединения не вызывали уменьшение доли жизнеспособных клеток.

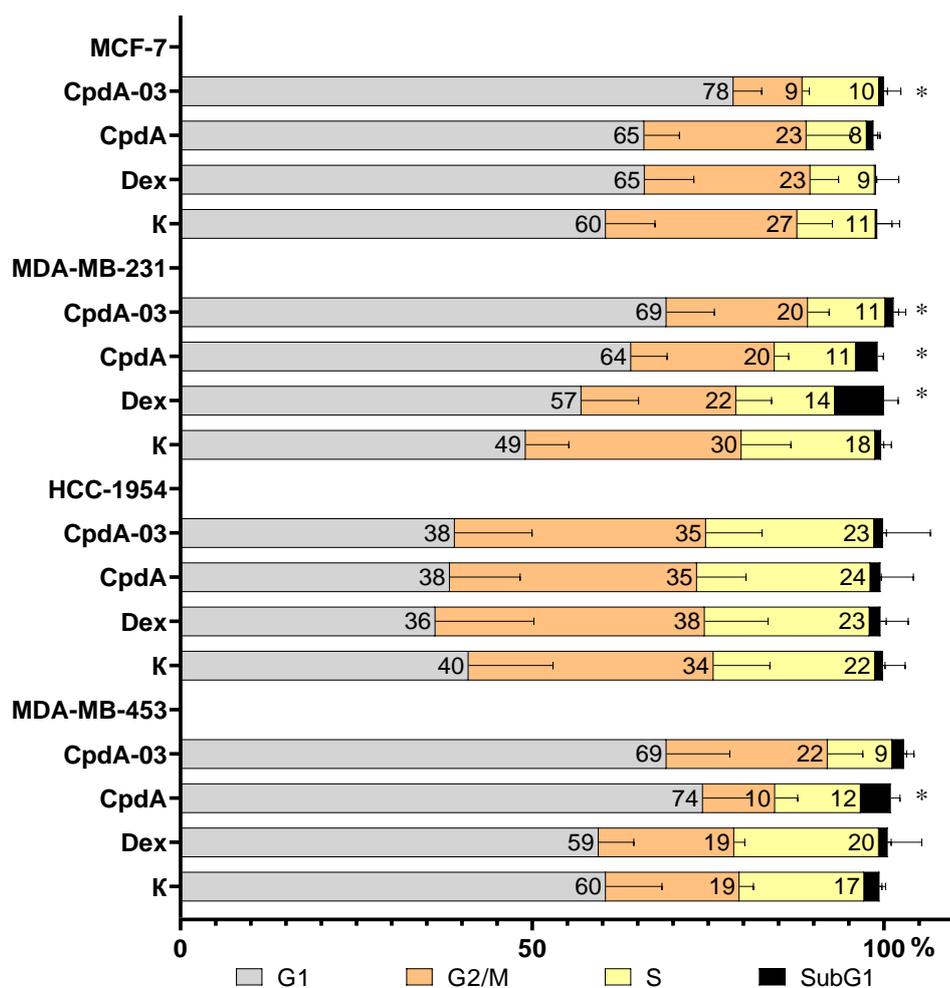
Для определения влияния исследуемых соединений на пролиферацию клеток РМЖ проводили инкубацию клеток с СрдА-03, СрдА или Дех в концентрации 10 нМ. Подсчет числа живых клеток проводили на 5 сутки от первого внесения исследуемых веществ. На рисунке 17 приведены данные сравнения доли живых клеток относительно обработанного растворителем (ДМСО) контроля после 5 суток инкубации с исследуемыми препаратами. СрдА-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 не обладали или проявляли сравнительно низкую чувствительность к лигандам GR. Наиболее чувствительны к цитостатическому действию лигандов GR различной природы были клетки линии люминального РМЖ MCF-7. Выживаемость клеток данной линии была обратно пропорциональна описанным ранее уровням аффинности лигандов с GR. Пролиферация клеток MCF-7 под действием Дех, СрдА и СрдА-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 СрдА-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, в то время как пролиферативная активность линии MCF-7/shGR после 120 ч инкубации с Дех снижалась на 32 ± 4 %, а линии HCC-1954/shGR при действии Дех и СрдА-03 на 29 ± 4 и 22 ± 5 %, соответственно.



Клетки инкубировали 120 ч с 10 нМ Dex, CpдA, CpдA-03, затем проводили 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 нокадауном GR, $p < 0,05$

Рисунок 17 - Процент жизнеспособных клеток РМЖ после инкубации с лигандами GR

С помощью метода проточной цитометрии с окрашиванием PI был проведен анализ изменения распределения клеток по фазам клеточного цикла после 120 ч инкубации с исследуемыми препаратами (Рисунок 18). CpдA-03 вызывал накопление клеток MCF-7 и MDA-MB-231 в G1 фазе клеточного цикла: доля клеток в фазе G1 увеличивалась с 60 до 78% и с 49 до 69% или на 18 и 20% соответственно. CpдA индуцировал клеточный арест в клетках линий MDA-MB-453 и MDA-MB-231. Доля клеток в фазе G1 клеточного цикла в данных линиях при действии CpдA увеличивалась на 14 и 15% соответственно. Также Dex индуцировал гибель клеток: в линии MDA-MB-231 доля регистрируемых событий в фазе subG1, соответствующей апоптотическим и некротическим клеткам, увеличивалась до 7%.

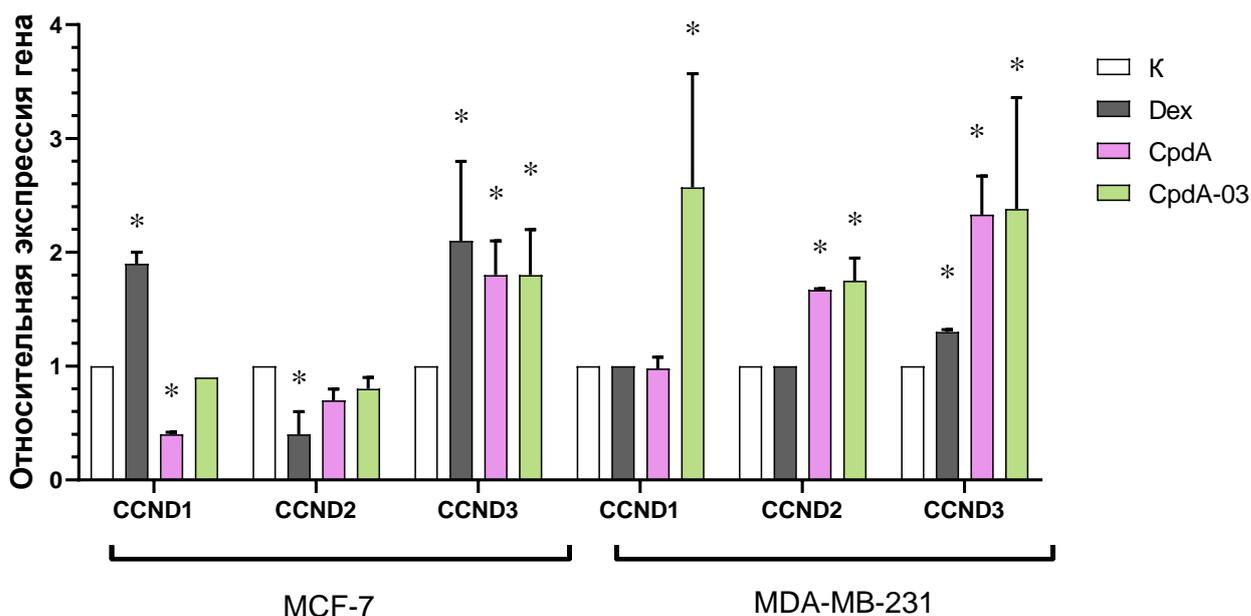


Клетки инкубировали с 10 нМ Dex, CpdA, CpdA-03 120 ч, затем фиксировали в этаноле, окрашивали PI и анализировали на проточном цитофлуориметре. * - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 18 - Распределение клеток РМЖ по фазам клеточного цикла при действии лигандов GR

Для более детального исследования механизмов действия CpdA-03 в клетках были выбраны две наиболее чувствительные к исследуемым соединениям и при этом высоко экспрессирующие GR линии: клетки люминального РМЖ MCF-7 и ТН РМЖ MDA-MB-231.

В дополнение к описанным выше результатам методом количественной ПЦР была оценена экспрессия маркеров прохождения по фазам клеточного цикла (Рисунок 19). После 24 ч инкубации с Dex наблюдается повышение экспрессии *CCND1* и *CCND3* в 1,9 и 2,1 раза одновременно со снижением экспрессии *CCND2* в 2,5 раза в линии MCF-7. Уровень экспрессии *CCND3* повышался в обеих клеточных линиях под действием лигандов GR. При инкубации с CpdA-03 в клетках линии MDA-MB-231 гены *CCND1*, *CCND2*, *CCND3* повышаются в 2,6, 1,8 и 2,4 раза соответственно.



Клетки инкубировали с Dex, CpдA или CpдA-03 в течение 24 ч. Оценка уровня экспрессии генов была проведена методом количественной ПЦР. Результаты нормированы на уровень экспрессии гена *RPL27*. * - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 19 – Анализ экспрессии циклинов в клетках PMЖ

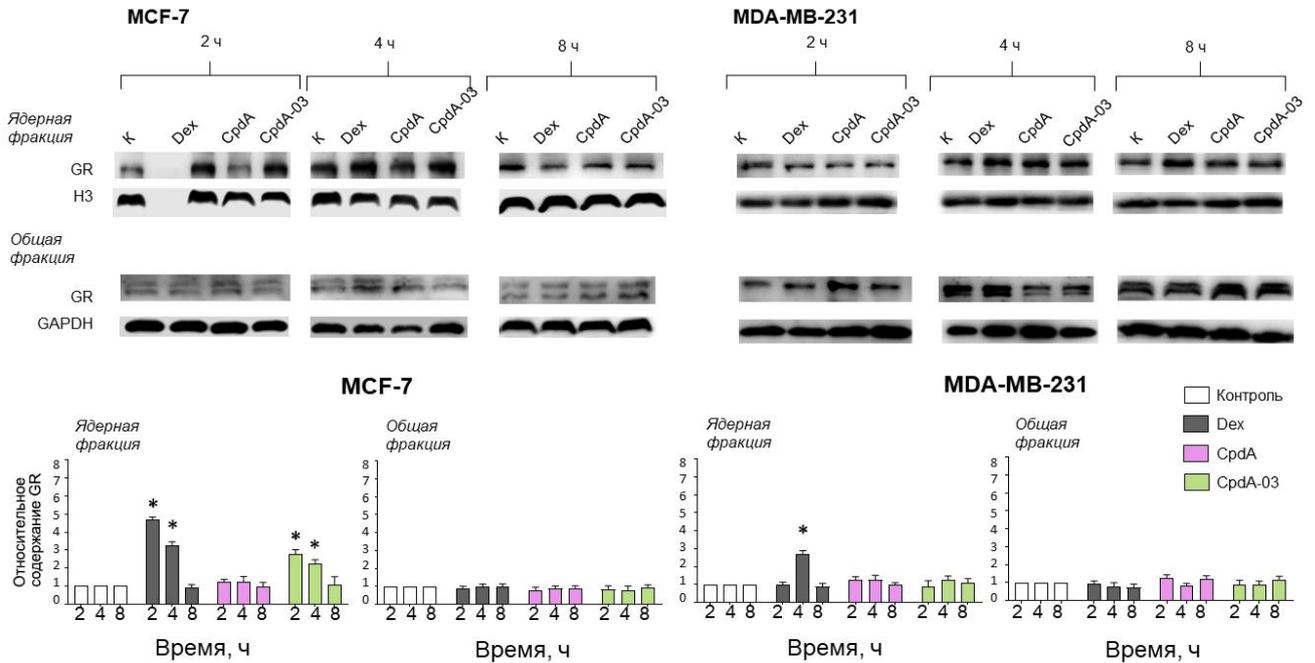
Таким образом было показано, что исследуемые соединения обладают GR-зависимым антипролиферативным эффектом в отношении клеток PMЖ *in vitro*.

3.4 Оценка трансактивационного и трансрессорного потенциала CpдA и CpдA-03 в клетках PMЖ

3.4.1 Исследование влияния CpдA и CpдA-03 на транслокацию GR в ядро клеток PMЖ

Для исследования функциональной активности GR под действием GC и исследуемых нестероидных лигандов, была оценена динамика транслокации GR в ядро. Для этого клетки инкубировали с исследуемыми препаратами в течение 2-8 ч, затем из каждого образца выделяли общую и ядерную фракцию белка, в которых методом вестерн-блоттинга анализировали содержание GR (Рисунок 20). Через 2 ч после внесения препаратов, существенное увеличение ядерной фракции GR в клетках MCF-7 наблюдали 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 от значений в контрольных образцах), 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 в сравнении с контролем), а затем снижался до контрольного уровня.



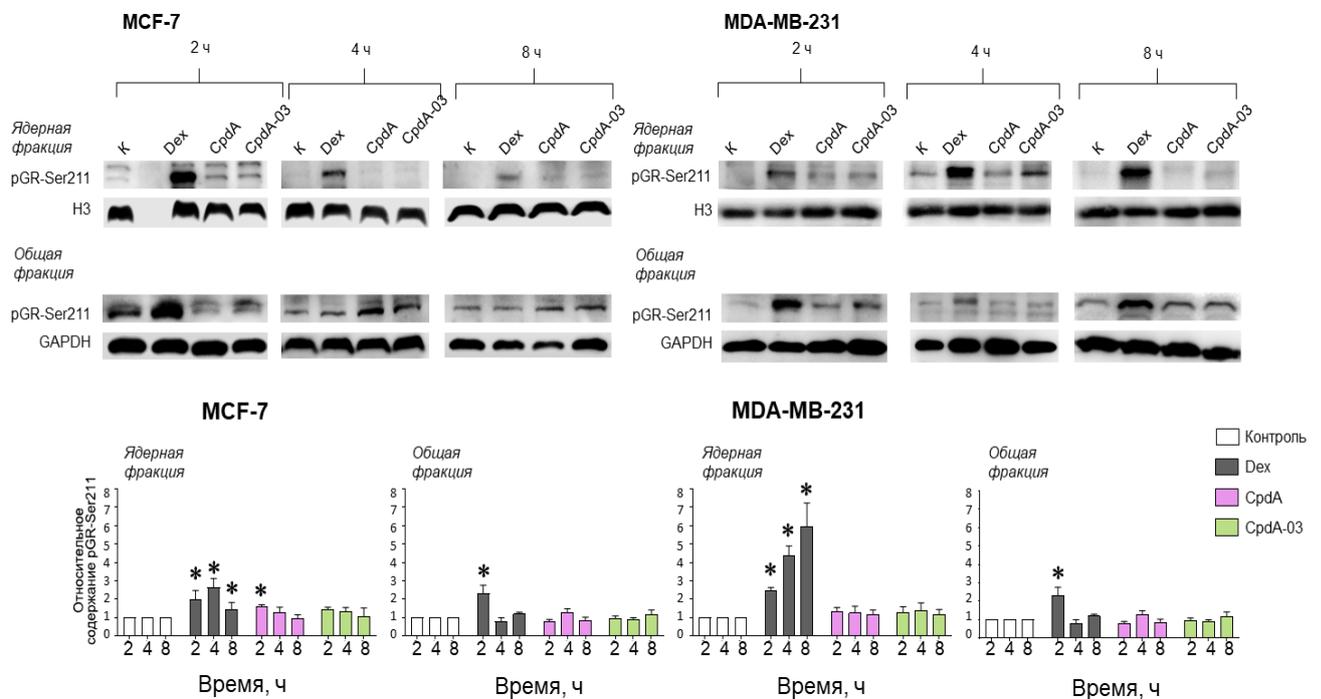
Уровень белка GR в цитоплазматической и ядерной фракциях клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 определяли после инкубации с 10 нМ Dex/CpdA/CpdA-03 в течение 2, 4 или 8 ч методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител. Количественный анализ проводили путем денситометрического сканирования с использованием компьютерной программы Image Quant для Windows. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня GAPDH или гистона H3. * - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 20 - Уровень белка GR в ядерной фракции клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 после инкубации с Dex/CpdA/CpdA-03 в течение 2, 4 или 8 ч

3.4.2 Оценка влияния CpdA и CpdA-03 на уровень фосфорилирования GR в клетках РМЖ

Фосфорилированный по Ser211 GR обладает наиболее высокой транскрипционной активностью [212]. Также фосфорилирование по Ser211 является маркером запуска транскрипционного механизма [376]. В связи с этим, был проведен анализ

фосфорилированной формы GR (pGR-Ser211) в ядерной и общей фракции белка после обработки исследуемыми препаратами (Рисунок 21). 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 наблюдали 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.

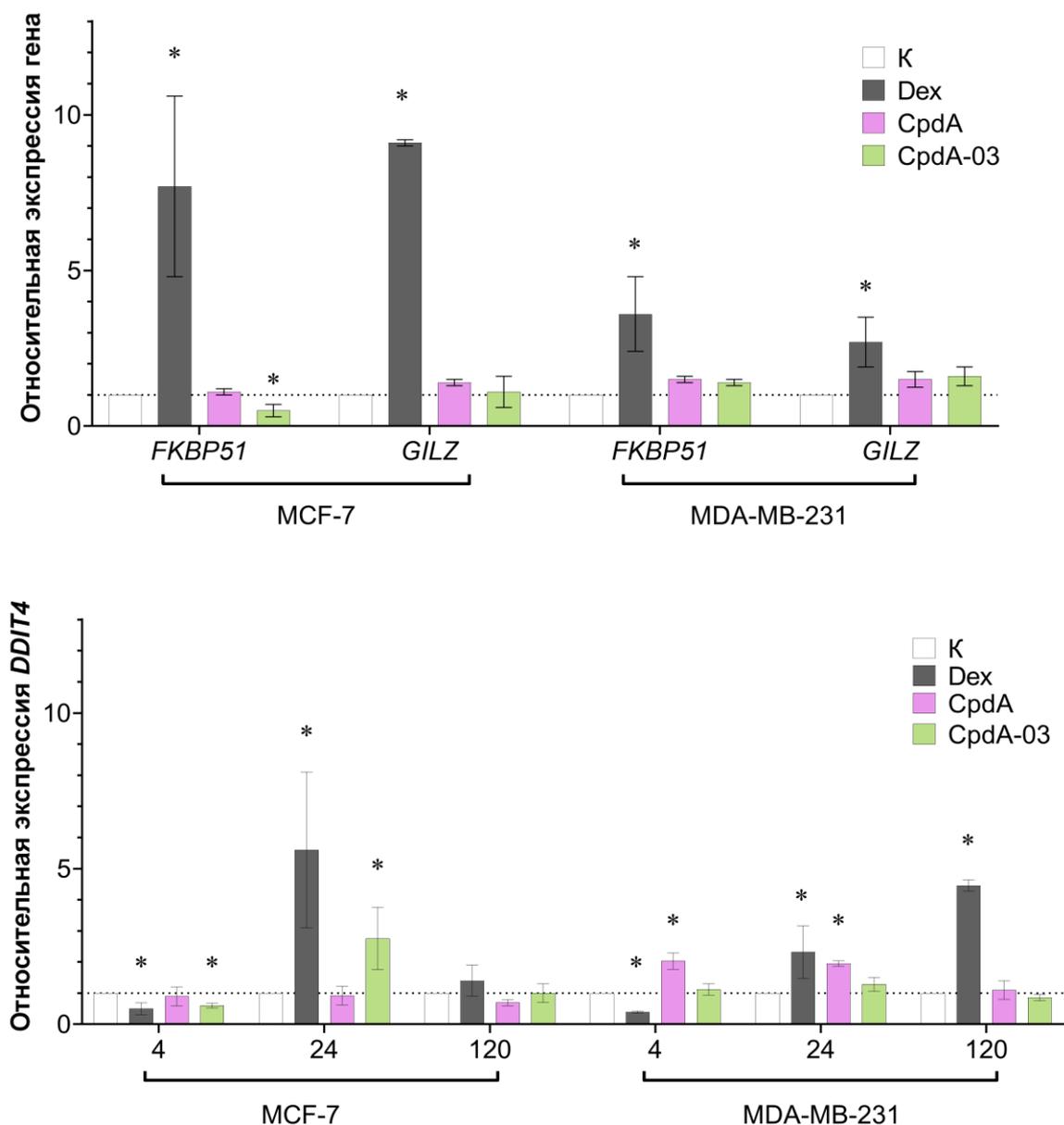


Уровень белка pGR-Ser211 в цитоплазматической и ядерной фракциях клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 был определен после инкубации с 10 нМ Dex/CpдA/CpдA-03 в течение 2, 4 или 8 ч методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител. Количественный анализ проводили путем денситометрического сканирования с использованием компьютерной программы Image Quant для Windows. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня GAPDH или гистона H3. * - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 21 – Влияние Dex, CpдA и CpдA-03 на фосфорилирование GR по Ser211

3.4.3 Анализ изменения экспрессии GR-зависимых генов

Поскольку было установлено, что индукцию трансактивации и ядерные эффекты препаратов или их отсутствие в клетках РМЖ можно наблюдать уже через 4 часа инкубации с препаратами. Дальнейшую оценку уровня генов, экспрессия которых является следствием трансактивации проводилась при инкубации от 4 до 24 часов. Трансактивационный потенциал *СрdA* и его производного *СрdA-03* был оценен по уровню экспрессии маркеров трансактивации *GILZ* и *FKBP51*, *DDIT4 (REDD1)* с помощью РТ-ПЦР (Рисунок 22). Дех индуцирует экспрессию всех маркеров трансактивации в обеих клеточных линиях. В частности, экспрессия *GILZ* и *FKBP51* возрастает в $9,1 \pm 0,1$ и $7,7 \pm 2,9$ раза в MCF-7 и в $2,7 \pm 0,8$ и $3,6 \pm 1,2$ раза в клетках MDA-MB-231. В отличие от Дех, SEGRA не оказывают влияния на экспрессию *GILZ* и *FKBP51* в клетках ТН РМЖ. В клетках люминального РМЖ *СрdA* не оказывает влияния, а *СрdA-03* снижает экспрессию данного *FKBP51* в 2 раза. Экспрессию *DDIT4* который является медиатором развития GC-опосредованных атрофических осложнений [65, 330] и отвечает на трансактивацию GR, оценивали при кратковременном и при длительном воздействии исследуемых соединений. После кратковременной (4 ч) инкубации с Дех экспрессия *DDIT4* снижалась в 2,0 и 2,6 раз в линиях MCF-7 и MDA-MB-231 соответственно. Через 24 ч инкубации с Дех экспрессия гена в линиях повышалась в 5,6 и 2,3 раза соответственно. Через 120 ч инкубации с Дех повышенный (в 4,5 раза относительно контроля) уровень экспрессии *DDIT4* наблюдали в клетках ТН подтипа, в то время как в клетках люминального РМЖ уровень экспрессии возвращался к базальному. Также индукция экспрессии *DDIT4* наблюдалась при инкубации клеток линии MDA-MB-231 с *СрdA*: за 4 ч экспрессия повышалась в 2,0 раза, а за 24 ч – в 1,95 раз относительно отрицательного контроля.



Клетки инкубировали с 10 нМ Dex, CpdA или CpdA-03 в течение 4 ч для оценки экспрессии *GILZ*, 24 ч для оценки экспрессии *FKBP51*, 4, 24 или 120 ч для оценки экспрессии *DDIT4*. Оценку уровня экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР. Результаты нормировали на уровень экспрессии гена *RPL27*. * - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 22 – Анализ изменения экспрессии генов-маркеров трансактивации в клетках РМЖ при действии лигандов GR

Таким образом, было показано, что изменение экспрессии *DDIT4* под действием лигандов носит времязависимый характер и специфичен для каждой линии клеток.

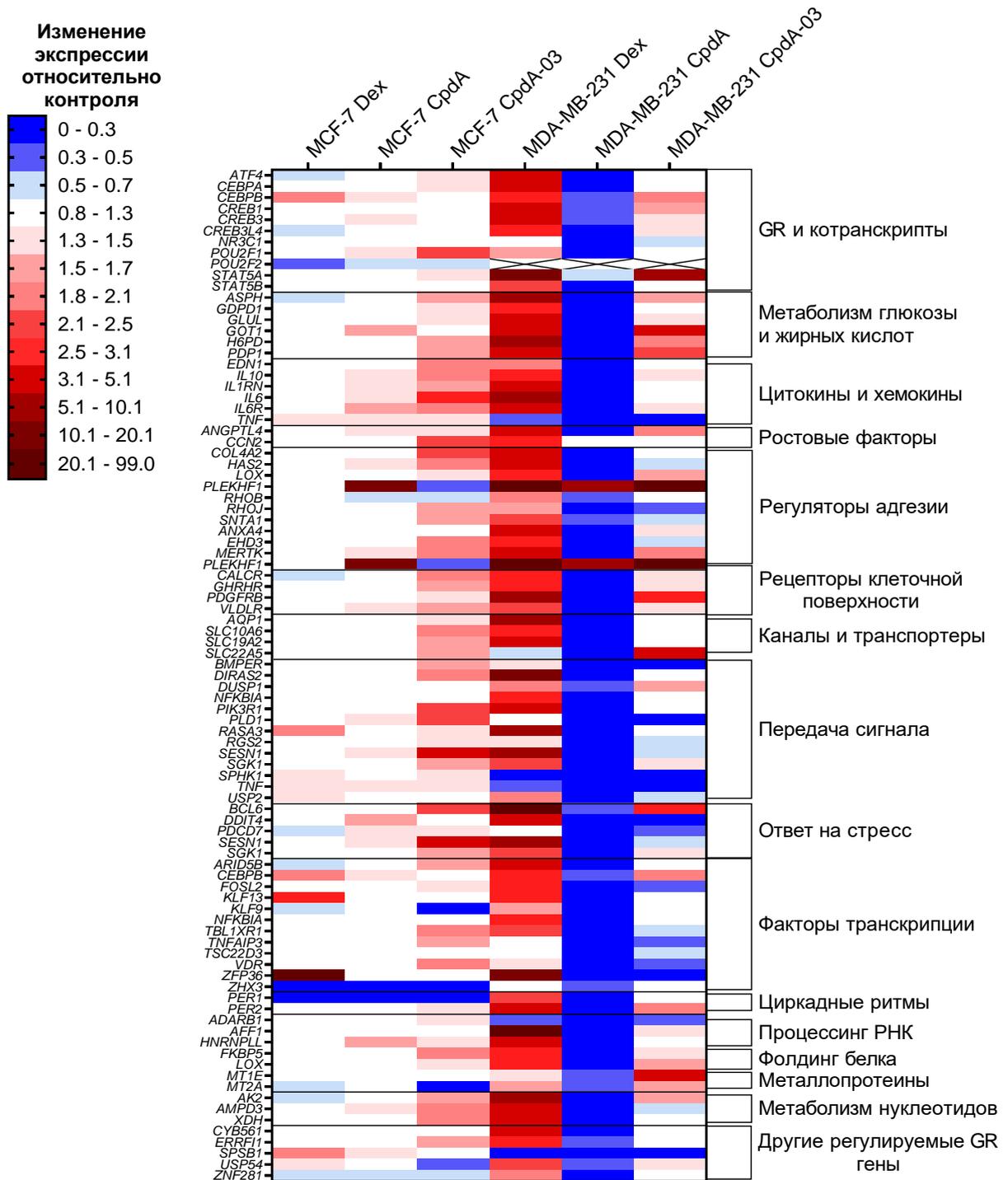
На следующем этапе было проанализировано влияние на уровень экспрессии 86 GR-респонсивных генов. Для этого были использована панель праймеров RT² Profiler PCR Array

(QIAGEN, кат. № PAHS-154Z). Соотношение регулируемых лигандами GR генов представлено в таблице 5. 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.

Таблица 5 - Общее число регулируемых лигандами GR генов

Регуляция	MCF-7			MDA-MB-231		
	Dex	CpdA	CpdA-03	Dex	CpdA	CpdA-03
Негативная	7	4	9	5	83	22
Позитивная	9	15	52	72	1	31

На рисунке 23 представлена тепловая диаграмма, иллюстрирующая изменение уровня экспрессии GR-зависимых генов после 24 ч инкубации с исследуемыми препаратами. 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 трансаktivацией GR. В то же время SEGRA CpdA за 24 ч сдвигает баланс в сторону подавления GR-зависимых генов в клетках линии MDA-MB-231. CpdA-03 в клеточной линии ТН РМЖ снижает экспрессию генов-регуляторов адгезии (*HAS2* в 1,5 раза, *RHOJ* в 2,9 раз, *SNTA* в 1,7 раз), регуляторов передачи сигнала (*BMPER* в 4,4 раза, *PLD1* в 4,8 раза, *RGS2* в 1,8 раза, *SESNI* в 1,8 раза, *SPHK1* в 12,5 раз, *USP2* в 1,7 раза и *TNF* в 7,4 раза), факторов транскрипции (*FOSL2* в 2,4 раза, *TBLIXR1* в 1,4 раза, *TNFAIP3* в 2,8 раза, *VDR* в 2,0 раза, *ZFR36* в 10 раз). Таким образом было показано, что лиганды GR участвуют в регуляции транскрипции генов, формирующих клеточные контакты модельных клеток РМЖ и их миграционную активность.

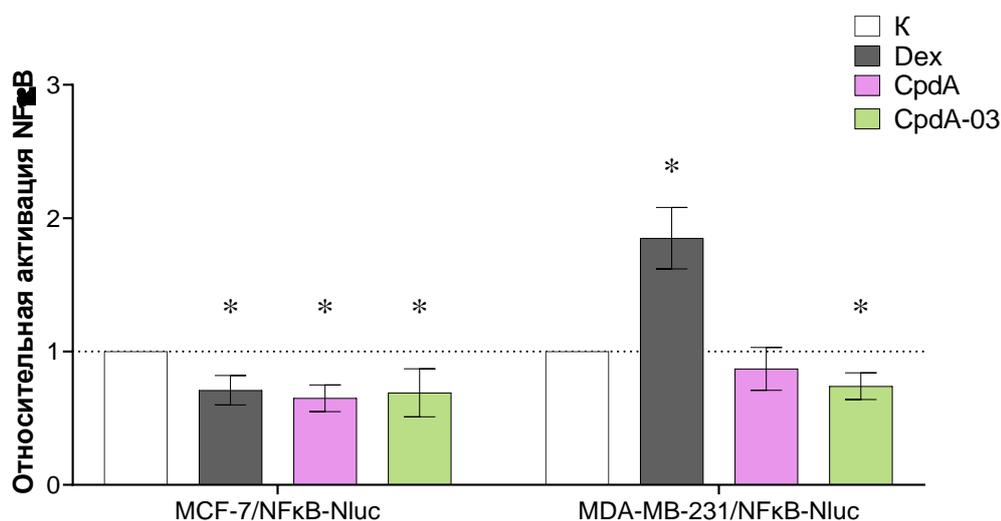


Клетки инкубировали с 10 nM Dex, CpdA или CpdA-03 в течение 24 ч. Экспрессия генов была проанализирована методом количественной ПЦР с использованием набора RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, кат. № PAHS-154Z). Результаты нормированы на экспрессию *ACTB*, *GAPDH* и *RPLP0* и представлены в виде тепловой карты изменения экспрессии относительно принятой за 1 в контрольных образцах.

Рисунок 23 – Оценка изменения экспрессии GR-зависимых генов при действии Dex, CpdA, CpdA-03

3.4.4 Анализ трансрепрессорного потенциала SEGRA и GC в клетках РМЖ

Для SEGRA CpdA и CpdA-03 описана способность ингибировать NFκB и снижать экспрессию генов семейства *IL* в различных модельных системах за счет активации механизма трансрепрессии [196, 417]. 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 24). В клетках линии MCF-7 при действии лигандов GR наблюдали слабое подавление NFκB: относительный уровень активации ТФ снижался на 29, 35 и 31 % при действии Dex, CpdA и CpdA-03 соответственно. В клетках ТН РМЖ MDA-MB-231 при действии Dex наблюдалась активация ТФ (уровень хемилюминесценции повышался в 1,9 раз относительно контроля).

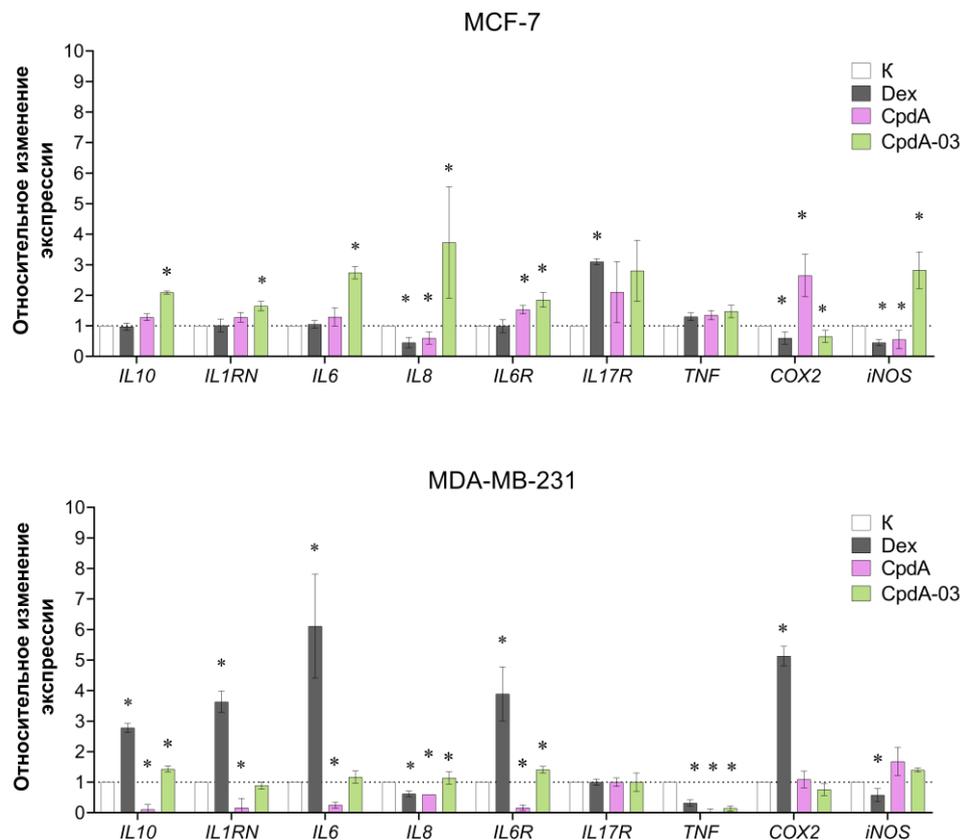


Клетки сублиний MCF-7/NFκB-NLuc и MDA-MB-231/NFκB-NLuc, полученных с помощью трансфекции, инкубировали с 10 нМ Dex, CpdA или CpdA-03 в течение 24 ч. Степень активации NFκB оценивали по интенсивности хемилюминесценции. Результаты нормировали на интенсивность хемилюминесценции в сублиниях MCF-7/mCMV-NLuc и MDA-MB-231/mCMV-NLuc и приведены в относительных долях от контроля. * - статистически значимые отличия от контроля.

Рисунок 24 – Оценка степени активации NFκB Dex, CpdA и CpdA-03 в люциферазном репортерном анализе

Трансрепрессорный механизм также опосредует противовоспалительные эффекты лигандов GR и выражается в подавлении транскрипции провоспалительных цитокинов. В связи

с этим были оценены уровни экспрессии генов, связанных с воспалительным ответом, после 24 ч инкубации с исследуемыми препаратами (Рисунок 25). В клетках линии MCF-7 Dex подавлял экспрессию *IL8*, *COX2*, *iNOS* в $0,4\pm 0,17$, $0,6\pm 0,2$ и $0,45\pm 0,1$ раз соответственно, индуцировал экспрессию *IL17R* в $3,1\pm 0,1$ раза и не оказывал влияния на экспрессию остальных исследуемых генов. СрдА-03 за 24 ч снижал экспрессию *COX2* в $1,5\pm 0,2$ раза, в то же время стимулирует экспрессию *IL1RN*, *IL6*, *IL8*, *IL10*, *IL6R*, *IL17R*, *iNOS* в среднем в 1,5-3 раза. В клетках ТН РМЖ инкубация с Dex приводит к активации транскрипции провоспалительных генов *COX2*, *IL6*, *IL10*, в $5,1\pm 0,3$, $6,1\pm 1,7$ и $2,8\pm 0,1$ раз соответственно, рецепторов *IL6R*, *IL1RN* в $3,9\pm 0,9$ и $3,9\pm 0,4$ раз соответственно, одновременно с подавлением экспрессии *IL8* и *iNOS* в $1,6\pm 0,1$ и $1,5\pm 0,2$ раза соответственно. При этом экспрессия TNF в клетках MDA-MB-231 при действии Dex, СрдА и СрдА-03 снижалась в 3, 50 и 7 раз, соответственно.



Клетки инкубировали с 10 нМ Dex, СрдА или СрдА-03 в течение 24 ч. Оценка уровня экспрессии генов была проведена методом количественной ПЦР. Результаты нормированы на уровень экспрессии гена *RPLP0*. * - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

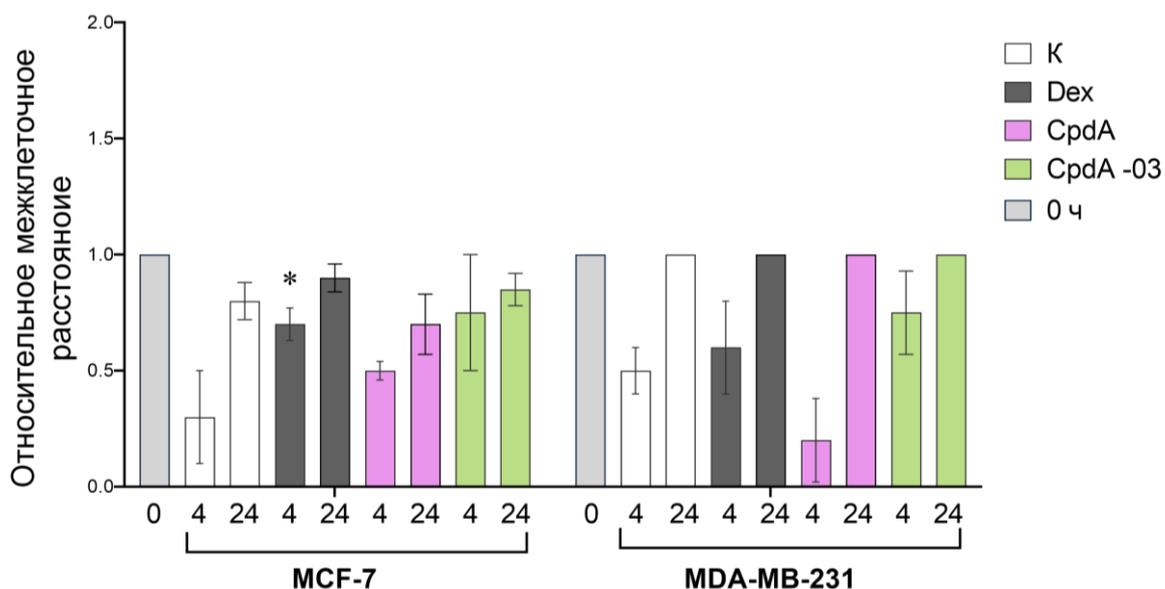
Рисунок 25 – Оценка изменения экспрессии цитокинов в клетках РМЖ при действии исследуемых препаратов

Таким образом было показано, что SEGRA в отличие от Dex не вызывают трансактивационного фосфорилирования и ядерную транслокацию GR. Также показано, что CpdA и CpdA-03 регулируют экспрессию GR-зависимых генов, опосредующих широкий спектр биологических процессов.

3.5 Оценка действия SEGRA и GC на миграционную способность клеток РМЖ

3.5.1 Тест на застание раны

Одним из классических подходов интегральной оценки влияния соединений на миграционную активность клеток является оценка скорости застания раны монослоя культуры клеток в присутствии исследуемых препаратов. Клетки РМЖ обладают разной миграционной активностью (Рисунок 26). 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 предварительно инкубировали 120 с 10 нМ Dex, CpdA или CpdA-03. В монослое клеток проводили раны, затем были внесены Dex, CpdA или CpdA-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, $p < 0,05$

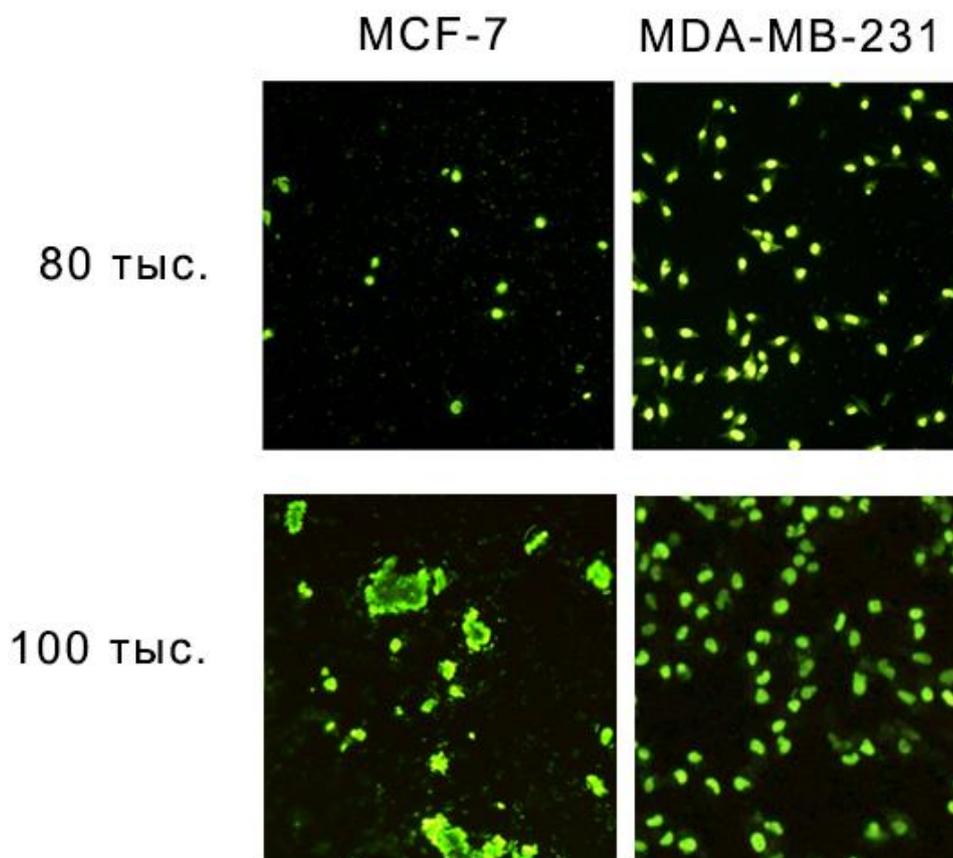
Рисунок 26 – Оценка влияния лигандов GR на скорость застания раны

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 CpдA и CpдA-03 проявляли тенденцию к подавлению миграционной активности клеток ТН подтипа РМЖ, однако достоверно значимые различия в эксперименте получены не были.

Таким образом было показано, что GC Dex повышает миграционный потенциал клеток люминального РМЖ при кратковременных наблюдениях. 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.

3.5.2. Миграция в камерах Бойдена

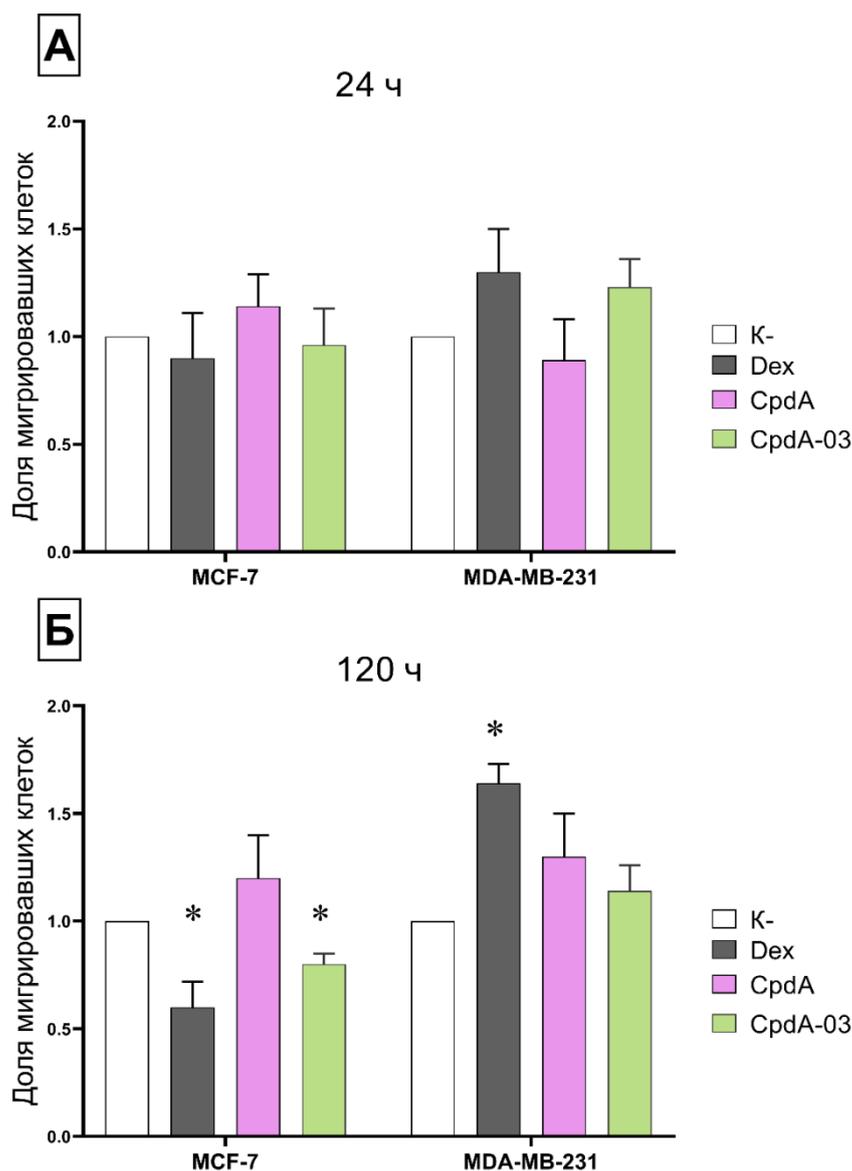
В одинаковых условиях эксперимента (80 тыс. клеток, инкубация 24 ч), клетки MCF-7 мигрируют слабее, чем клетки MDA-MB-231 (Рисунок 27), что согласуется с общими характеристиками молекулярных подтипов, к которым принадлежат клетки (Таблица 1). При увеличении количества клеток в эксперименте до 100 тыс. в препаратах линии MCF-7 наблюдали кластеры мигрировавших клеток, в то время как клетки MDA-MB-231 мигрировали по одиночке (Рисунок 27). Поскольку нашей целью являлось в том числе сравнение действия соединений на клетки двух основных подтипов РМЖ, в дальнейших экспериментах рассеивали по 50 тыс. клеток на камеру.



Клетки вносили в бессывороточной среде в верхнюю часть камеры Бойдена. Камеры инкубировали 24 ч, после чего удаляли непромигрировавшие клетки с верхней части мембраны и проводили окрашивание промигрировавших клеток SYBR Gold.

Рисунок 27 - Микрофотографии мигрировавших клеток на внешней стороне мембраны камеры Бойдена в УФ-свете

При инкубации клеток в камерах Бойдена с добавлением лигандов GR в течение 24 ч статистически значимых различий в количестве промигрировавших клеток по отношению к контрольным образцам не наблюдалось (Рисунок 28А). Затем была проведена предварительная 120 ч инкубация клеток с 10 нМ Dex, CpдA или CpдA-03. Результаты оценки степени миграции предварительно инкубированных с лигандами GR клеток представлены на Рисунке 28Б. Под действием Dex и CpдA-03 степень миграции клеток линии MCF-7 снижалась на 40 ± 10 и 20 ± 5 % соответственно. 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.



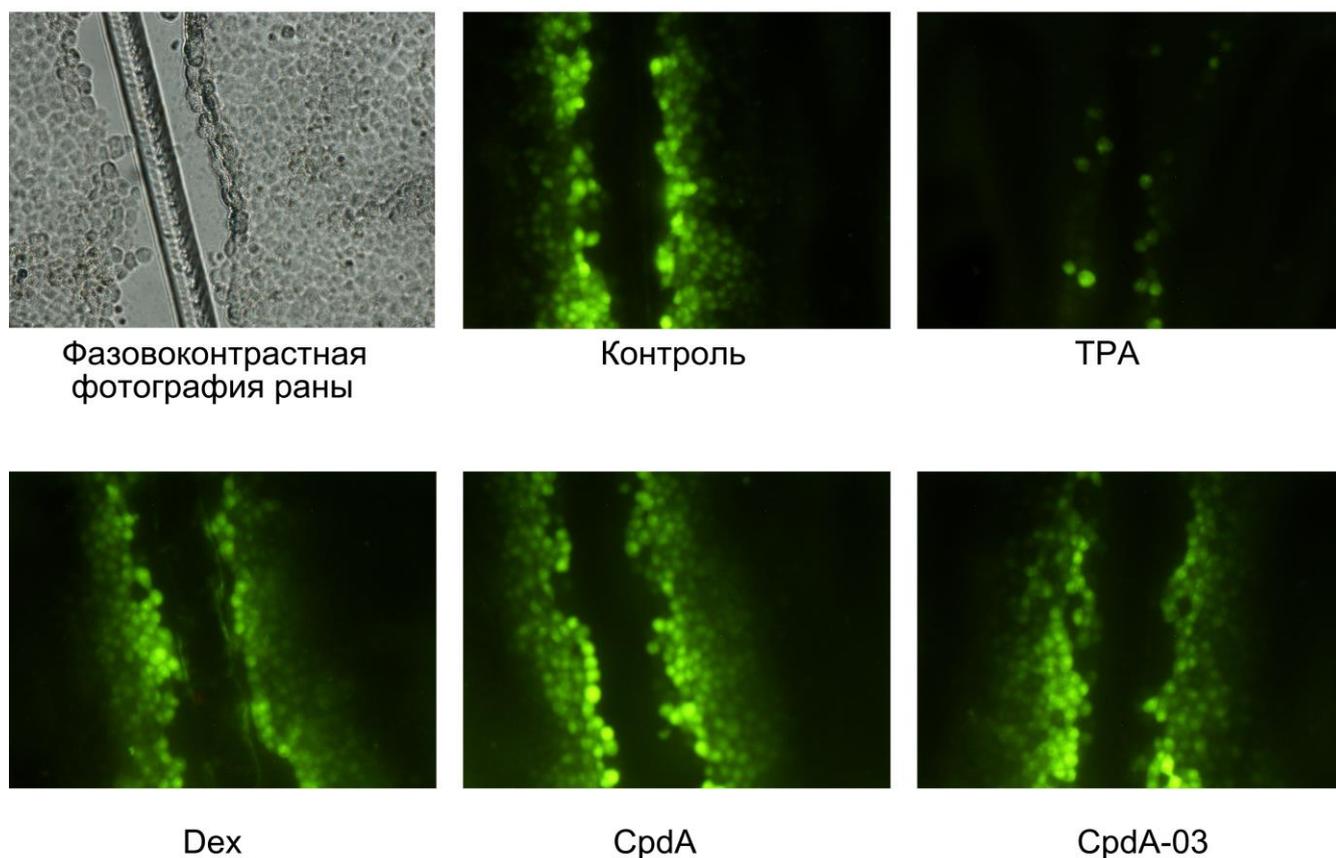
А – Клетки инкубировали в камерах Бойдена в присутствии или без лигандов GR в течение 24 ч. **Б** – Клетки предварительно были культивированы 120 с 10 нМ Dex, CpdA или CpdA-03. Степень миграции оценивали через 24 ч инкубации в камерах Бойдена. Доля мигрировавших клеток в контрольных образцах принята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

Рисунок 28 – Оценка влияния лигандов GR на миграцию в камерах Бойдена

3.5.2 Интегральный анализ влияния лигандов GR на щелевые контакты

Как было сказано выше, гены белков, семейства коннексинов, формирующих щелевые межклеточные контакты, являются одной из мишеней GR. Для уточнения молекулярных механизмов наблюдаемых эффектов был проведен стандартный тест на оценку целостности

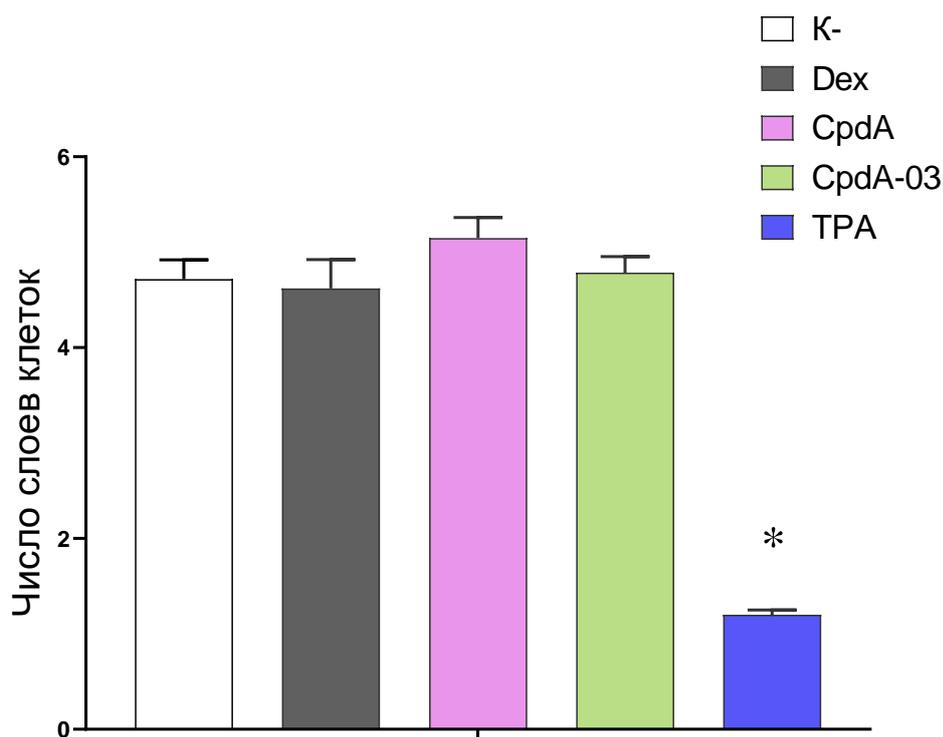
щелевых контактов (scrape-loading dye transfer assay) с использованием клеточной линии IAR2. Выполнение данного теста на клетках линий РМЖ не представляется возможным, поскольку модельные линии клеток не формируют достаточно прочных щелевых контактов для регистрации ингибирующих эффектов [30]. В данном тесте использовали краситель люцифер желтый (Lucifer yellow), который способен мигрировать между клетками через щелевые контакты, в качестве положительного контроля использовали ТРА. Таким образом степень целостности щелевых контактов в данном тесте оценивали по числу окрашенных слоев клеток (Рисунок 29).



Клетки инкубировали с 10 мкМ Dex, CpdA или CpdA-03 в течение 24 ч и с ТРА в течение 4 ч. Затем клетки были промыты PBS, покрыты раствором люцифера желтого, в монослое клеток были проведены несколько царапин.

Рисунок 29 – Микрофотографии области раны монослоя клеток IAR2, окрашенных люцифером желтым

За 24 ч лиганды GR не оказывают влияния на целостность щелевых контактов в клеточной тест-системе. Число слоев клеток, на которое наблюдали распространение красителя, составило в среднем $5,3 \pm 0,4$ (Рисунок 30).



Клетки инкубировали с 10 мкМ Dex, CpdA или CpdA-03 в течение 24 ч и с TPA в течение 4 ч. Затем клетки промывали PBS, покрывали раствором люцифера желтого, в монослое клеток проводили несколько царапин. Были проанализированы не менее 10 полей зрения в области раны. Затем проведен подсчет количества слоев клеток, через которые мигрировал краситель. * - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 30 - Оценка влияния лигандов GR на щелевые контакты модельной линии IAR2

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

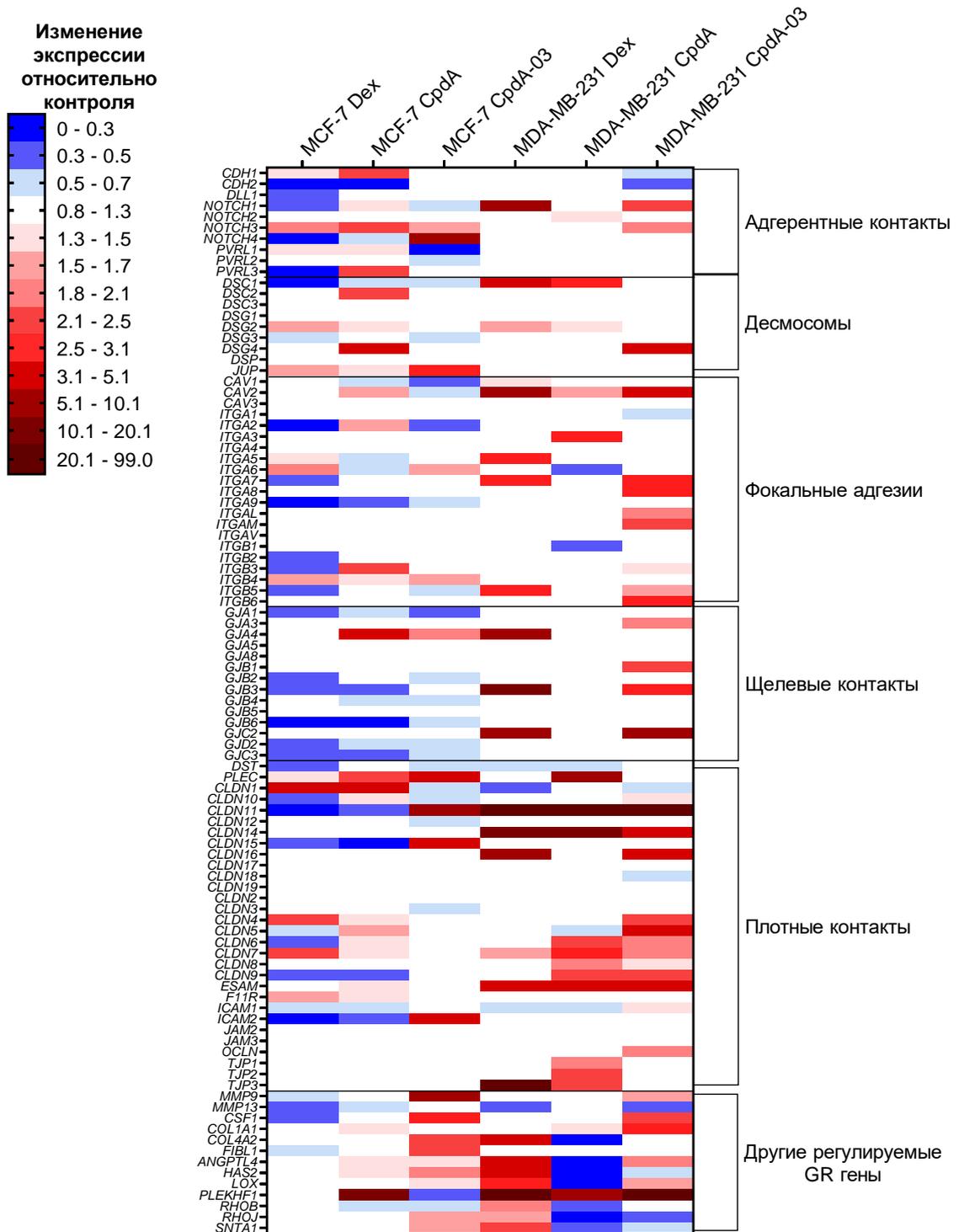
Для выяснения молекулярных механизмы наблюдаемых эффектов, методом РТ-ПЦР с использованием панели праймеров набора RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, кат. № PAHS-213Z) был проведен скрининг действия исследуемых веществ на экспрессию генов белков межклеточных контактов различных типов. Дополнительно были проанализированы гены, подобранные на основании сопоставления литературных данных о маркерах метастазирования РМЖ и о мишенях GR в трансформированных клетках. Поскольку соединения не проявили эффекта в интегральных тестах при 24 ч инкубации, экспрессию генов оценивали после 120 ч

инкубации. В таблице 6 представлены соотношения общего числа регулируемых исследуемыми препаратами генов в эксперименте.

Таблица 6 - Общее число регулируемых лигандами GR генов в панели

Регуляция	MCF-7			MDA-MB-231		
	Dex	CpdA	CpdA-03	Dex	CpdA	CpdA-03
Негативная	32	20	23	2	12	9
Позитивная	13	27	19	25	18	34

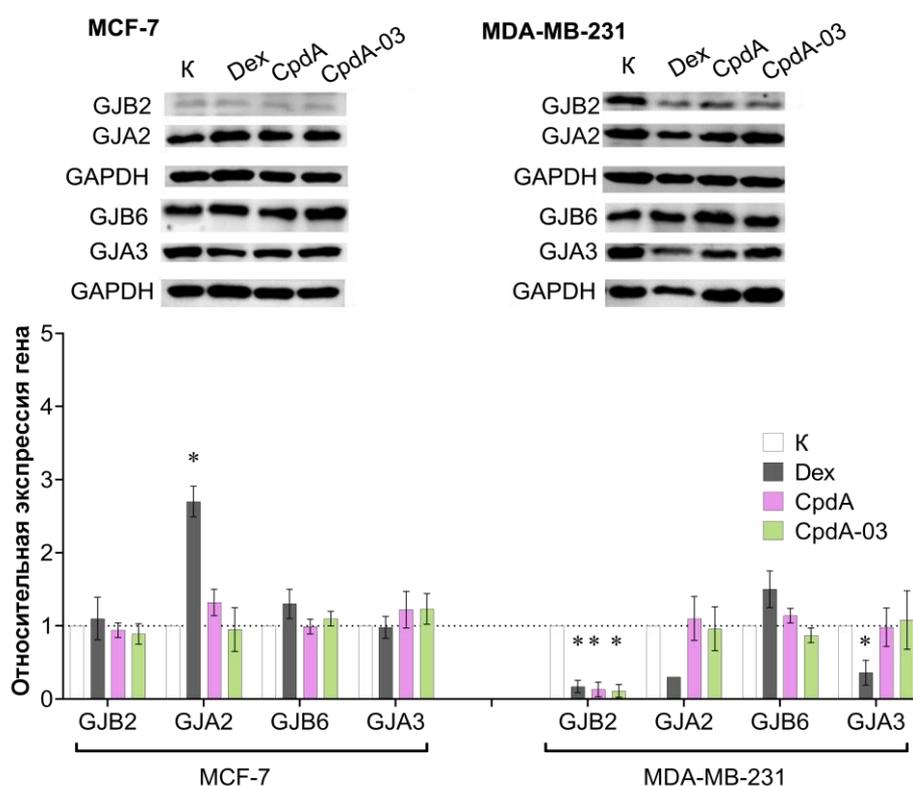
На рисунке 31 представлена тепловая карта, иллюстрирующая изменение уровня экспрессии GR-зависимых генов после 120 ч инкубации с исследуемыми препаратами. В клетках линии MDA-MB-231 под действием Dex наблюдается активация во всех исследуемых группах генов. Наиболее выраженный активационный эффект наблюдался 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 металлпротеиназ 9 и 13 (*MMP9, MMP13*).



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

Рисунок 31 – 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 32). За 120 ч Dex, CpdA и CpdA-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. Количественный анализ проводили путем денситометрического сканирования с использованием компьютерной программы Image Quant для Windows. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня GAPDH. * - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$

Рисунок 32 – Оценка влияния лигандов GR на экспрессию белков семейства коннексинов в клетках РМЖ

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ГС реализуют свои биологические эффекты посредством связывания с GR, активация которого далее протекает по двум основным механизмам [288]. В первом случае мономерные субъединицы рецептора фосфорилируются по положению Ser211 и образуют гомодимер, который транслоцируется в ядро и связывается с GRE, активируя транскрипцию респонсивных генов (трансактивация). Во втором случае мономер GR в цитоплазме образует белок-белковые комплексы с другими ТФ, препятствуя их связыванию с собственными респонсивными элементами и транскрипции их зависимых генов (трансрепрессия). Терапевтические (противовоспалительные, антипролиферативные) эффекты ГС в основном опосредованы трансрепрессией, в то время как трансактивация приводит к усилению транскрипции генов, связанных с побочными эффектами ГС [288].

Молекулярные механизмы формирования химиорезистентности и метастазирования РМЖ имеют множество сценариев и включают большое количество факторов, опосредующих данный процесс. Одним из потенциальных участников данных процессов является GR, регулирующий огромное количество внутриклеточных процессов. В ER α -позитивном РМЖ активация GR приводит к подавлению эстроген-зависимой пролиферации клеток [383], в то время как в клетках РМЖ ТН подтипа активация GR ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [264, 382]. Антипролиферативные эффекты GR в отношении клеток люминального РМЖ опосредуются ингибированием как ER α -зависимой [383], так и PR-зависимой пролиферации [21]. Следует подчеркнуть, что эти клинические наблюдения подтверждаются в экспериментах на моделях ксенографтов РМЖ [266, 327, 393].

Также следует подчеркнуть, что для ГС описан половой диморфизм, в частности, для женщин описана более сильная активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при ответе на ГС [226]. Этот феномен актуален применительно к данному исследованию, поскольку РМЖ в большей степени поражает женское население. Большая чувствительность к препаратам также означает и более высокую тяжесть наблюдаемых осложнений ГС терапии. При этом комплексных исследований, направленных на выявление молекулярных механизмов, лежащих в основе описанных эффектов, в контролируемой клеточной системе не проводилось.

Для выявления возможной связи молекулярного подтипа РМЖ с чувствительностью к лигандам GR проведено сравнение уровня экспрессии этого белка в клеточных линиях опухолей различного гистотипа. Уровень белка в клетках модельных линий падает в ряду MDA-MB-231 – MCF-7 – MDA-MB-453 – HCC-1954. При этом наиболее выраженное подавление пролиферации лигандами GR наблюдали в отношении клеток линии MCF-7.

Высокая чувствительность к Dex линии люминального РМЖ объясняется высокой экспрессией ER α и способностью GR вызывать трансрепрессию ER α -респонсивных генов [118, 239]. Данный факт подтверждается снижением пролиферации линии с нокаутом GR при действии Dex. Высокой чувствительностью к лигандам GR также обладают клетки ТН (линия MDA-MB-231) и ТН HER-слабопозитивного (линия MDA-MB-453) РМЖ, экспрессирующие GR на высоком уровне. В то же время, клетки HER2-позитивного подтипа (линия HCC-1954) обладают наименьшей чувствительностью к лигандам GR. Таким образом, результаты данного этапа исследования свидетельствовали о прямой связи уровня GR с чувствительностью клеток к исследуемым лигандам GR. Наблюдаемый эффект согласуется с литературными данными о связи молекулярного подтипа РМЖ и влиянии экспрессии GR на прогноз течения заболевания [54, 264, 382, 383].

Полученные данные о высокой чувствительности клеток линии MDA-MB-231 к SEGRA, чрезвычайно интересны в свете исследования [67], в котором было показано, что сочетание CpдA с противоопухолевым препаратом паклитакселом подавляет рост клеток ТН РМЖ на одном уровне с монотерапией паклитакселом, в то время как сочетание препарата с Dex дает в разы меньший эффект по сравнению с монотерапией [67].

Одним из генов, связанных с опосредуемыми трансактиваций GR побочными эффектами, является *DDIT4 (REDD1)*. Он играет ключевую роль в ответе клетки на повреждение ДНК и гипоксию [89, 330]. Повышение экспрессии *DDIT4* приводит к ингибированию сигнального пути mTOR и активации аутофагии [89, 330] и рассматривается как прогностический маркер течения РМЖ [65, 403]. В целом, данный короткоживущий белок играет большую роль в прогрессии различных ЗНО, а также в развитии GR-опосредованных атрофических процессов у пациентов, принимающих GC.

В настоящей работе было продемонстрировано, что GC при длительном действии повышают экспрессию *DDIT4* в клетках ТН, но не люминального РМЖ. Одним из способов купирования таких нежелательных эффектов является добавление в схему терапии ингибиторов *DDIT4*. Ранее было показано, что такой подход является эффективным в модельных клеточных линиях острого лимфобластного лейкоза и мантийноклеточной лимфомы [198, 215]. В клетках РМЖ также наблюдается снижение экспрессии *DDIT4* на уровне белка и РНК при действии ингибиторов *DDIT4* [413].

Воспаление может способствовать развитию и прогрессии ЗНО [122]. В терапевтических дозах GC оказывают противовоспалительное действие. Однако при длительном применении GC подавляют привлечение лейкоцитов к очагу воспаления, ингибируя выработку хемокинов, гистамина и простагландинов и снижая экспрессию молекул клеточной адгезии, таких как

интегрины и селектины [55]. GC тормозят заживление ран, подавляя выработку коллагена, экспрессию факторов роста и васкуляризацию [70], что также усиливает воспаление, способствуя онкогенезу. Они подавляют активацию CD8⁺ Т-лимфоцитов, стимулируя экспрессию ингибиторов иммунных контрольных точек, что способствует прогрессии и метастазированию ЗНО [7]. GC нарушают нормальное функционирование макрофагов и дендритных клеток, подавляют провоспалительные цитокины (такие как TNF и IL12) и вызывая выработку противовоспалительных цитокинов (например, IL10) [136, 146]. В современной онкологической практике большое распространение получают блокаторы иммунных контрольных точек, PD-1/PD-L1 и CTLA-4, повышающие чувствительность опухоли к действию иммунной системы. Описана способность дексаметазона стимулировать выработку PD-1 и тем самым индуцировать толерантность Т-клеток к клеткам опухоли и опухолевую прогрессию [78, 396].

Стоит отметить, что клинические данные [85], а также исследования на модели метастатического РМЖ у крыс [150], свидетельствуют о том, что активация NFκB коррелирует с усилением метастазирования РМЖ. Также важным прогностическим фактором для РМЖ являются эффекторы NFκB: IL6 and IL8, экспрессию которых связывают с усилением метастазирования и более поздними стадиями опухолевой прогрессии [131]. Один из самых известных маркеров трансактивации GR, GILZ, ингибирует TF NFκB [25, 26].

В настоящем исследовании было показано, что в клетках РМЖ GC проявляют разнонаправленное действие в отношении регуляции активности NFκB и экспрессии воспалительных цитокинов в клетках люминального и ТН РМЖ. В клетках линии ТН РМЖ GC Dex активирует NFκB, а также вызывает значительное увеличение провоспалительных цитокинов *IL10*, *IL6*, *IL8*, *IL6R*, *COX2*, для которых в литературе описана опухоль-промотирующая функция [122, 184, 194, 246, 290]. В клетках люминального подтипа РМЖ Dex подавляет активность NFκB и экспрессию *IL8*, *COX2*, *iNOS*. Полученные данные подтверждают разнонаправленность GC в регуляции воспалительного ответа в клетках РМЖ различных молекулярных подтипов. Также стоит учитывать тот факт, что введение GC пациентам с РМЖ провоцирует усиление экспрессии GR в клетках других тканей, и даже в отдаленных метастазах [404]. Это свойство GC может опосредовать формирование метастатических ниш, поддерживая высокий уровень провоспалительных цитокинов в клетках отдаленных органов.

Низкие дозы GC (5 мкг/мл) также промотируют метастазирование РМЖ в моделях *in vivo* у мышей [267]. Для подтверждения гипотезы о связи активации GR и усиления метастатического потенциала клеток РМЖ был проведен ряд экспериментов по интегральной оценке изменения миграционной активности клеток при действии GC. Статистически значимые

различия в миграции в условиях теста наблюдали при долговременной инкубации (5 суток), что подтверждает гипотезы о накопительном действии Dex. Принимая во внимание то, что GC назначаются пациентам длительными курсами эти данные выглядят особенно прогностически неблагоприятными. GC стимулируют миграцию в клетках ТН и снижают ее в клетках люминального РМЖ, что согласуется с данными группы Karolien De Bosscher, полученными на выборке из 1378 пациентов с диагнозом РМЖ различных подтипов [264].

На основании проведенного детального анализа литературных данных о влиянии GC на процессы метастазирования РМЖ, подробно изложенных в работе [416], были отобраны гены для оценки молекулярных механизмов, лежащих в основе промоции миграции клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что лиганды GR способны регулировать все типы межклеточных контактов. В свете особой роли коннексинов в прогрессии РМЖ, описанной выше, интересно, что в условиях проведенного эксперимента, Dex за 120 ч подавляет экспрессию 6 генов, кодирующих коннексины GJA1, GJB2, GJB3, GJB6, GJD2, GJC3.

Для более детального анализа влияния активации GR на щелевые контакты, был проведен анализ содержания белков коннексинов 26 (GJB2), 30 (GJA2), 43 (GJB6) и 46 (GJA3) после инкубации клеток с GC. Dex обладает разнонаправленным действием на экспрессию GJB6 в клетках РМЖ двух разных подтипов: в клетках с высокой продукцией белка GC способствуют его подавлению, в то время как в клетках с более низким уровнем экспрессии, Dex стимулировал накопление белка.

Учитывая, что GJB6 играет роль в GC-опосредованной активации аутофагии [111, 158] и в свете того, что ранее была показана роль GC в активации аутофагии в клетках РМЖ [120], можно предположить, что GC-опосредованная аутофагия также связана с трансактивацией GR.

Обобщая полученные данные можно сделать вывод о том, что трансактивация GR в ответ на GC, по-видимому, может приводить к усилению подвижности, миграционной активности, протективной аутофагии, воспалительного ответа, клеточного стресса в клетках ТН, но не люминального РМЖ. Клетки линии MDA-MB-231, являющиеся моделью более агрессивного ТН РМЖ, в целом более восприимчивы к действию лигандов GR. В данной линии наблюдалось более выраженный ответ на GC в тестах на миграционную активность и при анализе транскриптов. Результаты проведенных экспериментов хорошо соотносятся с гипотетической ролью активации GR в прогрессии и метастазировании РМЖ.

Одним из наиболее важных направлений исследований в области биомедицины являются соединения, способные при связывании с GR сдвигать баланс в сторону трансрепрессии GR. Такие соединения обнаружены среди природных и синтетических молекул разных химических классов. Одним из немногих SEGRA, для которых описана

противоопухолевая активность, является соединение CpdA. Однако нестабильность молекулы CpdA и вероятность образования канцерогенного производного (азиридина) при хранении и в процессе метаболизма в организме [395] является одним из основных ограничений применения его в клинической практике. В связи с этим, активная разработка других натуральных или синтетических SEGRA в качестве противовоспалительных и противоопухолевых препаратов ведется уже в течение долгого времени [243]. Проанализировав и структурировав накопленную информацию о SEGRA [197], был инициирован проект по получению новых SEGRA для применения в онкологической практике.

Для синтетического аналога CpdA, соединения 4-[1-гидрокси-2-(пиперидин-1-ил)этил]фенола (CpdA-03), разработанного в отделе химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина», была показана противоопухолевая активность *in vitro* и *in vivo* на моделях лейкозов и лимфом [417]. Настоящее исследование сосредоточено на дальнейшем исследовании активности лидерной молекулы CpdA-03 в сравнении с GC Dex и SEGRA CpdA.

В ходе работы совместно с химическим факультетом МГУ им. М.В. Ломоносова был получен меченный тритием препарат дексаметазона ($[^3\text{H}]\text{Dex}$) и оценена динамика насыщения GR $[^3\text{H}]\text{Dex}$ [28]. В клеточной системе с высоким содержанием GR было показано, что CpdA-03 обладает высокой степенью сродства к GR [417]. IC₅₀ связывания для CpdA-03 аналогична показателю для GC Dex и в 10 раз превышает расчетное IC₅₀ для CpdA. Более того, результаты биоинформатического моделирования комплекса CpdA-03:GR свидетельствует о том, что новый SEGRA связывается с рецептором по двум положениям в области лиганд-связывающего домена, что обеспечивает лабильную обратимую связь, характерную для эндогенных лигандов рецепторов. Ранее было показано сродство CpdA-03 к рецептору в бесклеточной системе с использованием модели, основанной на вытеснении стероидного меченого лиганда из комплекса с рецептором [4]. Однако полученные в такой системе данные характеризовались сильной вариабельностью между биологическими повторами, что может объясняться тем, что за счет меньшего числа водородных связей CpdA-03 не обладает способностью эффективно и необратимо вытеснять стероидный лиганд. Поэтому в настоящем исследовании был проведен классический радиолигандный анализ оценки аффинности стероидных лигандов к их рецепторам в конкурентных условиях.

Также в настоящей работе впервые было показано, что CpdA-03 обладает высокой стабильностью в водных растворах в широком диапазоне значений pH. Эти данные обладают высокой практической значимостью в свете того, что в настоящий момент отсутствуют фармацевтические препараты класса SEGRA, одобренные к применению в клинической

практике. При этом также важно отметить, что Министерство Здравоохранения РФ выдвигает строгие требования к стабильности и безопасности фармацевтических субстанций [2].

Ранее нашим исследовательским коллективом [414] и другими исследователями [67, 140] было показано, что GC и SEGRA обладают антипролиферативным, но не цитотоксическим действием в отношении клеток РМЖ. Для оценки действия нового лиганда GR на пролиферацию клеток РМЖ была подобрана широкая панель клеточных линий с различной экспрессией GR. Дополнительно из каждой линии РМЖ была получена сублиния с нокдауном GR.

Наиболее чувствительной к действию CpдA-03 оказались клетки ТН HER2-слабопозитивного подтипа (MDA-MB-453). В клетках ТН РМЖ (MDA-MB-231) для CpдA-03 наблюдался сравнимый с Dex антипролиферативный эффект. В клетках с высокой экспрессией GR MCF-7, принадлежащих к люминальному А подтипу РМЖ, при действии CpдA-03 наблюдался более слабый в сравнении с Dex эффект, что может косвенно свидетельствовать об отсутствии кросс-реактивности CpдA-03 и ER α . Стоит отметить, что природный предшественник CpдA-03, SEGRA CpдA, проявлял более выраженное антипролиферативное действие в отношении клеток РМЖ MCF-7, MDA-MB-453 и MDA-MB-231, что может объясняться как накоплением в среде токсичных продуктов распада молекулы, так и взаимодействием CpдA с AR, экспрессирующимся в этих клетках [145, 206].

Как было описано выше, побочные эффекты GR в основном связаны с индукцией транскрипции генов трансактивации, в то время как запуск трансрепрессорного механизма приводит к реализации терапевтических эффектов классических GC [172, 357]. Комплексы CpдA:GR и CpдA-03:GR не подвергаются фосфорилированию по Ser211, а также не детектируются в ядре клеток РМЖ. SEGRA CpдA и CpдA-03 не запускают трансактивации GR в клетках РМЖ. Исследуемые SEGRA, в особенности CpдA, сдвигают баланс функциональной активности GR в сторону реализации трансрепрессии в клетках РМЖ. Таким образом, было показано, что биологическая активность CpдA-03 опосредована не только связыванием с GR, но и селективным запуском трансрепрессии, что дает нам возможность причислить молекулу CpдA-03 к классу SEGRA.

Противовоспалительные эффекты GC опосредованы трансрепрессией GR. Механизм трансрепрессии представляет собой белок-белковое взаимодействие мономера GR с другими ТФ (в случае реализации противовоспалительного действия GR взаимодействует с субъединицей NF κ B) и подавление его активности. CpдA, как описано выше, является крайне нестабильным соединением. При этом одним из продуктов его деградации при длительном хранении является синефрин – хорошо известный селективный ингибитор β 3AR, обладающий

противовоспалительными свойствами. В ходе работы впервые было проведено сопоставление молекулярных механизмов противоопухолевых, а также противовоспалительных эффектов синефрина и CpдA, подробно изложенное в статье [92]. В экспериментальном плане была проанализирована способность SEGRA индуцировать трансрепрессию NFκB и его респонсивных генов в репортерном анализе и методом количественной ПЦР соответственно. Для CpдA и CpдA-03 впервые показана трансрепрессорная активность в клетках РМЖ. В клетках ТН РМЖ GC Dex вызывает значительное увеличение *IL10*, *IL6*, *IL8*, *IL6R*, *COX2*, в то же время SEGRA не влияли на экспрессию данных цитокинов и рецепторов.

Также в ходе проведенного исследования были объединены данные о роли GR-зависимого белка DDIT4 в опухолях различного происхождения, подробнее изложенных в работе [415]. Согласно литературным данным, повышенная экспрессия *DDIT4* ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для пациентов с РМЖ [65]. В условиях эксперимента CpдA-03 в отличие от GC Dex не влияет на базальную экспрессию *DDIT4* в клетках ТН РМЖ. Данный результат еще раз подтверждает отсутствие трансактивационной активности молекулы CpдA-03. CpдA индуцирует повышение уровня экспрессии *DDIT4* в клетках ТН РМЖ, и поскольку *DDIT4* является одним из маркеров повреждения ДНК, данный эффект может объясняться наличием в растворе CpдA гентоксичных продуктов распада.

Для более полной оценки потенциальной активности CpдA-03 было проанализировано изменение 84 GR-зависимых генов в клетках РМЖ после 24 ч инкубации с исследуемым соединением и препаратами сравнения. Было обнаружено, что Dex регулирует большее число генов, чем CpдA-03 в люминальном подтипе РМЖ, при этом объём регулируемых генов в ТН РМЖ у Dex и CpдA-03 примерно одинаков. Dex и CpдA-03 в основном негативно регулируют гены, связанные с миграцией и адгезией в РМЖ люминального подтипа, в то же время в ТН РМЖ они по большей части активируют экспрессию генов, чем подавляют. Учитывая наблюдаемую более высокую транскрипционную активность GR в клетках ТН РМЖ, а также более выраженный трансрепрессорный эффект CpдA в данных клетках, можно сделать вывод о том, что полученные результаты в целом согласуются с выводами других исследователей о чувствительности разных клеток к различным дозам GC [267].

Одним из наиболее опасных побочных эффектов, опосредованных трансактивацией GR является усиление метастатизирования некоторых типов опухолей. В связи с этим был проанализирована миграционная способность клеток РМЖ в тесте на застывание раны и в камерах Бойдена после кратковременной и длительной (5 суток) инкубации с лигандами GR. Было показано, что SEGRA снижают миграционную активность клеток люминального РМЖ. Также показано, что, в отличие от Dex, CpдA и CpдA-03 не влияют на миграцию клеток ТН

PMЖ в условиях эксперимента. Дополнительно был проведен анализ целостности щелевых контактов в модельной линии IAR2 после обработки исследуемыми соединениями. Было показано, что SpdA и SpdA-03 не разобщают щелевые контакты клеток *in vitro*.

При анализе экспрессии генов, регулирующих различные виды межклеточных контактов, после долгосрочной инкубации с исследуемыми лигандами GR, было обнаружено, что SEGRA в основном регулируют экспрессию генов, кодирующих белки щелевых и плотных контактов, а также фокальных адгезий. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования для более детального исследования роли трансрепрессии GR в миграции и подвижности клеток PMЖ.

Оценка экспрессии коннексинов, для которых установлена роль в прогрессии PMЖ, позволила получить ряд интересных результатов. А именно, было показано, что в клетках люминального (MCF-7) наблюдается пониженная в сравнении с ТН (MDA-MB-231) подтипом PMЖ 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 PMЖ.

Полученные в ходе работы результаты свидетельствуют о том, что SEGRA являются эффективной и в то же время более безопасной альтернативой GC в терапии PMЖ. Обладающий высоким сродством с GR и сравнимой с GC антипролиферативной активностью, SEGRA SpdA-03, не способен запускать трансактивацию GR и не обладает способностью стимулировать миграцию клеток PMЖ, что свидетельствует о целесообразности дальнейшего проведения предклинических и клинических исследований данной молекулы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РМЖ является самой распространенной формой злокачественных новообразований. Течение заболевания и стратегия выбора терапевтических подходов зависит от молекулярного подтипа РМЖ. При прогрессии заболевания для облегчения последствий химиотерапевтического и иных видов терапии РМЖ пациентам назначаются препараты класса GC, обладающие противорвотным и аппетит стимулирующим действием. Кроме того, GC обладают антипролиферативным в отношении клеток опухолей люминального А подтипа. При этом, многие исследования связывают неконтролируемое (не зависящее от молекулярного подтипа) назначение GC с развитием процесса метастазирования и ухудшением прогноза течения РМЖ. Несмотря на это, GC остаются незаменимыми в клинической практике препаратами, аналоги которым в настоящее время отсутствуют на фармацевтическом рынке.

Действия GC, как терапевтические, так и побочные, опосредованы GR. Направленность активации GC зависит от многих факторов, включая тип клеток, концентрацию лиганда, наличие в клетках других рецепторов и ТФ. В связи с вышесказанным чрезвычайно актуальна разработка новых, альтернативных и более эффективных и безопасных препаратов, направленных на селективное модулирование активности GR. Кроме того, крайне актуальными являются исследования, посвященные изучению механизмов метастазирования злокачественных форм опухолей молочной железы. Результаты проведенного исследования говорят о том, что под действием GC изменяется миграционная способность клеток РМЖ. Более того, в исследовании получена новая информация о генах и белках, ассоциированных с усилением миграции клеток РМЖ. Таким образом, полученные данные расширяют представления о роли одного из самых распространенных компонентов терапии РМЖ и формируют теоретическую базу для разработки новых терапевтических подходов.

Полученные данные указывают на то, что повышенная экспрессия GR ассоциирована с высоким уровнем трансактивации GR при действии GC и сильно выраженной трансрепрессией GR-зависимых генов при действии SpdA. Более того, проведенные *in vitro* исследования показали, что опухолевые клетки различного происхождения, имеющие разный базальный уровень экспрессии GR, обладают разной чувствительностью к GC и SEGRA.

В ходе работы были исследованы характеристики производного SpdA, нестероидного соединения SpdA-03. Экспериментально были определены концентрации, при которых соединение образует комплекс с GR. Для нового лиганда GR описано свойство сохранять стабильность молекулы в различных условиях, показано отсутствие способности вызывать

трансактивацию GR. Кроме того, с использованием панели клеточных линий РМЖ с показаны GR-зависимые антипролиферативные эффекты нового SEGRA.

Полученные в ходе исследования приоритетные данные могут быть использованы для дальнейшего изучения молекулярных механизмов и биологической функции реализации трансрепрессорного механизма 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.

ВЫВОДЫ

1. СpdA-03 конкурентно связывается с GR в клетках в присутствии тритий-меченного Dex.
2. СpdA-03 обладает высокой стабильностью при долговременном хранении в водных растворах в широком диапазоне pH, а также при действии УФ-излучения.
3. СpdA и СpdA-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. СpdA-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, СpdA 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 СpdA и СpdA-03 в отличие от Dex не влияют на миграционную активность клеток РМЖ *in vitro*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

AF - трансактивационный субдомен
AR – рецептор андрогенов
BAR - бета-адренорецептор
CDK – циклин зависимая киназа
CCN – циклин
CLDN – клаудин (claudin)
Cx (GJ) - коннексин
CDH1 – E-кадгерин
Compound A (CpdA) – 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид
COX2 – циклооксигеназа-2
CpdA-03 – 4-[1-гидрокси-2-пиперидин-1-илэтил]фенол
DDIT4 (REDD1) – транскрипт 4, индуцируемый повреждением ДНК
Dex – дексаметазон
[³H]Dex – меченный тритием дексаметазон
DNMT – ДНК-метилтрансфераза
ER α – рецептор эстрогена
FBS – эмбриональная бычья сыворотка
GAPDH - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
GC – глюкокортикоид
GILZ – лейциновая молния, индуцируемая глюкокортикоидами
GFP – зеленый флуоресцентный белок
GR –рецептор глюкокортикоидов
GRE – регуляторные элементы глюкокортикоидов
HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2
MMP - металлопротеиназа
ICAM - молекула клеточной адгезии
IL - интерлейкин
iNOS – индуцибельная NO-синтаза
NF κ b – ядерный фактор κ B
NLS - субдомен ядерной локализации
NR – nuclear receptor (ядерный рецептор)
PBS – фосфатно-солевой буфер

PI – йодистый пропидий (propidium iodide)
PR – рецептор прогестерона
RE – респонсивный элемент
SDS – натрия додецилсульфат
SEGRA – селективные агонисты глюкокортикоидного рецептора
shRNA – короткая шпилечная РНК
Syn - синефрин
КИ – клиническое испытание
TET – метил цитозинная оксигеназа
TPA – тетрадеканол-форбол-13-ацетат
ЗНО – злокачественные новообразования
ОТ – обратная транскрипция
плДНК – плазмидная ДНК
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РМЖ – рак молочной железы
ТН РМЖ – тройной негативный рак молочной железы
ТФ – транскрипционный фактор
ЦНС – центральная нервная система
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход
МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2023 году / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. – Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2024 – 262 с. – ISBN 978-5-85502-297-1 – Текст: непосредственный.
2. Общая фармакопейная статья 1.1.0020.18. Стабильность биологических лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. – Москва, 2018
3. Стенина, М.Б. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы / М.Б. Стенина, Л.Г. Жукова, И.А. Королева, А.А. Пароконная, Т.Ю. Семиглазова, С.А. Тюляндин, М.А. Фролова // Злокачественные опухоли. – 2021. – Т. 10. – № 3s2-1. – С. 145-182.
4. Тилова, Л.Р. Оценка противоопухолевой активности новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора на моделях гемобластозов: дис. ... канд. биол. наук: 14.01.12 – онкология / Тилова Лейла Расуловна; ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России. – Москва, 2019 – 154 с.
5. Трякин, А.А. Практические рекомендации по общим принципам проведения противоопухолевой лекарственной терапии / А.А. Трякин, Н.С. Бесова, Н.М. Волков, О.А. Гладков, В.В. Карасева, Д.Д. Сакаева, И.Ю. Страдаева, Н.В. Фадеева // Злокачественные опухоли. – 2021. – Т. 10. – № 3s2-1. – С. 26-39.
6. Abidi, M.H. Aprepitant for prevention of nausea and vomiting secondary to high-dose cyclophosphamide administered to patients undergoing autologous peripheral blood stem cells mobilization: a phase II trial / M.H. Abidi, N. Tajeja, L. Ayash, J. Abrams, V. Ratanatharathorn, Z. Al-Kadhimi, L. Lum, S. Cronin, M. Ventimiglia, J. Uberti // Supportive Care in Cancer. – 2012. – Vol. 20. – № 10. – P. 2363-2369.
7. Acharya, N. Endogenous Glucocorticoid Signaling Regulates CD8+ T Cell Differentiation and Development of Dysfunction in the Tumor Microenvironment / N. Acharya, A. Madi, H. Zhang, M. Klapholz, G. Escobar, S. Dulberg, E. Christian, M. Ferreira, K.O. Dixon, G. Fell, K. Tooley, D. Mangani, J. Xia, M. Singer, M. Bosenberg, D. Neuberg, O. Rozenblatt-Rosen, ... A.C. Anderson // Immunity. – 2020. – Vol. 53. – № 3. – P. 658-671.e6.
8. Adcock, I.M. Molecular interactions between glucocorticoids and long-acting β 2-agonists / I.M. Adcock, K. Maneechotesuwan, O. Usmani // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2002. – Vol. 110. – № 6. – P. S261-S268.
9. Afghahi, A. Genetics of triple-negative breast cancer: Implications for patient care / A.

Afghahi, M.L. Telli, A.W. Kurian // *Current Problems in Cancer*. – 2016. – Vol. 40. – № 2-4. – P. 130-140.

10. Afzal, S. Breast Cancer; Discovery of novel diagnostic biomarkers, drug resistance, and therapeutic implications / S. Afzal, M. Hassan, S. Ullah, H. Abbas, F. Tawakkal, M.A. Khan // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2022. – Vol. 9. – P. 783450.

11. Agostinetto, E. Her2-low breast cancer: Molecular characteristics and prognosis / E. Agostinetto, M. Rediti, D. Fimereli, V. Debien, M. Piccart, P. Aftimos, C. Sotiriou, E. de Azambuja // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 11. – P. 2824-2840.

12. Akhtari, M. Biology of breast cancer bone metastasis / M. Akhtari, J. Mansuri, K.A. Newman, T.M. Guise, P. Seth // *Cancer Biology & Therapy*. – 2008. – Vol. 7. – № 1. – P. 3-9.

13. Aksoy, M.O. Glucocorticoid effects on the β -adrenergic receptor–adenylyl cyclase system of human airway epithelium / M.O. Aksoy, I.A. Mardini, Y. Yang, W. Bin, S. Zhou, S.G. Kelsen // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2002. – Vol. 109. – № 3. – P. 491-497.

14. Al-Alem, U. Genetic variation and immunohistochemical localization of the glucocorticoid receptor in breast cancer cases from the breast cancer care in Chicago cohort / U. Al-Alem, A.M. Mahmoud, K. Batai, E. Shah-Williams, P.H. Gann, R. Kittles, G.H. Rauscher // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 10. – P. 2261-2283.

15. Alderton, G.K. Exosomes drive premetastatic niche formation / G.K. Alderton // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 7. – P. 447-455.

16. Alyusuf, R. The immunoexpression of glucocorticoid receptors in breast carcinomas, lactational change, and normal breast epithelium and its possible role in mammary carcinogenesis / R. Alyusuf, J.F. Wazir, U.P. Brahmi, A.R. Fakhro, M. Bakhiet // *International Journal of Breast Cancer*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1-6.

17. Anderson, W.F. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? / W.F. Anderson, P.S. Rosenberg, A. Prat, C.M. Perou, M.E. Sherman // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. – 2014. – Vol. 106. – № 8. – P. dju165-dju165.

18. Andre, F. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer / F. Andre, N. Cabioglu, H. Assi, J.C. Sabourin, S. Delaloge, A. Sahin, K. Broglio, J.P. Spano, C. Combadiere, C. Bucana, J.C. Soria, M. Cristofanilli // *Annals of Oncology*. – 2006. – Vol. 17. – № 6. – P. 945-951.

19. Antoniou, A. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A Combined Analysis of 22 Studies / A. Antoniou, P.D.P. Pharoah, S. Narod, H.A. Risch, J.E. Eyfjord, J.L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, Å. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D.M. Eccles, N. Tang, E. Olah,

H. Anton-Culver, D.F. Easton // *The American Journal of Human Genetics*. – 2003. – Vol. 72. – № 5. – P. 1117-1130.

20. Arbo, M.D. Screening for *in vivo* (anti)estrogenic activity of ephedrine and p-synephrine and their natural sources *Ephedra sinica* Stapf. (Ephedraceae) and *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) in rats / M.D. Arbo, M.T. Franco, E.R. Larentis, S.C. Garcia, V.C. Sebben, M.B. Leal, E. Dallegrave, R.P. Limberger // *Archives of Toxicology*. – 2009. – Vol. 83. – № 1. – P. 95-99.

21. Arteaga, C.L. Blockade of the epidermal growth factor receptor inhibits transforming growth factor α -induced but not estrogen-induced growth of hormone-dependent human breast cancer / C.L. Arteaga, E. Coronado, C.K. Osborne // *Molecular Endocrinology*. – 1988. – Vol. 2. – № 11. – P. 1064-1069.

22. Ashwell, J.D. Glucocorticoids in T cell development and function / J.D. Ashwell, F.W.M. Lu, M.S. Vacchio // *Annual Review of Immunology*. – 2000. – Vol. 18. – № 1. – P. 309-345.

23. Austin, J.R. Baicalein is a phytohormone that signals through the progesterone and glucocorticoid receptors / J.R. Austin, B.J. Kirkpatrick, R.R. Rodríguez, M.E. Johnson, D.D. Lantvit, J.E. Burdette // *Hormones and Cancer*. – 2020. – Vol. 11. – № 2. – P. 97-110.

24. Avenant, C. Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity / C. Avenant, K. Ronacher, E. Stubbsrud, A. Louw, J.P. Hapgood // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2010. – Vol. 327. – № 1-2. – P. 72-88.

25. Ayroldi, E. A dual role for glucocorticoid-induced leucine zipper in glucocorticoid function: tumor growth promotion or suppression? / E. Ayroldi, L. Cannarile, D. V Delfino, C. Riccardi // *Cell Death & Disease*. – 2018. – Vol. 9. – № 5. – P. 463-475.

26. Ayroldi, E. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor κ B / E. Ayroldi, G. Migliorati, S. Bruscoli, C. Marchetti, O. Zollo, L. Cannarile, F. D'Adamio, C. Riccardi // *Blood*. – 2001. – Vol. 98. – № 3. – P. 743-753.

27. Babica, P. Scrape Loading/Dye Transfer Assay / I. Sovadinová, B.L. Upham // *Methods Mol Biol*. – 2016. – Vol. 1437. – P. 133-144.

28. 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. Lesovay // *Radiochemistry*. – 2024. – Vol. 66. – № 4. – P. 514-521.

29. Bale, R. Local treatment of breast cancer liver metastasis / R. Bale, D. Putzer, P. Schullian // *Cancers*. – 2019. – Vol. 11. – № 9. – P. 1341-1356.

30. Banerjee, D. Connexin's connection in breast cancer growth and progression / D. Banerjee // *International Journal of Cell Biology*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-11.

31. Barbieri, I. Constitutively active Stat3 Enhances neu-mediated migration and metastasis in

mammary tumors via upregulation of Cten / I. Barbieri, S. Pensa, T. Pannellini, E. Quaglino, D. Maritano, M. Demaria, A. Voster, J. Turkson, F. Cavallo, C.J. Watson, P. Provero, P. Musiani, V. Poli // *Cancer Research*. – 2010. – Vol. 70. – № 6. – P. 2558-2567.

32. Basarrate, S. Glucocorticoid and adrenergic receptor distribution across human organs and tissues: a map for stress transduction / S. Basarrate, A.S. Monzel, J. Smith, A. Marsland, C. Trumpff, M. Picard // *Psychosomatic Medicine*. – 2024. – Vol. 86. – № 2. – P. 89-98.

33. Baselga, J. Why the epidermal growth factor receptor? The Rationale for Cancer Therapy / J. Baselga // *The Oncologist*. – 2002. – Vol. 7. – № S4. – P. 2-8.

34. Bejjani, F. The AP-1 transcriptional complex: Local switch or remote command? / F. Bejjani, E. Evanno, K. Zibara, M. Piechaczyk, I. Jariel-Encontre // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. – 2019. – Vol. 1872. – № 1. – P. 11-23.

35. Belova, L. Glucocorticoid receptor expression in breast cancer associates with older patient age / L. Belova, B. Delgado, M. Kocherginsky, A. Melhem, O.I. Olopade, S.D. Conzen // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2009. – Vol. 116. – № 3. – P. 441-447.

36. Bergman, L. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer / L. Bergman, M.L.R. Beelen, M.P.W. Gallee, H. Hollema, J. Benraadt, F.E. Van Leeuwen // *Lancet*. – 2000. – Vol. 356. – № 9233. – P. 881-887.

37. Berlière, M. Uterine side effects of tamoxifen: A need for systematic pretreatment screening / M. Berlière, A. Charles, C. Galant, J. Donnez // *Obstetrics and Gynecology*. – 1998. – Vol. 91. – № 1. – P. 40-44.

38. Bertucci, P.Y. Glucocorticoid-induced impairment of mammary gland involution is associated with STAT5 and STAT3 signaling Modulation / P.Y. Bertucci, A. Quaglino, A.G. Pozzi, E.C. Kordon, A. Pecci // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151. – № 12. – P. 5730-5740.

39. Bhat, P. Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization / P. Bhat, J. Kriel, B.S. Priya, Basappa, N.S. Shivananju, B. Loos // *Biochemical Pharmacology*. – 2018. – Vol. 147. – P. 170-182.

40. Biddie, S.C. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease / S.C. Biddie, B.L. Conway-Campbell, S.L. Lightman // *Rheumatology*. – 2012. – Vol. 51. – № 3. – P. 403-412.

41. Biddie, S.C. Glucocorticoid receptor dynamics and gene regulation / S.C. Biddie, G.L. Hager // *Stress*. – 2009. – Vol. 12. – № 3. – P. 193-205.

42. Bild, A.H. An integration of complementary strategies for gene-expression analysis to reveal novel therapeutic opportunities for breast cancer / A.H. Bild, J.S. Parker, A.M. Gustafson, C.R. Acharya, K.A. Hoadley, C. Anders, P.K. Marcom, L.A. Carey, A. Potti, J.R. Nevins, C.M. Perou //

Breast Cancer Research. – 2009. – Vol. 11. – № 4. – P. 55-65.

43. Bolt, M.J. Coactivators enable glucocorticoid receptor recruitment to fine-tune estrogen receptor transcriptional responses / M.J. Bolt, F. Stossi, J.Y. Newberg, A. Orjalo, H.E. Johansson, M.A. Mancini // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 41. – № 7. – P. 4036-4048.

44. Bos, P.D. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain / P.D. Bos, X.H.-F. Zhang, C. Nadal, W. Shu, R.R. Gomis, D.X. Nguyen, A.J. Minn, M.J. van de Vijver, W.L. Gerald, J.A. Foekens, J. Massagué // *Nature*. – 2009. – Vol. 459. – № 7249. – P. 1005-1009.

45. Bosscher, K. De. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: Survival of the fittest regulator of the immune system? / K. De Bosscher, I.M. Beck, G. Haegeman // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2010. – Vol. 24. – № 7. – P. 1035-1042.

46. Bosscher, K. De. A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression / K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, I.M.E. Beck, W. Van Molle, N. Hennuyer, J. Hapgood, C. Libert, B. Staels, A. Louw, G. Haegeman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Vol. 102. – № 44. – P. 15827-15832.

47. Box, V.G.S. The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomycin / V.G.S. Box // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. – 2007. – Vol. 26. – № 1. – P. 14-19.

48. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. / M.M. Bradford // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

49. Bray, F. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, I. Soerjomataram, A. Jemal // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2024. – Vol. 74. – № 3. – P. 229-263.

50. Burnstein, K.L. Androgen and glucocorticoid regulation of androgen receptor cDNA expression / K.L. Burnstein, C.A. Maiorino, J.L. Dai, D.J. Cameron // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 1995. – Vol. 115. – № 2. – P. 177-186.

51. Burris, T.P. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators / T.P. Burris, L.A. Solt, Y. Wang, C. Crumbley, S. Banerjee, K. Griffett, T. Lundasen, T. Hughes, D.J. Kojetin // *Pharmacological Reviews*. – 2013. – Vol. 65. – № 2. – P. 710-778.

52. Buttgereit, F. Fosdagrocorat (PF-04171327) versus prednisone or placebo in rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, multicentre, phase IIb study / F. Buttgereit, V. Strand, E.B. Lee, A. Simon-Campos, D. McCabe, A. Genet, B. Tammara, R. Rojo, J. Hey-Hadavi // *RMD Open*. – 2019. – Vol. 5. – № 1. – P. e000889.

53. Buurstede, J.C. Hepatic glucocorticoid-induced transcriptional regulation is androgen-

dependent after chronic but not acute glucocorticoid exposure / J.C. Buurstedde, S.N. Paul, K. De Bosscher, O.C. Meijer, J. Kroon // *The FASEB Journal*. – 2022. – Vol. 36. – № 4. – P. e22251-66

54. Buxant, F. Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast *in situ* carcinoma, and invasive breast cancer / F. Buxant, C. Engohan-Aloghe, J.-C. Noël // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. – 2010. – Vol. 18. – № 3. – P. 254-257.

55. Cain, D.W. Immune regulation by glucocorticoids / D.W. Cain, J.A. Cidlowski // *Nature Reviews Immunology*. – 2017. – Vol. 17. – № 4. – P. 233-247.

56. Capaldo, C.T. Tight junction zonula occludens-3 regulates cyclin D1-dependent cell proliferation / C.T. Capaldo, S. Koch, M. Kwon, O. Laur, C.A. Parkos, A. Nusrat // *Molecular Biology of the Cell*. – 2011. – Vol. 22. – № 10. – P. 1677-1685.

57. Caplan, A. Prevention and management of glucocorticoid-induced side effects: A comprehensive review / A. Caplan, N. Fett, M. Rosenbach, V.P. Werth, R.G. Micheletti // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2017. – Vol. 76. – № 2. – P. 201-207.

58. Carey, L.A. Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000–2010 / L.A. Carey // *Clinical Breast Cancer*. – 2010. – Vol. 10. – № 3. – P. 188-195.

59. Carey, L.A. Central nervous system metastases in women after multimodality therapy for high risk breast cancer / L.A. Carey, M.G. Ewend, R. Metzger, L. Sawyer, E.C. Dees, C.I. Sartor, D.T. Moore, M.L. Graham // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2004. – Vol. 88. – № 3. – P. 273-280.

60. Carpéné, C. Selective activation of β_3 -adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells / C. Carpéné, J. Galitzky, E. Fontana, C. Atgié, M. Lafontan, M. Berlan // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. – 1999. – Vol. 359. – № 4. – P. 310-321.

61. Carpéné, C. Multiple direct effects of the dietary protoalkaloid n-methyltyramine in human adipocytes / C. Carpéné, P. Viana, J. Fontaine, H. Laurell, J.-L. Grolleau // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 14. – № 15. – P. 3118-3136.

62. Carvalho, C. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect / C. Carvalho, R. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P. Oliveira, M. Santos, P. Moreira // *Current Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 16. – № 25. – P. 3267-3285.

63. Castellana, B. ASPN and GJB2 are implicated in the mechanisms of invasion of ductal breast carcinomas / B. Castellana, D. Escuin, G. Peiró, B. Garcia-Valdecasas, T. Vázquez, C. Pons, M. Pérez-Olabarria, A. Barnadas, E. Lerma // *Journal of Cancer*. – 2012. – Vol. 3. – P. 175-183.

64. Chen, S. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance / S. Chen, S.K. Rehman, W. Zhang, A. Wen, L. Yao, J. Zhang // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on*

Cancer. – 2010. – Vol. 1806. – № 2. – P. 220-229.

65. Chen, X. Identification of DDIT4 as a potential prognostic marker associated with chemotherapeutic and immunotherapeutic response in triple-negative breast cancer / X. Chen, Z. Li, M. Liang, Z. Zhang, D. Zhu, B. Lin, R. Zhou, Y. Lu // *World Journal of Surgical Oncology*. – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 194-204.

66. Chen, Y. Glucocorticoids/glucocorticoid receptors effect on dopaminergic neurotransmitters in ADHD rats / Y. Chen, X. Zheng, L. Xie, L. Huang, Z. Ke, J. Zheng, H. Lu, J. Hu // *Brain Research Bulletin*. – 2017. – Vol. 131. – P. 214-220.

67. Chen, Z. Ligand-dependent genomic function of glucocorticoid receptor in triple-negative breast cancer / Z. Chen, X. Lan, D. Wu, B. Sunkel, Z. Ye, J. Huang, Z. Liu, S.K. Clinton, V.X. Jin, Q. Wang // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – № 1. – P. 8323-8331.

68. Chittaranjan, S. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer / S. Chittaranjan, S. Bortnik, W.H. Dragowska, J. Xu, N. Abeysundara, A. Leung, N.E. Go, L. DeVorkin, S.A. Wepler, K. Gelmon, D.T. Yapp, M.B. Bally, S.M. Gorski // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – Vol. 20. – № 12. – P. 3159-3173.

69. Choi, D. β -Ionone attenuates dexamethasone-induced suppression of collagen and hyaluronic acid synthesis in human dermal fibroblasts / D. Choi, W. Kang, S. Park, B. Son, T. Park // *Biomolecules*. – 2021. – Vol. 11. – № 5. – P. 619-633.

70. Christian, L.M. Stress and wound healing / L.M. Christian, J.E. Graham, D.A. Padgett, R. Glaser, J.K. Kiecolt-Glaser // *Neuroimmunomodulation*. – 2006. – Vol. 13. – № 5-6. – P. 337-346.

71. Ciriello, G. The molecular diversity of Luminal A breast tumors / G. Ciriello, R. Sinha, K.A. Hoadley, A.S. Jacobsen, B. Reva, C.M. Perou, C. Sander, N. Schultz // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2013. – Vol. 141. – № 3. – P. 409-420.

72. Clark, A.B. Glucocorticoid receptor-mediated oncogenic activity is dependent on breast cancer subtype / A.B. Clark, S.D. Conzen // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 243. – P. 106518-106522.

73. Clark, R.D. 1H-Pyrazolo[3,4-g]hexahydro-isoquinolines as selective glucocorticoid receptor antagonists with high functional activity / R.D. Clark, N.C. Ray, K. Williams, P. Blaney, S. Ward, P.H. Crackett, C. Hurley, H.J. Dyke, D.E. Clark, P. Lockey, R. Devos, M. Wong, S.S. Porres, C.P. Bright, R.E. Jenkins, J. Belanoff // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – Vol. 18. – № 4. – P. 1312-1317.

74. Clarke, R. Endocrine resistance in breast cancer – An overview and update / R. Clarke, J.J. Tyson, J.M. Dixon // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2015. – Vol. 418. – P. 220-234.

75. Clemons, M. Risk Model–Guided Antiemetic Prophylaxis vs Physician’s Choice in Patients Receiving Chemotherapy for Early-Stage Breast Cancer / M. Clemons, N. Bouganim, S. Smith, S. Mazzeo, L. Vandermeer, R. Segal, S. Dent, S. Gertler, X. Song, P. Wheatley-Price, G. Dranitsaris // *JAMA Oncology*. – 2016. – Vol. 2. – № 2. – P. 225-231.
76. Coleman, R.E. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity / R.E. Coleman // *Clinical Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12. – № 20. – P. 6243s-6249s.
77. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours // *Nature*. – 2012. – Vol. 490. – № 7418. – P. 61-70.
78. Connell, C.M. Cancer immunotherapy trial registrations increase exponentially but chronic immunosuppressive glucocorticoid therapy may compromise outcomes / C.M. Connell, S. Raby, I. Beh, T.R. Flint, E.H. Williams, D.T. Fearon, D.I. Jodrell, T. Janowitz // *Annals of Oncology*. – 2017. – Vol. 28. – № 7. – P. 1678-1679.
79. Cook, K.L. Autophagy and endocrine resistance in breast cancer / K.L. Cook, A.N. Shajahan, R. Clarke // *Expert Review of Anticancer Therapy*. – 2011. – Vol. 11. – № 8. – P. 1283-1294.
80. Costello, R.E. Glucocorticoid use is associated with an increased risk of hypertension / R.E. Costello, B.B. Yimer, P. Roads, M. Jani, W.G. Dixon // *Rheumatology*. – 2021. – Vol. 60. – № 1. – P. 132-139.
81. Cruz-Muñoz, W. Preclinical approaches to study the biology and treatment of brain metastases / W. Cruz-Muñoz, R.S. Kerbel // *Seminars in Cancer Biology*. – 2011. – Vol. 21. – № 2. – P. 123-130.
82. Cruz-Topete, D. One Hormone, Two Actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids / D. Cruz-Topete, J.A. Cidlowski // *Neuroimmunomodulation*. – 2015. – Vol. 22. – № 1-2. – P. 20-32.
83. Curtis, J.R. Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use / J.R. Curtis, A.O. Westfall, J. Allison, J.W. Bijlsma, A. Freeman, V. George, S.H. Kovac, C.M. Spettell, K.G. Saag // *Arthritis Care & Research*. – 2006. – Vol. 55. – № 3. – P. 420-426.
84. D’Ippolito, A.M. Pre-established chromatin interactions mediate the genomic response to glucocorticoids / A.M. D’Ippolito, I.C. McDowell, A. Barrera, L.K. Hong, S.M. Leichter, L.C. Bartelt, C.M. Vockley, W.H. Majoros, A. Safi, L. Song, C.A. Gersbach, G.E. Crawford, T.E. Reddy // *Cell Systems*. – 2018. – Vol. 7. – № 2. – P. 146-160.
85. Dai, X.L. Correlated expression of Fas, NF-kappaB, and VEGF-C in infiltrating ductal carcinoma of the breast. / X.L. Dai, S.L. Zhou, J. Qiu, Y.F. Liu, H. Hua // *European journal of gynaecological oncology*. – 2012. – Vol. 33. – № 6. – P. 633-639.

86. Derijk, R.H. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. / R.H. Derijk, M.J. Schaaf, G. Turner, N.A. Datson, E. Vreugdenhil, J. Cidlowski, E.R. de Kloet, P. Emery, E.M. Sternberg, S.D. Detera-Wadleigh // *The Journal of rheumatology*. – 2001. – Vol. 28. – № 11. – P. 2383-2388.

87. Dethlefsen, C. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer / C. Dethlefsen, G. Højfeldt, P. Hojman // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2013. – Vol. 138. – № 3. – P. 657-664.

88. Dewint, P. A plant-derived ligand favoring monomeric glucocorticoid receptor conformation with impaired transactivation potential attenuates collagen-induced arthritis / P. Dewint, V. Gossye, K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, K. Van Beneden, D. Deforce, S. Van Calenbergh, U. Müller-Ladner, B. Vander Cruyssen, G. Verbruggen, G. Haegeman, D. Elewaut // *The Journal of Immunology*. – 2008. – Vol. 180. – № 4. – P. 2608-2615.

89. DeYoung, M.P. Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling / M.P. DeYoung, P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi, L.W. Ellisen // *Genes & Development*. – 2008. – Vol. 22. – № 2. – P. 239-251.

90. Diamond, J.R. Hepatic complications of breast cancer / J.R. Diamond, C.A. Finlayson, V.F. Borges // *The Lancet Oncology*. – 2009. – Vol. 10. – № 6. – P. 615-621.

91. Dias, K. Claudin-low breast cancer; clinical; pathological characteristics / K. Dias, A. Dvorkin-Gheva, R.M. Hallett, Y. Wu, J. Hassell, G.R. Pond, M. Levine, T. Whelan, A.L. Bane // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. e0168669.

92. Dodonova, S.A. Synephrine and its derivative compound A: common and specific biological effects / S.A. Dodonova, E.M. Zhidkova, A.A. Kryukov, T.T. Valiev, K.I. Kirsanov, E.P. Kulikov, I. V Budunova, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 24. – P. 17537.

93. Donepudi, M. Breast cancer statistics and markers / M. Donepudi, K. Kondapalli, S. Amos, P. Venkanteshan // *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. – 2014. – Vol. 10. – № 3. – P. 506-511.

94. Dongre, A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer / A. Dongre, R.A. Weinberg // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. – Vol. 20. – № 2. – P. 69-84.

95. Duffy, M.J. Use of circulating tumour DNA (ctDNA) for measurement of therapy predictive biomarkers in patients with cancer / M.J. Duffy, J. Crown // *Journal of Personalized Medicine*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 99-218.

96. Dwyer, A.R. Glucocorticoid receptors drive breast cancer cell migration and metabolic reprogramming via PDK4 / A.R. Dwyer, C.P. Kerkvliet, T.H. Truong, K.M. Hagen, R.I. Krutilina, D.N. Parke, R.H. Oakley, C. Liddle, J.A. Cidlowski, T.N. Seagroves, C.A. Lange // *Endocrinology*. – 2023. – Vol. 164. – № 7. – P. 1-12.
97. Eirefelt, S. Characterization of a novel non-steroidal glucocorticoid receptor agonist optimized for topical treatment / S. Eirefelt, M. Stahlhut, N. Svitacheva, M.A. Carnerup, J.M.C. Da Rosa, D.A. Ewald, T.T. Marstrand, M. Krogh-Madsen, G. Dünstl, K.N. Dack, A. Ollerstam, H. Norsgaard // *Scientific Reports*. – 2022. – Vol. 12. – № 1. – P. 1501-12.
98. Elzarrad, M.K. Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium / M.K. Elzarrad, A. Haroon, K. Willecke, R. Dobrowolski, M.N. Gillespie, A.-B. Al-Mehdi // *BMC Medicine*. – 2008. – Vol. 6. – № 1. – P. 20-36.
99. Fabbri, F. Know your enemy: Genetics, aging, exposomic and inflammation in the war against triple negative breast cancer / F. Fabbri, S. Salvi, S. Bravaccini // *Seminars in Cancer Biology*. – 2020. – Vol. 60. – P. 285-293.
100. FeiZhou, B. Non-classical antiestrogenic actions of dexamethasone in variant MCF-7 human breast cancer cells in culture / B. FeiZhou, M.O. Bouillard, Pharaboz-Joly, J. André // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 1989. – Vol. 66. – № 2. – P. 189-197.
101. Fioretti, F.M. Revising the role of the androgen receptor in breast cancer / F.M. Fioretti, A. Sita-Lumsden, C.L. Bevan, G.N. Brooke // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2014. – Vol. 52. – № 3. – P. R257-R265.
102. Firestone, G. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity / G. Firestone, J. Giampaolo, B. O’Keeffe // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2003. – Vol. 13. – № 1. – P. 1-12.
103. Franco-Barraza, J. Actin cytoskeleton participation in the onset of IL-1 β induction of an invasive mesenchymal-like phenotype in epithelial MCF-7 cells / J. Franco-Barraza, J.E. Valdivia-Silva, H. Zamudio-Meza, A. Castillo, E.A. García-Zepeda, L. Benítez-Bribiesca, I. Meza // *Archives of Medical Research*. – 2010. – Vol. 41. – № 3. – P. 170-181.
104. Frank, F. Structural insights into glucocorticoid receptor function / F. Frank, E.A. Ortlund, X. Liu // *Biochemical Society Transactions*. – 2021. – Vol. 49. – № 5. – P. 2333-2343.
105. Frasor, J. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype / J. Frasor, J.M. Danes, B. Komm, K.C.N. Chang, C.R. Lyttle, B.S. Katzenellenbogen // *Endocrinology*. – 2003. – Vol. 144. – № 10. – P. 4562-4574.
106. Fung, C. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell

survival / C. Fung, R. Lock, S. Gao, E. Salas, J. Debnath // *Molecular Biology of the Cell*. – 2008. – Vol. 19. – № 3. – P. 797-806.

107. Futakuchi, M. Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: Mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer / M. Futakuchi, K. Fukamachi, M. Suzui // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Vol. 99. – P. 206-211.

108. Galliher-Beckley, A.J. Ligand-Independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling / A.J. Galliher-Beckley, J.G. Williams, J.A. Cidlowski // *Molecular and Cellular Biology*. – 2011. – Vol. 31. – № 23. – P. 4663-4675.

109. Gambardella, G. A single-cell analysis of breast cancer cell lines to study tumour heterogeneity and drug response / G. Gambardella, G. Viscido, B. Tumaini, A. Isacchi, R. Bosotti, D. di Bernardo // *Nature Communications*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 1714-1726.

110. Ganshina, I.P. Antiangiogenic therapy for breast cancer with triple negative phenotype / I.P. Ganshina, K.A. Ivanova, O.O. Gordeeva, A. V Arkhipov, L.G. Zhukova // *Journal of Modern Oncology*. – 2021. – Vol. 23. – № 1. – P. 88-92.

111. Gao, J. Glucocorticoid impairs cell-cell communication by autophagy-mediated degradation of connexin 43 in osteocytes / J. Gao, T.S. Cheng, A. Qin, N.J. Pavlos, T. Wang, K. Song, Y. Wang, L. Chen, L. Zhou, Q. Jiang, H. Takayanagi, S. Yan, M. Zheng // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – № 19. – P. 26966-26978.

112. Garay, J.P. Androgen receptor as a targeted therapy for breast cancer. / J.P. Garay, B.H. Park // *American journal of cancer research*. – 2012. – Vol. 2. – № 4. – P. 434-445.

113. Garuti, G. Histopathologic behavior of endometrial hyperplasia during tamoxifen therapy for breast cancer / G. Garuti, F. Cellani, G. Centinaio, G. Sita, G. Nalli, M. Luerti // *Gynecologic Oncology*. – 2006. – Vol. 101. – № 2. – P. 269-273.

114. Gauvreau, G.M. A nonsteroidal glucocorticoid receptor agonist inhibits allergen-induced late asthmatic responses / G.M. Gauvreau, L.-P. Boulet, R. Leigh, D.W. Cockcroft, K.J. Killian, B.E. Davis, F. Deschesnes, R.M. Watson, V. Swystun, C.K. Mårdh, P. Wessman, C. Jorup, M. Aurivillius, P.M. O'Byrne // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2015. – Vol. 191. – № 2. – P. 161-167.

115. Geisberg, C. Cardiac side effects of anticancer treatments: new mechanistic insights / C. Geisberg, L. Pentassuglia, D.B. Sawyer // *Current Heart Failure Reports*. – 2012. – Vol. 9. – № 3. – P. 211-218.

116. Giuliano, M. Biological mechanisms and clinical implications of endocrine resistance in breast cancer / M. Giuliano, R. Schiff, C.K. Osborne, M. V Trivedi // *The Breast*. – 2011. – Vol. 20. –

P. S42-S49.

117. Godbole, M. Up-regulation of the kinase gene SGK1 by progesterone activates the AP-1–NDRG1 axis in both PR-positive and -negative breast cancer cells / M. Godbole, T. Togar, K. Patel, B. Dharavath, N. Yadav, S. Janjuha, N. Gardi, K. Tiwary, P. Terwadkar, S. Desai, R. Prasad, H. Dhamne, K. Karve, S. Salunkhe, D. Kawle, P. Chandrani, S. Dutt, A. Dutt // *Journal of Biological Chemistry*. – 2018. – Vol. 293. – № 50. – P. 19263-19276.

118. Gong, H. Glucocorticoids antagonize estrogens by glucocorticoid receptor-mediated activation of estrogen sulfotransferase / H. Gong, M.J. Jarzynka, T.J. Cole, J.H. Lee, T. Wada, B. Zhang, J. Gao, W.C. Song, D.B. DeFranco, S.Y. Cheng, W. Xie // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 18. – P. 7386-7393.

119. Goya, L. Glucocorticoids induce a G1/G0 cell cycle arrest of Con8 rat mammary tumor cells that is synchronously reversed by steroid withdrawal or addition of transforming growth factor-alpha. / L. Goya, A.C. Maiyar, Y. Ge, G.L. Firestone // *Molecular Endocrinology*. – 1993. – Vol. 7. – № 9. – P. 1121-1132.

120. Grigoreva, D.D. Autophagy activation in breast cancer cells *in vitro* after the treatment with PI3K/AKT/mTOR inhibitors / D.D. Grigoreva, E.M. 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.

121. Grigoryeva, E.S. Predicting the site of distant metastases in breast cancer / E.S. Grigoryeva, E.E. Ivanyuk, E.L. Choinzonov, N. V Cherdyntseva // *Siberian journal of oncology*. – 2023. – Vol. 22. – № 1. – P. 151-158.

122. Grivennikov, S.I. Immunity, inflammation, and cancer / S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin // *Cell*. – 2010. – Vol. 140. – № 6. – P. 883-899.

123. Gronemeyer, H. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily / H. Gronemeyer, J.Å. Gustafsson, V. Laudet // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2004. – Vol. 3. – № 11. – P. 950-964.

124. Groner, B. Hormonal regulation of transcription factor activity in mammary epithelial cells / B. Groner, S. Altiok, V. Meier // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 1994. – Vol. 100. – № 1-2. – P. 109-114.

125. Györffy, B. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients / B. Györffy, A. Lanczky, A.C. Eklund, C. Denkert, J. Budczies, Q. Li, Z. Szallasi // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2010. – Vol. 123. – № 3. – P. 725-731.

126. Hall, B.A. Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) activation in breast

cancer: requirement for mTORC1 activity associates with ER-alpha expression / B.A. Hall, T.Y. Kim, M.N. Skor, S.D. Conzen // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2012. – Vol. 135. – № 2. – P. 469-479.

127. Hamid, Q.A. Increased glucocorticoid receptor β in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma / Q.A. Hamid, S.E. Wenzel, P.I.A.J. Hauk, A. Tsicopoulos, B. Wallaert, J.J. Lafitte, G.P. Chrousos, S.J. Szeffler, D.Y.M. Leung // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 1999. – Vol. 159. – № 5. – P. 1600-1604.

128. Hanaoka, B.Y. Implications of glucocorticoid therapy in idiopathic inflammatory myopathies / B.Y. Hanaoka, C.A. Peterson, C. Horbinski, L.J. Crofford // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2012. – Vol. 8. – № 8. – P. 448-457.

129. Harries, M. Incidence of bone metastases and survival after a diagnosis of bone metastases in breast cancer patients / M. Harries, A. Taylor, L. Holmberg, O. Agbaje, H. Garmo, S. Kabilan, A. Purushotham // *Cancer Epidemiology*. – 2014. – Vol. 38. – № 4. – P. 427-434.

130. Harris, R.A. The induction of apoptosis in human mammary luminal epithelial cells by expression of activated c-neu and its abrogation by glucocorticoids / R.A. Harris, I.D. Hiles, M.J. Page, M.J. O'Hare // *British Journal of Cancer*. – 1995. – Vol. 72. – № 2. – P. 386-392.

131. Hartman, Z.C. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8 / Z.C. Hartman, G.M. Poage, P. den Hollander, A. Tsimelzon, J. Hill, N. Panupinthu, Y. Zhang, A. Mazumdar, S.G. Hilsenbeck, G.B. Mills, P.H. Brown // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 11. – P. 3470-3480.

132. He, M. Ginsenoside Rg1 acts as a selective glucocorticoid receptor agonist with anti-inflammatory action without affecting tissue regeneration in zebrafish larvae / M. He, M. Halima, Y. Xie, M.J.M. Schaaf, A.H. Meijer, M. Wang // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 1107-1122.

133. Herr, I. Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases / I. Herr, J. Pfitzenmaier // *The Lancet Oncology*. – 2006. – Vol. 7. – № 5. – P. 425-430.

134. Herr, I. Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas / I. Herr, E. Ucur, K. Herzer, S. Okouoyo, R. Ridder, P.H. Krammer, M. von Knebel Doeberitz, K.-M. Debatin // *Cancer research*. – 2003. – Vol. 63. – № 12. – P. 3112-3120.

135. Herschkowitz, J.I. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors / J.I. Herschkowitz, K. Simin, V.J. Weigman, I. Mikaelian, J. Usary, Z. Hu, K.E. Rasmussen, L.P. Jones, S. Assefnia, S. Chandrasekharan, M.G. Backlund, Y. Yin, A.I. Khramtsov, R. Bastein, J. Quackenbush, R.I. Glazer, P.H. Brown, ... C.M. Perou // *Genome Biology*. – 2007. – Vol. 8. – № 5. – P. R76.1-R76.17

136. Heuvel, M.M. Glucocorticoids modulate the development of dendritic cells from blood precursors / M.M. Heuvel, N.M. Beek, E. Broug-Holub, P.E. Postmus, E.C.M. Hoefsmit, R.H.J. Beelen, G. Kraal // *Clinical and Experimental Immunology*. – 2001. – Vol. 115. – № 3. – P. 577-583.
137. Heyden, M.A.G. van der. Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling / M.A.G. van der Heyden, M.B. Rook, M.M.P. Hermans, G. Rijksen, J. Boonstra, L.H.K. Defize, O.H.J. Destrée // *Journal of Cell Science*. – 1998. – Vol. 111. – № 12. – P. 1741-1749.
138. Hibberts, N.A. Balding hair follicle dermal papilla cells contain higher levels of androgen receptors than those from non-balding scalp / N.A. Hibberts, A.E. Howell, V.A. Randall // *Journal of Endocrinology*. – 1998. – Vol. 156. – № 1. – P. 59-65.
139. Hinz, M. NF- κ B Function in Growth Control: Regulation of Cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition / M. Hinz, D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit, M. Strauss // *Molecular and Cellular Biology*. – 1999. – Vol. 19. – № 4. – P. 2690-2698.
140. Hoijman, E. Glucocorticoid alternative effects on proliferating and differentiated mammary epithelium are associated to opposite regulation of cell-cycle inhibitor expression / E. Hoijman, L. Rocha-Viegas, S.G. Kalko, N. Rubinstein, M. Morales-Ruiz, E.B. de Kier Joffé, E.C. Kordon, A. Pecci // *Journal of Cellular Physiology*. – 2012. – Vol. 227. – № 4. – P. 1721-1730.
141. Hortobágyi, G. Moving into the future: Treatment of bone metastases and beyond / G. Hortobágyi // *Cancer Treatment Reviews*. – 2005. – Vol. 31. – P. 9-18.
142. Hortobágyi, G.N. Anthrazykline in der Krebstherapie / G.N. Hortobágyi // *Drugs*. – 1997. – Vol. 54. – № Supplement 4. – P. 1-7.
143. Hou, J. Autophagy and tumour metastasis / J. Hou, Z. Han, N. Zhao, L. Wei. – 2020. – P. 315-338.
144. Houghton, L.C. The steroid metabolome and breast cancer risk in women with a family history of breast cancer: the novel role of adrenal androgens and glucocorticoids / L.C. Houghton, R.E. Howland, Y. Wei, X. Ma, R.D. Kehm, W.K. Chung, J.M. Genkinger, R.M. Santella, M.F. Hartmann, S.A. Wudy, M.B. Terry // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. – 2021. – Vol. 30. – № 1. – P. 89-96.
145. Hu, D.G. Identification of androgen receptor splice variant transcripts in breast cancer cell lines and human tissues / D.G. Hu, T.E. Hickey, C. Irvine, D.D. Wijayakumara, L. Lu, W.D. Tilley, L.A. Selth, P.I. Mackenzie // *Hormones and Cancer*. – 2014. – Vol. 5. – № 2. – P. 61-71.
146. Hu, X. Inhibition of IFN- γ Signaling by Glucocorticoids / X. Hu, W.-P. Li, C. Meng, L.B. Ivashkiv // *The Journal of Immunology*. – 2003. – Vol. 170. – № 9. – P. 4833-4839.
147. Hua, G. Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex / G. Hua, K.P. Ganti, P.

Chambon // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – Vol. 113. – № 5. – P. E635-E643

148. Huang, Y.-T. Hemodynamic effects of synephrine treatment in portal hypertensive rats / Y.-T. Huang, H.-C. Lin, Y.-Y. Chang, Y.-Y. Yang, S.-D. Lee, C.-Y. Hong, C.-Y. Hong // Japanese Journal of Pharmacology. – 2001. – Vol. 85. – № 2. – P. 183-188.

149. Huang, Z. Stress management by autophagy: Implications for chemoresistance / Z. Huang, L. Zhou, Z. Chen, E.C. Nice, C. Huang // International Journal of Cancer. – 2016. – Vol. 139. – № 1. – P. 23-32.

150. Huber, M.A. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression / M.A. Huber, N. Azoitei, B. Baumann, S. Grünert, A. Sommer, H. Pehamberger, N. Kraut, H. Beug, T. Wirth // Journal of Clinical Investigation. – 2004. – Vol. 114. – № 4. – P. 569-581.

151. Hudson, W.H. Distal substitutions drive divergent DNA specificity among paralogous transcription factors through subdivision of conformational space / W.H. Hudson, B.R. Kossmann, I.M.S. de Vera, S.-W. Chuo, E.R. Weikum, G.N. Eick, J.W. Thornton, I.N. Ivanov, D.J. Kojetin, E.A. Ortlund // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – Vol. 113. – № 2. – P. 326-331.

152. Hudson, W.H. Cryptic glucocorticoid receptor-binding sites pervade genomic NF- κ B response elements / W.H. Hudson, I.M.S. de Vera, J.C. Nwachukwu, E.R. Weikum, A.G. Herbst, Q. Yang, D.L. Bain, K.W. Nettles, D.J. Kojetin, E.A. Ortlund // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 1337-1352.

153. Hudson, W.H. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression / W.H. Hudson, C. Youn, E.A. Ortlund // Nature Structural & Molecular Biology. – 2013. – Vol. 20. – № 1. – P. 53-58.

154. Hundertmark, S. Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity enhances the antiproliferative effect of glucocorticosteroids on MCF-7 and ZR-75-1 breast cancer cells / S. Hundertmark, H. Buhler, M. Rudolf, H.K. Weitzel, V. Ragosch // Journal of Endocrinology. – 1997. – Vol. 155. – № 1. – P. 171-180.

155. Ichim, M.C. A Review of Authenticity and Authentication of Commercial Ginseng Herbal Medicines and Food Supplements / M.C. Ichim, H.J. de Boer // Frontiers in Pharmacology. – 2021. – Vol. 11. – P. 612071-615280

156. Ito, K. Update on glucocorticoid action and resistance / K. Ito, K.F. Chung, I.M. Adcock // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2006. – Vol. 117. – № 3. – P. 522-543.

157. Iyer-Bierhoff, A. Acetylation-induced proteasomal degradation of the activated glucocorticoid receptor limits hormonal signaling / A. Iyer-Bierhoff, M. Wieczorek, S.M. Peter, D.

Ward, M. Bens, S. Vettorazzi, K.-H. Guehrs, J.P. Tuckermann, T. Heinzl // *iScience*. – 2024. – Vol. 27. – № 2. – P. 108943-108954.

158. Iyyathurai, J. Connexins: substrates and regulators of autophagy / J. Iyyathurai, J.-P. Decuypere, L. Leybaert, C. D'hondt, G. Bultynck // *BMC Cell Biology*. – 2016. – Vol. 17. – № S1. – P. 89-105.

159. Janku, F. Autophagy as a target for anticancer therapy / F. Janku, D.J. McConkey, D.S. Hong, R. Kurzrock // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2011. – Vol. 8. – № 9. – P. 528-539.

160. Jeselsohn, R. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer / R. Jeselsohn, G. Buchwalter, C. De Angelis, M. Brown, R. Schiff // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2015. – Vol. 12. – № 10. – P. 573-583.

161. Jo, A. Prolyl isomerase PIN1 negatively regulates SGK1 stability to mediate tamoxifen resistance in breast cancer cells. / A. Jo, H.J. Yun, J.Y. Kim, S.-C. Lim, H.J. Choi, B.S. Kang, B.-Y. Choi, H.S. Choi // *Anticancer research*. – 2015. – Vol. 35. – № 2. – P. 785-794.

162. Juan, Y.-C. Pharmacological evaluation of insulin mimetic novel suppressors of PEPCK gene transcription from *Paeoniae Rubra Radix* / Y.-C. Juan, C.-C. Chang, W.-J. Tsai, Y.-L. Lin, Y.-S. Hsu, H.-K. Liu // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2011. – Vol. 137. – № 1. – P. 592-600.

163. Kaats, G.R. A 60day double-blind, placebo-controlled safety study involving *Citrus aurantium* (bitter orange) extract / G.R. Kaats, H. Miller, H.G. Preuss, S.J. Stohs // *Food and Chemical Toxicology*. – 2013. – Vol. 55. – P. 358-362.

164. Kadiyala, V. Cistrome analysis of glucocorticoid receptor activity in bronchial epithelial cells defines novel mechanisms of steroid efficacy / V. Kadiyala, S.K. Sasse, M.O. Altonsy, T.L. Phang, A.N. Gerber // *Annals of the American Thoracic Society*. – 2016. – Vol. 13. – № Supplement 1. – P. S103-S103.

165. Kakkat, S. Exploring the multifaceted role of obesity in breast cancer progression / S. Kakkat, P. Suman, E.A.T.- Herrera, S. Singh, D. Chakroborty, C. Sarkar // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2024. – Vol. 12. – P. 1408844-61.

166. Kanai, A. Significance of glucocorticoid signaling in triple-negative breast cancer patients: a newly revealed interaction with androgen signaling / A. Kanai, K.M. McNamara, E. Iwabuchi, Y. Miki, Y. Onodera, F. Guestini, F. Khalid, Y. Sagara, Y. Ohi, Y. Rai, R. Yamaguchi, M. Tanaka, M. Miyashita, T. Ishida, H. Sasano // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2020. – Vol. 180. – № 1. – P. 97-110.

167. Kang, C. Genetically Encoded Sensor Cells for the Screening of Glucocorticoid Receptor (GR) Effectors in Herbal Extracts / C. Kang, S. Kim, E. Lee, J. Ryu, M. Lee, Y. Kwon // *Biosensors*. – 2021. – Vol. 11. – № 9. – P. 341-355.

168. Kang, R. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis / R. Kang, H.J. Zeh, M.T. Lotze, D. Tang // *Cell Death & Differentiation*. – 2011. – Vol. 18. – № 4. – P. 571-580.
169. Kang, Y. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone / Y. Kang, P.M. Siegel, W. Shu, M. Drobnjak, S.M. Kakonen, C. Cordon-Cardo, T.A. Guise, J. Massagué // *Cancer Cell*. – 2003. – Vol. 3. – № 6. – P. 537-549.
170. Karmakar, S. Interaction of Glucocorticoid Receptor (GR) with Estrogen Receptor (ER) α and Activator Protein 1 (AP1) in Dexamethasone-mediated Interference of ER α Activity / S. Karmakar, Y. Jin, A.K. Nagaich // *Journal of Biological Chemistry*. – 2013. – Vol. 288. – № 33. – P. 24020-24034.
171. Kastner, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. / P. Kastner, A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Tora, H. Gronemeyer, P. Chambon // *The EMBO Journal*. – 1990. – Vol. 9. – № 5. – P. 1603-1614.
172. Keith, B.D. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy / B.D. Keith // *BMC Cancer*. – 2008. – Vol. 8. – № 1. – P. 84-103.
173. Kelly, A. The glucocorticoid receptor β isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases / A. Kelly, H. Bowen, Y.-K. Jee, N. Mahfiche, C. Soh, T. Lee, C. Hawrylowicz, P. Lavender // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2008. – Vol. 121. – № 1. – P. 203-208.e1.
174. Kennecke, H. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes / H. Kennecke, R. Yerushalmi, R. Woods, M.C.U. Cheang, D. Voduc, C.H. Speers, T.O. Nielsen, K. Gelmon // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 28. – № 20. – P. 3271-3277.
175. Kim, B.-M. Ginsenoside Rg 3 induces apoptosis of human breast cancer (MDA-MB-231) cells / B.-M. Kim, D.-H. Kim, J.-H. Park, H.-K. Na, Y.-J. Surh // *Journal of Cancer Prevention*. – 2013. – Vol. 18. – № 2. – P. 177-185.
176. Kim, D.W. The RelA NF- κ B subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells / D.W. Kim, L. Gazourian, S.A. Quadri, Raphaëlle, D.H. Sherr, G.E. Sonenshein // *Oncogene*. – 2000. – Vol. 19. – № 48. – P. 5498-5506.
177. Kim, H.M. The Role of Autophagy in Breast Cancer Metastasis / H.M. Kim, J.S. Koo // *Biomedicines*. – 2023. – Vol. 11. – № 2. – P. 618-637.
178. Kim, M.-J. G-protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) and Women's Health / M.-J. Kim, T.-H. Kim, H.-H. Lee // *Journal of Menopausal Medicine*. – 2015. – Vol. 21. – № 2. – P. 79-81.
179. Kim, M.J. Negative regulation of SEK1 signaling by serum- and glucocorticoid-inducible

protein kinase 1 / M.J. Kim, J.S. Chae, K.J. Kim, S.G. Hwang, K.W. Yoon, E.K. Kim, H.J. Yun, J.-H. Cho, J. Kim, B.-W. Kim, H. Kim, S.S. Kang, F. Lang, S.-G. Cho, E.-J. Choi // *The EMBO Journal*. – 2007. – Vol. 26. – № 13. – P. 3075-3085.

180. Kim, N.H. R-(-)- β -O-methylsynephrine, a natural product, inhibits VEGF-induced angiogenesis *in vitro* and *in vivo* / N.H. Kim, N.B. Pham, R.J. Quinn, H.J. Kwon // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – Vol. 399. – № 1. – P. 20-23.

181. Kino, T. Human glucocorticoid receptor isoform β : recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology / T. Kino, Y.A. Su, G.P. Chrousos // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2009. – Vol. 66. – № 21. – P. 3435-3448.

182. Kit, O.I. The correlation between different biomolecular breast cancer subtypes frequency and the menstrual state / O.I. Kit, Y.S. Shatova, S.S. Todorov, T.N. Gudtskova // *Russian Journal of Oncology*. – 2014. – Vol. 19. – № 5. – P. 24-27.

183. Knuefermann, C. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells / C. Knuefermann, Y. Lu, B. Liu, W. Jin, K. Liang, L. Wu, M. Schmidt, G.B. Mills, J. Mendelsohn, Z. Fan // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22. – № 21. – P. 3205-3212.

184. Knüpfer, H. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review) / H. Knüpfer, R. Preiß // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2007. – Vol. 102. – № 2. – P. 129-135.

185. Ko, H.-C. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells / H.-C. Ko, Y.-H. Wang, K.-T. Liou, C.-M. Chen, C.-H. Chen, W.-Y. Wang, S. Chang, Y.-C. Hou, K.-T. Chen, C.-F. Chen, Y.-C. Shen // *European Journal of Pharmacology*. – 2007. – Vol. 555. – № 2-3. – P. 211-217.

186. Koga, Y. Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor α and β is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children / Y. Koga, A. Matsuzaki, A. Suminoe, H. Hattori, S. Kanemitsu, T. Hara // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2005. – Vol. 45. – № 2. – P. 121-127.

187. Koo, J.S. Alteration of REDD1-Mediated Mammalian Target of Rapamycin Pathway and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Regulation in Human Breast Cancer / J.S. Koo, W. Jung // *Pathobiology*. – 2010. – Vol. 77. – № 6. – P. 289-300.

188. Kubista, M. The real-time polymerase chain reaction / M. Kubista, J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg, N. Zoric // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2006. – Vol. 27. – № 2-3. – P. 95-125.

189. Kumar, R. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship / R. Kumar, E.B. Thompson // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 94. – № 5. – P. 383-394.

190. Kwack, M.H. Dexamethasone, a Synthetic Glucocorticoid, Induces the Activity of Androgen Receptor in Human Dermal Papilla Cells / M.H. Kwack, O. Ben Hamida, M.K. Kim, J.C. Kim, Y.K. Sung // *Skin Pharmacology and Physiology*. – 2022. – Vol. 35. – № 5. – P. 299-304.

191. Laar, J.M. AZD9567 versus prednisolone in patients with active rheumatoid arthritis: A phase IIa, randomized, double-blind, efficacy, and safety study / J.M. Laar, A. Lei, M. Safy-Khan, J. Almquist, G. Belfield, K. Edman, L. Öberg, B.R. Angermann, I. Dillmann, P. Berntsson, D. Etal, I. Dainty, C. Astbury, M.G. Belvisi, S. Nemes, A. Platt, S. Prothon, C. Keen // *Clinical and Translational Science*. – 2023. – Vol. 16. – № 12. – P. 2494-2506.

192. Lamouille, S. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition / S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2014. – Vol. 15. – № 3. – P. 178-196.

193. Lang, F. (Patho)physiological Significance of the Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase Isoforms / F. Lang, C. Böhmer, M. Palmada, G. Seebohm, N. Strutz-Seebohm, V. Vallon // *Physiological Reviews*. – 2006. – Vol. 86. – № 4. – P. 1151-1178.

194. Langsenlehner, U. The cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C polymorphism is associated with breast cancer risk. / U. Langsenlehner, B. Yazdani-Biuki, T. Eder, W. Renner, T.C. Wascher, B. Paulweber, W. Weitzer, H. Samonigg, P. Krippel // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2006. – Vol. 12. – № 4. – P. 1392-1394.

195. Lavasani, M.A. Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on “basal-like” carcinoma: A critical review / M.A. Lavasani, F. Moinfar // *Journal of Biophotonics*. – 2012. – Vol. 5. – № 4. – P. 345-366.

196. Lesovaya, E. Discovery of Compound A - a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity / E. Lesovaya, A. Yemelyanov, A.C. Swart, P. Swart, G. Haegeman, I. Budunova // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – № 31. – P. 30730-30744.

197. Lesovaya, E.A. The long winding road to the safer glucocorticoid receptor (GR) targeting therapies / E.A. Lesovaya, D. Chudakova, G. Baida, E.M. Zhidkova, K.I. Kirsanov, M.G. Yakubovskaya, I. V Budunova // *Oncotarget*. – 2022. – Vol. 13. – № 1. – P. 408-424.

198. Lesovaya, E.A. A novel approach to safer glucocorticoid receptor–targeted anti-lymphoma therapy via REDD1 (Regulated in Development and DNA Damage 1) Inhibition / E.A. Lesovaya, A. V Savinkova, O. V Morozova, E.S. Lylova, E.M. Zhidkova, E.P. Kulikov, K.I. Kirsanov, A. Klopot, G. Baida, M.G. Yakubovskaya, L.I. Gordon, B. Readhead, J.T. Dudley, I. Budunova // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2020. – Vol. 19. – № 9. – P. 1898-1908.

199. Lesovaya, E.A. Antitumor effect of non-steroid glucocorticoid receptor ligand CpdA on leukemia cell lines CEM and K562 / E.A. Lesovaya, A.Y. Yemelyanov, K.I. Kirsanov, M.G. Yakubovskaya, I. V Budunova // *Biochemistry (Moscow)*. – 2011. – Vol. 76. – № 11. – P. 1242-1252.

200. Lesuis, S.L. Glucocorticoid and β -adrenergic regulation of hippocampal dendritic spines / S.L. Lesuis, W. Timmermans, P.J. Lucassen, C.C. Hoogenraad, H.J. Krugers // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2020. – Vol. 32. – № 1. – P. e12811-12819
201. Leung, K.W. Non-genomic effects of ginsenoside-Re in endothelial cells via glucocorticoid receptor / K.W. Leung, F.P. Leung, Y. Huang, N.K. Mak, R.N.S. Wong // *FEBS Letters*. – 2007. – Vol. 581. – № 13. – P. 2423-2428.
202. Lewis-Tuffin, L.J. The physiology of human glucocorticoid receptor β (HGR β) and glucocorticoid resistance / L.J. Lewis-Tuffin, J.A. Cidlowski // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 1069. – № 1. – P. 1-9.
203. Li, Y. Vimentin-mediated steroidogenesis induced by phthalate esters: involvement of DNA demethylation and Nuclear Factor κ B / Y. Li, Y. Hu, C. Dong, H. Lu, C. Zhang, Q. Hu, S. Li, H. Qin, Z. Li, Y. Wang // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 1. – P. e0146138-52.
204. Li, Y. Repetitive restraint stress changes spleen immune cell subsets through glucocorticoid receptor or β -adrenergic receptor in a stage dependent manner / Y. Li, W. Jiang, Z. Li, C. Zhang, C. Huang, J. Yang, G. Kong, Z. Li // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 495. – № 1. – P. 1108-1114.
205. Li, Y. Pre-metastatic niche: from revealing the molecular and cellular mechanisms to the clinical applications in breast cancer metastasis / Y. Li, M. Li, K. Su, S. Zong, H. Zhang, L. Xiong // *Theranostics*. – 2023. – Vol. 13. – № 7. – P. 2301-2318.
206. Liao, Y. Growth arrest and apoptosis induction in androgen receptor-positive human breast cancer cells by inhibition of USP14-mediated androgen receptor deubiquitination / Y. Liao, X. Xia, N. Liu, J. Cai, Z. Guo, Y. Li, L. Jiang, Q.P. Dou, D. Tang, H. Huang, J. Liu // *Oncogene*. – 2018. – Vol. 37. – № 14. – P. 1896-1910.
207. Lien, H. Differential expression of glucocorticoid receptor in human breast tissues and related neoplasms / H. Lien, Y. Lu, A. Cheng, W. Chang, Y. Jeng, Y. Kuo, C. Huang, K. Chang, Y. Yao // *The Journal of Pathology*. – 2006. – Vol. 209. – № 3. – P. 317-327.
208. Liu, B. The Effect of Glucocorticoids on Angiogenesis in the Treatment of Solid Tumors. / B. Liu, J.E. Goodwin // *Journal of cellular signaling*. – 2020. – Vol. 1. – № 3. – P. 42-49.
209. Liu, J. Quality of life analyses in a clinical trial of DPPE (tesmilifene) plus doxorubicin versus doxorubicin in patients with advanced or metastatic breast cancer: NCIC CTG Trial MA.19 / J. Liu, D. Tu, J. Dancey, L. Reyno, K.I. Pritchard, J. Pater, L.K. Seymour // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2006. – Vol. 100. – № 3. – P. 263-271.
210. Lock, R. Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion / R. Lock, C.M. Kenific, A.M. Leidal, E. Salas, J. Debnath // *Cancer Discovery*.

– 2014. – Vol. 4. – № 4. – P. 466-479.

211. Low, P.A. Efficacy of midodrine vs placebo in neurogenic orthostatic hypotension / P.A. Low // *JAMA*. – 1997. – Vol. 277. – № 13. – P. 1046-1051.

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

213. Luís, C. Cell-adhesion molecules as key mechanisms of tumor invasion: the case of breast cancer / C. Luís, R. Soares, R. Fernandes, M. Botelho // *Current Molecular Medicine*. – 2023. – Vol. 23. – № 2. – P. 147-160.

214. Luisi, B.F. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA / B.F. Luisi, W.X. Xu, Z. Otwinowski, L.P. Freedman, K.R. Yamamoto, P.B. Sigler // *Nature*. – 1991. – Vol. 352. – № 6335. – P. 497-505.

215. Lylova, E.S. Inhibition of REDD1 expression for the reduction of glucocorticoid-induced side effects / E.S. Lylova, A. V Savinkova, E.M. Zhidkova, K.I. Kirsanov, M.G. Yakubovskaya, I. V Budunova, E.A. Lesovaya // *Siberian journal of oncology*. – 2020. – Vol. 19. – № 6. – P. 73-81.

216. Ma, L. Epidermal growth factor (EGF) and interleukin (IL)-1 β synergistically promote ERK1/2-mediated invasive breast ductal cancer cell migration and invasion / L. Ma, F. Lan, Z. Zheng, F. Xie, L. Wang, W. Liu, J. Han, F. Zheng, Y. Xie, Q. Huang // *Molecular Cancer*. – 2012. – Vol. 11. – № 1. – P. 79-90.

217. Mabuchi, S. Estrogen inhibits paclitaxel-induced apoptosis via the phosphorylation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in human ovarian cancer cell lines / S. Mabuchi, M. Ohmichi, A. Kimura, Y. Nishio, E. Arimoto-Ishida, N. Yada-Hashimoto, K. Tasaka, Y. Murata // *Endocrinology*. – 2004. – Vol. 145. – № 1. – P. 49-58.

218. Majidpoor, J. Steps in metastasis: an updated review / J. Majidpoor, K. Mortezaee // *Medical Oncology*. – 2021. – Vol. 38. – № 1. – P. 3-21.

219. Maksimova, V.P. Aberrations of DNA methylation in cancer / V.P. Maksimova, O.G. Usalka, Y. V Makus, V.G. Popova, E.S. Trapeznikova, G.I. Khayrieva, G.R. Sagitova, E.M. Zhidkova, A.Y. Prus, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov // *Advances in Molecular Oncology*. – 2022. – Vol. 9. – № 4. – P. 24-40.

220. Malanchi, I. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization / I. Malanchi, A. Santamaria-Martínez, E. Susanto, H. Peng, H.-A. Lehr, J.-F. Delaloye, J. Huelsken // *Nature*. – 2012. – Vol. 481. – № 7379. – P. 85-89.

221. Maluf, F.C. Anthracyclines in the treatment of gynecologic malignancies / F.C. Maluf, D. Spriggs // *Gynecologic Oncology*. – 2002. – Vol. 85. – № 1. – P. 18-31.

222. Marchiò, C. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond / C. Marchiò, L. Annaratone, A. Marques, L. Casorzo, E. Berrino, A. Sapino // *Seminars in Cancer Biology*. – 2021. – Vol. 72. – P. 123-135.

223. Martinet, W. Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential / W. Martinet, P. Agostinis, B. Vanhooche, M. Dewaele, G.R.Y. de Meyer // *Clinical Science*. – 2009. – Vol. 116. – № 9. – P. 697-712.

224. Martínez-Sáez, O. Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer / O. Martínez-Sáez, N. Chic, T. Pascual, B. Adamo, M. Vidal, B. González-Farré, E. Sanfeliu, F. Schettini, B. Conte, F. Brasó-Maristany, A. Rodríguez, D. Martínez, P. Galván, A.B. Rodríguez, A. Martínez, M. Muñoz, A. Prat // *Breast Cancer Research*. – 2020. – Vol. 22. – № 1. – P. 45-54.

225. Martinez-Useros, J. Epigenetics of Most Aggressive Solid Tumors: Pathways, Targets and Treatments / J. Martinez-Useros, M. Martin-Galan, M. Florez-Cespedes, J. Garcia-Foncillas // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 13. – P. 3209-3237.

226. Martinez, G.J. Glucocorticoids, their uses, sexual dimorphisms, and diseases: new concepts, mechanisms, and discoveries / G.J. Martinez, M. Appleton, Z.A. Kipp, A.S. Loria, B. Min, T.D. Hinds // *Physiological Reviews*. – 2024. – Vol. 104. – № 1. – P. 473-532.

227. Marvalim, C. Role of p53 in breast cancer progression: An insight into p53 targeted therapy / C. Marvalim, A. Datta, S.C. Lee // *Theranostics*. – 2023. – Vol. 13. – № 4. – P. 1421-1442.

228. Mathe, A. miRNAs and other epigenetic changes as biomarkers in triple negative breast cancer / A. Mathe, R. Scott, K. Avery-Kiejda // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16. – № 12. – P. 28347-28376.

229. Mayayo-Peralta, I. Duality of glucocorticoid action in cancer: tumor-suppressor or oncogene? / I. Mayayo-Peralta, W. Zwart, S. Prekovic // *Endocrine-Related Cancer*. – 2021. – Vol. 28. – № 6. – P. R157-R171.

230. Mazaira, G.I. Corticosteroid receptors as a model for the Hsp90 immunophilin-based transport machinery / G.I. Mazaira, G.P. Pilipuk, M.D. Galigniana // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2021. – Vol. 32. – № 10. – P. 827-838.

231. Maziveyi, M. Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue / M. Maziveyi, S.K. Alahari // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 29. – P. 48471-48487.

232. McDowell, I.C. Glucocorticoid receptor recruits to enhancers and drives activation by motif-directed binding / I.C. McDowell, A. Barrera, A.M. D'Ippolito, C.M. Vockley, L.K. Hong, S.M. Leichter, L.C. Bartelt, W.H. Majoros, L. Song, A. Safi, D.D. Koçak, C.A. Gersbach, A.J. Hartemink, G.E. Crawford, B.E. Engelhardt, T.E. Reddy // *Genome Research*. – 2018. – Vol. 28. – № 9. – P. 1272-1284.

233. Mdwinsky, E.K.R. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents / E.K.R. Mdwinsky // *Annual Review of Medicine*. – 1997. – Vol. 48. – № 1. – P. 353-374.

234. Meijnsing, S.H. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity / S.H. Meijnsing, M.A. Pufall, A.Y. So, D.L. Bates, L. Chen, K.R. Yamamoto // *Science*. – 2009. – Vol. 324. – № 5925. – P. 407-410.

235. Mercader, J. Isopropylnor-synephrine is a stronger lipolytic agent in human adipocytes than synephrine and other amines present in *Citrus aurantium* / J. Mercader, E. Wanecq, J. Chen, C. Carpené // *Journal of Physiology and Biochemistry*. – 2011. – Vol. 67. – № 3. – P. 443-452.

236. Meulen, M. Association between use of systemic and inhaled glucocorticoids and changes in brain volume and white matter microstructure: a cross-sectional study using data from the UK Biobank / M. Meulen, J.M. Amaya, O.M. Dekkers, O.C. Meijer // *BMJ Open*. – 2022. – Vol. 12. – № 8. – P. e062446-60.

237. Meyer, M.-E. Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function / M.-E. Meyer, H. Gronemeyer, B. Turcotte, M.-T. Bocquel, D. Tasset, P. Chambon // *Cell*. – 1989. – Vol. 57. – № 3. – P. 433-442.

238. Minn, A.J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung / A.J. Minn, G.P. Gupta, P.M. Siegel, P.D. Bos, W. Shu, D.D. Giri, A. Viale, A.B. Olshen, W.L. Gerald, J. Massagué // *Nature*. – 2005. – Vol. 436. – № 7050. – P. 518-524.

239. Miranda, T.B. Reprogramming the chromatin landscape: interplay of the estrogen and glucocorticoid receptors at the genomic level / T.B. Miranda, T.C. Voss, M.-H. Sung, S. Baek, S. John, M. Hawkins, L. Grøntved, R.L. Schiltz, G.L. Hager // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73. – № 16. – P. 5130-5139.

240. Miricescu, D. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: from molecular landscape to clinical aspects / D. Miricescu, A. Totan, I.-I. Stanescu-Spinu, S.C. Badoiu, C. Stefani, M. Greabu // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 22. – № 1. – P. 173-197.

241. Mon, N.N. Interleukin-1 β activates focal adhesion kinase and Src to induce matrix metalloproteinase-9 production and invasion of MCF-7 breast cancer cells / N.N. Mon, T. Senga, S. Ito // *Oncology Letters*. – 2017. – Vol. 13. – № 2. – P. 955-960.

242. Moody, S.E. Conditional activation of Neu in the mammary epithelium of transgenic mice results in reversible pulmonary metastasis / S.E. Moody, C.J. Sarkisian, K.T. Hahn, E.J. Gunther, S. Pickup, K.D. Dugan, N. Innocent, R.D. Cardiff, M.D. Schnall, L.A. Chodosh // *Cancer Cell*. – 2002. – Vol. 2. – № 6. – P. 451-461.

243. Moortel, L. Improved glucocorticoid receptor ligands: fantastic beasts, but how to find

them? / L. Moortel, K. Gevaert, K. De Bosscher // *Frontiers in Endocrinology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 559673-84.

244. Mundy, G.R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities / G.R. Mundy // *Nature Reviews Cancer*. – 2002. – Vol. 2. – № 8. – P. 584-593.

245. Murtagh, J. Organization of mammary epithelial cells into 3D acinar structures requires glucocorticoid and JNK signaling / J. Murtagh, E. McArdle, E. Gilligan, L. Thornton, F. Furlong, F. Martin // *The Journal of Cell Biology*. – 2004. – Vol. 166. – № 1. – P. 133-143.

246. Nicolini, A. Cytokines in breast cancer / A. Nicolini, A. Carpi, G. Rossi // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2006. – Vol. 17. – № 5. – P. 325-337.

247. Niemeier, L.A. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation / L.A. Niemeier, D.J. Dabbs, S. Beriwal, J.M. Striebel, R. Bhargava // *Modern Pathology*. – 2010. – Vol. 23. – № 2. – P. 205-212.

248. Oakley, R.H. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids / R.H. Oakley, J.A. Cidlowski // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286. – № 5. – P. 3177-3184.

249. Oakley, R.H. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor β isoform / R.H. Oakley, C.M. Jewell, M.R. Yudt, D.M. Bofetiado, J.A. Cidlowski // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – № 39. – P. 27857-27866.

250. Obeid, E.I. The role of adrenergic signaling in breast cancer biology / E.I. Obeid, S.D. Conzen // *Cancer Biomarkers*. – 2013. – Vol. 13. – № 3. – P. 161-169.

251. Obradović, M.M.S. Glucocorticoids promote breast cancer metastasis / M.M.S. Obradović, B. Hamelin, N. Manevski, J.P. Couto, A. Sethi, M.-M. Coissieux, S. Müntz, R. Okamoto, H. Kohler, A. Schmidt, M. Bentires-Alj // *Nature*. – 2019. – Vol. 567. – № 7749. – P. 540-544.

252. Ogara, M.F. The glucocorticoid receptor interferes with progesterone receptor-dependent genomic regulation in breast cancer cells / M.F. Ogara, S.A. Rodríguez-Seguí, M. Marini, A.S. Nacht, M. Stortz, V. Levi, D.M. Presman, G.P. Vicent, A. Pecci // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47. – № 20. – P. 10645-10661.

253. Oh, T. Genome-Wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer / T. Oh, N. Kim, Y. Moon, M.S. Kim, B.D. Hoehn, C.H. Park, T.S. Kim, N.K. Kim, H.C. Chung, S. An // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2013. – Vol. 15. – № 4. – P. 498-507.

254. Oliveira, A.L. de. The action of p-synephrine on hepatic carbohydrate metabolism and respiration occurs via both Ca²⁺-mobilization and cAMP production / A.L. de Oliveira, J.F. Comar,

A.B. de Sá-Nakanishi, R.M. Peralta, A. Bracht // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2014. – Vol. 388. – № 1-2. – P. 135-147.

255. Oray, M. Long-term side effects of glucocorticoids / M. Oray, K.A. Samra, N. Ebrahimiadib, H. Meese, C.S. Foster // *Expert Opinion on Drug Safety*. – 2016. – Vol. 15. – № 4. – P. 457-465.

256. Osborne, C.K. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer / C.K. Osborne, R. Schiff // *Annual Review of Medicine*. – 2011. – Vol. 62. – № 1. – P. 233-247.

257. Oskarsson, T. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs / T. Oskarsson, S. Acharyya, X.H.-F. Zhang, S. Vanharanta, S.F. Tavazoie, P.G. Morris, R.J. Downey, K. Manova-Todorova, E. Brogi, J. Massagué // *Nature Medicine*. – 2011. – Vol. 17. – № 7. – P. 867-874.

258. Özçelik, B. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids / B. Özçelik, M. Kartal, I. Orhan // *Pharmaceutical Biology*. – 2011. – Vol. 49. – № 4. – P. 396-402.

259. Pahl, H.L. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors / H.L. Pahl // *Oncogene*. – 1999. – Vol. 18. – № 49. – P. 6853-6866.

260. Palmieri, D. Her-2 Overexpression increases the metastatic outgrowth of breast cancer cells in the brain / D. Palmieri, J.L. Bronder, J.M. Herring, T. Yoneda, R.J. Weil, A.M. Stark, R. Kurek, E. Vega-Valle, L. Feigenbaum, D. Halverson, A.O. Vortmeyer, S.M. Steinberg, K. Aldape, P.S. Steeg // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67. – № 9. – P. 4190-4198.

261. Palmieri, D. The biology of metastasis to a sanctuary site / D. Palmieri, A.F. Chambers, B. Felding-Habermann, S. Huang, P.S. Steeg // *Clinical Cancer Research*. – 2007. – Vol. 13. – № 6. – P. 1656-1662.

262. Paltuev, R.M. Prognostic and predictive value of a novel 100-point scale in patients with T1–2N0M0 breast cancer / R.M. Paltuev, A.G. Kudaybergenova, V.F. Semiglazov, A.S. Artemyeva, T.Y. Semiglazova, A. V Komyakhov, O.A. Volynshchikova, V. V Klimenko, M.M. Urezkova // *Tumors of female reproductive system*. – 2023. – Vol. 19. – № 1. – P. 56-68.

263. Palumbo, S. Autophagy and ionizing radiation in tumors: The “survive or not survive” dilemma / S. Palumbo, S. Comincini // *Journal of Cellular Physiology*. – 2013. – Vol. 228. – № 1. – P. 2-8.

264. Pan, D. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer / D. Pan, M. Kocherginsky, S.D. Conzen // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71. – № 20. – P. 6360-6370.

265. Pan, Y. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics / Y. Pan, G. Liu, F.

Zhou, B. Su, Y. Li // *Clinical and Experimental Medicine*. – 2018. – Vol. 18. – № 1. – P. 1-14.

266. Pang, D. Dexamethasone decreases xenograft response to paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis / D. Pang, M. Kocherginsky // *Cancer Biology & Therapy*. – 2006. – Vol. 5. – № 8. – P. 933-940.

267. Pang, J.M. Effects of synthetic glucocorticoids on breast cancer progression / J.M. Pang, Y.-C. Huang, S.-P. Sun, Y.-R. Pan, C.-Y. Shen, M.-C. Kao, R.-H. Wang, L.-H. Wang, K.-T. Lin // *Steroids*. – 2020. – Vol. 164. – P. 108738-108747.

268. Parker, J.S. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes / J.S. Parker, M. Mullins, M.C.U. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu, J.F. Quackenbush, I.J. Stijleman, J. Palazzo, J.S. Marron, A.B. Nobel, E. Mardis, T.O. Nielsen, ... P.S. Bernard // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27. – № 8. – P. 1160-1167.

269. Parzych, K.R. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation / K.R. Parzych, D.J. Klionsky // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2014. – Vol. 20. – № 3. – P. 460-473.

270. Pasculli, B. Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine / B. Pasculli, R. Barbano, P. Parrella // *Seminars in Cancer Biology*. – 2018. – Vol. 51. – P. 22-35.

271. Patras, L. Immune determinants of the pre-metastatic niche / L. Patras, L. Shaashua, I. Matei, D. Lyden // *Cancer Cell*. – 2023. – Vol. 41. – № 3. – P. 546-572.

272. Pavlova, N.P. Modern understanding of risk factors and mechanisms of breast cancer development / N.P. Pavlova, S.S. Dyomin, M.I. Churnosov, I. V Ponomarenko // *Advances in Molecular Oncology*. – 2023. – Vol. 10. – № 3. – P. 15-23.

273. Pecci, A. Choosing the right partner in hormone-dependent gene regulation: Glucocorticoid and progesterone receptors crosstalk in breast cancer cells / A. Pecci, M.F. Ogara, R.T. Sanz, G.P. Vicent // *Frontiers in Endocrinology*. – 2022. – Vol. 13. – P. 1037177-87

274. Peinado, H. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases / H. Peinado, H. Zhang, I.R. Matei, B. Costa-Silva, A. Hoshino, G. Rodrigues, B. Psaila, R.N. Kaplan, J.F. Bromberg, Y. Kang, M.J. Bissell, T.R. Cox, A.J. Giaccia, J.T. Erler, S. Hiratsuka, C.M. Ghajar, D. Lyden // *Nature Reviews Cancer*. – 2017. – Vol. 17. – № 5. – P. 302-317.

275. Peixoto, J.S. Effects of citrus aurantium (bitter orange) fruit extracts and p-synephrine on metabolic fluxes in the rat liver / J.S. Peixoto, J.F. Comar, C.T. Moreira, A.A. Soares, A.L. De Oliveira, A. Bracht, R.M. Peralta // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17. – № 5. – P. 5854-5869.

276. Pereira, R.M.R. Glucocorticoid-induced osteoporosis in rheumatic diseases / R.M.R. Pereira, J.F. de Carvalho, E. Canalis // *Clinics*. – 2010. – Vol. 65. – № 11. – P. 1197-1205.

277. Perkins, N.D. Regulation of NF- κ B by cyclin-dependent kinases associated with the p300 Coactivator / N.D. Perkins, L.K. Felzien, J.C. Betts, K. Leung, D.H. Beach, G.J. Nabel // *Science*. – 1997. – Vol. 275. – № 5299. – P. 523-527.

278. Perou, C.M. Molecular portraits of human breast tumours / C.M. Perou, T. Sørli, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, Ø. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.-L. Børresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – № 6797. – P. 747-752.

279. Petta, I. The interactome of the glucocorticoid receptor and its influence on the actions of glucocorticoids in combatting inflammatory and infectious diseases / I. Petta, L. Dejager, M. Ballegeer, S. Lievens, J. Tavernier, K. De Bosscher, C. Libert // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2016. – Vol. 80. – № 2. – P. 495-522.

280. Piñero, C.P. Adrenergic receptors in breast cancer / C.P. Piñero, E.M. Rivero, L. Gargiulo, M.S. Rodríguez, C.D. Bruque, A. Bruzzone, I.A. Lüthy. – 2022. – P. 37-63.

281. Powrózek, T. Septin 9 promoter region methylation in free circulating DNA—potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report / T. Powrózek, P. Krawczyk, T. Kucharczyk, J. Milanowski // *Medical Oncology*. – 2014. – Vol. 31. – № 4. – P. 917-924.

282. Prat, A. The role of hormonal therapy in the management of hormonal-receptor-positive breast cancer with co-expression of HER2 / A. Prat, J. Baselga // *Nature Clinical Practice Oncology*. – 2008. – Vol. 5. – № 9. – P. 531-542.

283. Prat, A. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists / A. Prat, M.J. Ellis, C.M. Perou // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 9. – № 1. – P. 48-57.

284. Prat, A. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer / A. Prat, J.S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J.I. Herschkowitz, X. He, C.M. Perou // *Breast Cancer Research*. – 2010. – Vol. 12. – № 5. – P. 68-86.

285. Pratt, W.B. Chaperoning of glucocorticoid receptors / W.B. Pratt, Y. Morishima, M. Murphy, M. Harrell // *Molecular Chaperones in Health and Disease*. – Springer-Verlag, . – P. 111-138.

286. Qadir, M.A. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization / M.A. Qadir, B. Kwok, W.H. Dragowska, K.H. To, D. Le, M.B. Bally, S.M. Gorski // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2008. – Vol. 112. – № 3. – P. 389-403.

287. Ramamoorthy, S. Corticosteroids / S. Ramamoorthy, J.A. Cidlowski // *Rheumatic Disease Clinics of North America*. – 2016. – Vol. 42. – № 1. – P. 15-31.

288. Ramamoorthy, S. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance / S. Ramamoorthy, J.A. Cidlowski. – 2013. – P. 41-56.

289. Randall, V.A. Cultured dermal papilla cells from androgen-dependent human hair follicles (e.g. beard) contain more androgen receptors than those from non-balding areas of scalp / V.A. Randall, M.J. Thornton, A.G. Messenger // *Journal of Endocrinology*. – 1992. – Vol. 133. – № 1. – P. 141-147.
290. Ranganathan, S. Significance of twist and iNOS expression in human breast carcinoma / S. Ranganathan, A. Krishnan, N.D. Sivasithambaram // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2016. – Vol. 412. – № 1-2. – P. 41-47.
291. Rao, R. Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells / R. Rao, R. Balusu, W. Fiskus, U. Mudunuru, S. Venkannagari, L. Chauhan, J.E. Smith, S.L. Hembruff, K. Ha, P. Atadja, K.N. Bhalla // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2012. – Vol. 11. – № 4. – P. 973-983.
292. Rauner, M. Effects of the selective glucocorticoid receptor modulator Compound A on bone metabolism and inflammation in male mice with collagen-induced arthritis / M. Rauner, S. Thiele, K. Sinnigen, M. Winzer, J. Salbach-Hirsch, I. Gloe, K. Peschke, G. Haegeman, J.P. Tuckermann, L.C. Hofbauer // *Endocrinology*. – 2013. – Vol. 154. – № 10. – P. 3719-3728.
293. Razavi, P. The genomic landscape of endocrine-resistant advanced breast cancers / P. Razavi, M.T. Chang, G. Xu, C. Bandlamudi, D.S. Ross, N. Vasan, Y. Cai, C.M. Bielski, M.T.A. Donoghue, P. Jonsson, A. Penson, R. Shen, F. Pareja, R. Kundra, S. Middha, M.L. Cheng, A. Zehir, ... J. Baselga // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 34. – № 3. – P. 427-438.
294. Rébé, C. Interleukin-1 β and Cancer / C. Rébé, F. Ghiringhelli // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – № 7. – P. 1791-1822.
295. Reichardt, H.M. Mammary gland development and lactation are controlled by different glucocorticoid receptor activities / H.M. Reichardt, K. Horsch, H.J. Grone, A. Kolbus, H. Beug, N. Hynes, G. Schutz // *European Journal of Endocrinology*. – 2001. – P. 519-527.
296. Reichardt, H.M. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling using the Cre/loxP System / H.M. Reichardt, F. Tronche, A. Bauer, G. Schütz // *Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 381. – № 9-10. – P. 961-964.
297. Ribeiro, S.B. Protective effect of dexamethasone on 5-FU-induced oral mucositis in hamsters / S.B. Ribeiro, A.A. de Araújo, R.F. de Araújo Júnior, G.A. de Castro Brito, R.C. Leitão, M.M. Barbosa, V.B. Garcia, A.C. Medeiros, C.A.C.X. de Medeiros // *PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – № 10. – P. e0186511.
298. Ringnér, M. Nonfamilial breast cancer subtypes / M. Ringnér, J. Staaf, G. Jönsson. – 2013. – Vol. 973. – P. 279-295.
299. Ritter, H.D. The Unliganded glucocorticoid receptor positively regulates the tumor

suppressor gene BRCA1 through GABP Beta / H.D. Ritter, L. Antonova, C.R. Mueller // *Molecular Cancer Research*. – 2012. – Vol. 10. – № 4. – P. 558-569.

300. Ritter, H.D. Expression microarray identifies the unliganded glucocorticoid receptor as a regulator of gene expression in mammary epithelial cells / H.D. Ritter, C.R. Mueller // *BMC Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – № 1. – P. 275-294.

301. Romero, M.A. Role of autophagy in breast cancer development and progression: opposite sides of the same coin / M.A. Romero, O.B. Ekmekcigil, B.G. Bagca, C.B. Avci, U.Y. Sabitaliyevich, T.G. Zhenisovna, A. Aras, A.A. Farooqi. – 2019. – P. 65-73.

302. Ross, D.T. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines / D.T. Ross, C.M. Perou // *Disease Markers*. – 2001. – Vol. 17. – № 2. – P. 99-109.

303. Ruitkamp, J. The role of surgery in metastatic breast cancer / J. Ruitkamp, M.F. Ernst // *European Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 47. – P. S6-S22.

304. Ryu, J. Rapid screening of glucocorticoid receptor (GR) effectors using cortisol-detecting sensor cells / J. Ryu, E. Lee, C. Kang, M. Lee, S. Kim, S. Park, D. Lee, Y. Kwon // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 9. – P. 4747-4759.

305. Sabatier, R. Claudin-low breast cancers: clinical, pathological, molecular and prognostic characterization / R. Sabatier, P. Finetti, A. Guille, J. Adelaide, M. Chaffanet, P. Viens, D. Birnbaum, F. Bertucci // *Molecular Cancer*. – 2014. – Vol. 13. – № 1. – P. 228-242.

306. Sahoo, S. Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer / S. Sahoo, D.R. Brickley, M. Kocherginsky, S.D. Conzen // *European Journal of Cancer*. – 2005. – Vol. 41. – № 17. – P. 2754-2759.

307. Samuels, Y. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells / Y. Samuels, L.A. Diaz, O. Schmidt-Kittler, J.M. Cummins, L. DeLong, I. Cheong, C. Rago, D.L. Huso, C. Lengauer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, V.E. Velculescu // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 7. – № 6. – P. 561-573.

308. Sánchez, A. Gap junction channels of innexins and connexins: relations and computational perspectives / A. Sánchez, C. Castro, D.-L. Flores, E. Gutiérrez, P. Baldi // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 10. – P. 2476-2501.

309. Sarkar, D.K. Role of NF- κ B as a prognostic marker in breast cancer : a pilot study in indian patients / D.K. Sarkar, D. Jana, P.S. Patil, K.S. Chaudhari, B.K. Chattopadhyay, B.R. Chikkala, S. Mandal, P. Chowdhary // *Indian Journal of Surgical Oncology*. – 2013. – Vol. 4. – № 3. – P. 242-247.

310. Sawaya, M.E. Different Levels of 5 α -Reductase Type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia / M.E. Sawaya, V.H. Price // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1997. – Vol. 109. – № 3. – P. 296-300.

311. Schäcke, H. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): Novel ligands with an improved therapeutic index / H. Schäcke, M. Berger, H. Rehwinkel, K. Asadullah // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2007. – Vol. 275. – № 1-2. – P. 109-117.

312. Schäcke, H. SEGRAs: A novel class of anti-inflammatory compounds / H. Schäcke, H. Hennekes, A. Schottelius, S. Jaroch, M. Lehmann, N. Schmees, H. Rehwinkel, K. Asadullah // *Recent Advances in Glucocorticoid Receptor Action*. – Springer Berlin Heidelberg, 2002. – P. 357-371.

313. Schäcke, H. Insight into the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action promotes identification of novel ligands with an improved therapeutic index / H. Schäcke, H. Rehwinkel, K. Asadullah, A.C.B. Cato // *Experimental Dermatology*. – 2006. – Vol. 15. – № 8. – P. 565-573.

314. Schäcke, H. Characterization of ZK 245186, a novel, selective glucocorticoid receptor agonist for the topical treatment of inflammatory skin diseases / H. Schäcke, T.M. Zollner, W.D. Döcke, H. Rehwinkel, S. Jaroch, W. Skuballa, R. Neuhaus, E. May, U. Zügel, K. Asadullah // *British Journal of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 158. – № 4. – P. 1088-1103.

315. Sergeant, C.A. *Sutherlandia frutescens* modulates adrenal hormone biosynthesis, acts as a selective glucocorticoid receptor agonist (SEGRA) and displays anti-mineralocorticoid properties / C.A. Sergeant, D. Africander, P. Swart, A.C. Swart // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2017. – Vol. 202. – P. 290-301.

316. Sevilla, L.M. Glucocorticoid resistance: interference between the glucocorticoid receptor and the MAPK signalling pathways / L.M. Sevilla, A. Jiménez-Panizo, A. Alegre-Martí, E. Estébanez-Perpiñá, C. Caelles, P. Pérez // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 18. – P. 10049-10071.

317. Shakhzadova, A.O. Cancer care to the population of Russia in 2022 / A.O. Shakhzadova, V. V Starinsky, I. V Lisichnikova // *Siberian journal of oncology*. – 2023. – Vol. 22. – № 5. – P. 5-13.

318. Shen, G. Autophagy as a target for glucocorticoid-induced osteoporosis therapy / G. Shen, H. Ren, Q. Shang, T. Qiu, X. Yu, Z. Zhang, J. Huang, W. Zhao, Y. Zhang, D. Liang, X. Jiang // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2018. – Vol. 75. – № 15. – P. 2683-2693.

319. Sher, G. Epigenetic and breast cancer therapy: Promising diagnostic and therapeutic applications / G. Sher, N.A. Salman, A.Q. Khan, K.S. Prabhu, A. Raza, M. Kulinski, S. Dermime, M. Haris, K. Junejo, S. Uddin // *Seminars in Cancer Biology*. – 2022. – Vol. 83. – P. 152-165.

320. Shi, J. Glucocorticoids: Dose-related effects on osteoclast formation and function via

reactive oxygen species and autophagy / J. Shi, L. Wang, H. Zhang, Q. Jie, X. Li, Q. Shi, Q. Huang, B. Gao, Y. Han, K. Guo, J. Liu, L. Yang, Z. Luo // *Bone*. – 2015. – Vol. 79. – P. 222-232.

321. Shi, Q. Identification of anti-asthmatic compounds in *Pericarpium citri reticulatae* and evaluation of their synergistic effects / Q. Shi, Z. Liu, Y. Yang, P. Geng, Y. Zhu, Q. Zhang, F. Bai, G. Bai // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2009. – Vol. 30. – № 5. – P. 567-575.

322. Shi, Y. Epigenetic regulation of autophagy beyond the cytoplasm: a review / Y. Shi, H.-M. Shen, V. Gopalakrishnan, N. Gordon // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 675599-67561.

323. Shimba, A. Glucocorticoids regulate circadian rhythm of innate and adaptive immunity / A. Shimba, K. Ikuta // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 2143-2151.

324. Shirman, Y. HER2-Low breast cancer: current landscape and future prospects / Y. Shirman, S. Lubovsky, A. Shai // *Breast Cancer: Targets and Therapy*. – 2023. – Vol. Volume 15. – P. 605-616.

325. Silva, D. Contribution of adrenergic mechanisms for the stress-induced breast cancer carcinogenesis / D. Silva, C. Quintas, J. Gonçalves, P. Fresco // *Journal of Cellular Physiology*. – 2022. – Vol. 237. – № 4. – P. 2107-2127.

326. Simos, D. Bone-targeted agents for the management of breast cancer patients with bone metastases / D. Simos, C. Addison, I. Kuchuk, B. Hutton, S. Mazzarello, M. Clemons // *Journal of Clinical Medicine*. – 2013. – Vol. 2. – № 3. – P. 67-88.

327. Skor, M.N. Glucocorticoid Receptor Antagonism as a Novel Therapy for Triple-Negative Breast Cancer / M.N. Skor, E.L. Wonder, M. Kocherginsky, A. Goyal, B.A. Hall, Y. Cai, S.D. Conzen // *Clinical Cancer Research*. – 2013. – Vol. 19. – № 22. – P. 6163-6172.

328. Smart, J.A. Cell adhesion molecules in plasticity and metastasis / J.A. Smart, J.E. Oleksak, E.J. Hartsough // *Molecular Cancer Research*. – 2021. – Vol. 19. – № 1. – P. 25-37.

329. Smid, M. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse / M. Smid, Y. Wang, Y. Zhang, A.M. Sieuwerts, J. Yu, J.G.M. Klijn, J.A. Foekens, J.W.M. Martens // *Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68. – № 9. – P. 3108-3114.

330. Sofer, A. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1 / A. Sofer, K. Lei, C.M. Johannessen, L.W. Ellisen // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25. – № 14. – P. 5834-5845.

331. Sommer, E.M. Elevated SGK1 predicts resistance of breast cancer cells to Akt inhibitors / E.M. Sommer, H. Dry, D. Cross, S. Guichard, B.R. Davies, D.R. Alessi // *Biochemical Journal*. – 2013. – Vol. 452. – № 3. – P. 499-508.

332. Song, D. The potential of activator protein 1 (AP-1) in cancer targeted therapy / D. Song,

Y. Lian, L. Zhang // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1224892-102.

333. Song, I.-H. New glucocorticoids on the horizon: repress, don't activate! / I.-H. Song, R. Gold, R.H. Straub, G.-R. Burmester, F. Buttgerit // *The Journal of rheumatology*. – 2005. – Vol. 32. – № 6. – P. 1199-1207.

334. Sørlie, T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / T. Sørlie, C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. Van De Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P.E. Lønning, A.L. Børresen-Dale // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98. – № 19. – P. 10869-10874.

335. Spinelli, S.L. Mapracorat, a selective glucocorticoid receptor agonist, upregulates RelB, an anti-inflammatory nuclear factor-kappaB protein, in human ocular cells / S.L. Spinelli, X. Xi, D.H. McMillan, C.F. Woeller, M.E. Richardson, M.E. Cavet, J.-Z. Zhang, S.E. Feldon, R.P. Phipps // *Experimental Eye Research*. – 2014. – Vol. 127. – P. 290-298.

336. Stahn, C. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists / C. Stahn, M. Löwenberg, D.W. Hommes, F. Buttgerit // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2007. – Vol. 275. – № 1-2. – P. 71-78.

337. Stechschulte, L.A. Glucocorticoid receptor β Stimulates Akt1 growth pathway by attenuation of PTEN / L.A. Stechschulte, L. Wuescher, J.S. Marino, J.W. Hill, C. Eng, T.D. Hinds // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 289. – № 25. – P. 17885-17894.

338. Stephan, S. Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer / S. Stephan, K. Datta, E. Wang, J. Li, R.A. Brekken, S. Parangi, P.E. Thorpe, D. Mukhopadhyay // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – Vol. 10. – № 20. – P. 6993-7000.

339. Stock, T. Improved disease activity with fosdagrocorat (PF-04171327), a partial agonist of the glucocorticoid receptor, in patients with rheumatoid arthritis: a Phase 2 randomized study / T. Stock, D. Fleishaker, X. Wang, A. Mukherjee, C. Mebus // *International Journal of Rheumatic Diseases*. – 2017. – Vol. 20. – № 8. – P. 960-970.

340. Stohs, S. A Review of the safety and efficacy of citrus aurantium in weight management / S. Stohs, M. Shara // *Obesity*. – CRC Press, 2007. – P. 371-382.

341. Stohs, S.J. Stereochemical and pharmacological differences between naturally occurring p-syneprine and synthetic p-syneprine / S.J. Stohs, H.G. Preuss // *Journal of Functional Foods*. – 2012. – Vol. 4. – № 1. – P. 2-5.

342. Stohs, S.J. Effects of p -Synephrine alone and in combination with selected bioflavonoids on resting metabolism, blood pressure, heart rate and self-reported mood changes / S.J. Stohs, H.G.

Preuss, S.C. Keith, P.L. Keith, H. Miller, G.R. Kaats // *International Journal of Medical Sciences*. – 2011. – Vol. 8. – № 4. – P. 295-301.

343. Stohs, S.J. A Review of the receptor-binding properties of p -synephrine as related to its pharmacological effects / S.J. Stohs, H.G. Preuss, M. Shara // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-9.

344. Stohs, S.J. The Safety of Citrus aurantium (Bitter Orange) and its primary protoalkaloid p-synephrine / S.J. Stohs, H.G. Preuss, M. Shara // *Phytotherapy Research*. – 2011. – Vol. 25. – № 10. – P. 1421-1428.

345. Sui, M. Glucocorticoids interfere with therapeutic efficacy of paclitaxel against human breast and ovarian xenograft tumors / M. Sui, F. Chen, Z. Chen, W. Fan // *International Journal of Cancer*. – 2006. – Vol. 119. – № 3. – P. 712-717.

346. Sumikawa, T. Dexamethasone interferes with trastuzumab-induced cell growth inhibition through restoration of AKT activity in BT-474 breast cancer cells. / T. Sumikawa, Y. Shigeoka, T. Igishi, H. Suyama, A. Yamasaki, K. Hashimoto, S. Matsumoto, K. Takeda, Y. Ueda, E. Shimizu // *International journal of oncology*. – 2008. – Vol. 32. – № 3. – P. 683-688.

347. Suva, L.J. Mechanisms of bone metastases of breast cancer / L.J. Suva, R.J. Griffin, I. Makhoul // *Endocrine-Related Cancer*. – 2009. – Vol. 16. – № 3. – P. 703-713.

348. Swain, S.M. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions / S.M. Swain, M. Shastry, E. Hamilton // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2023. – Vol. 22. – № 2. – P. 101-126.

349. Swart, P. Biological activities of the shrub *Salsola tuberculiformis* Botsch.: Contraceptive or stress alleviator? / P. Swart, A.C. Swart, A. Louw, K.J. van der Merwe // *BioEssays*. – 2003. – Vol. 25. – № 6. – P. 612-619.

350. Tabariès, S. Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes / S. Tabariès, Z. Dong, M.G. Annis, A. Omeroglu, F. Pepin, V. Ouellet, C. Russo, M. Hassanain, P. Metrakos, Z. Diaz, M. Basik, N. Bertos, M. Park, C. Guettier, R. Adam, M. Hallett, P.M. Siegel // *Oncogene*. – 2011. – Vol. 30. – № 11. – P. 1318-1328.

351. Takeda, K. Expression and distribution of glucocorticoid receptor isoforms in eosinophilic chronic rhinosinusitis / K. Takeda, S. Takeno, K. Hirakawa, T. Ishino // *Auris Nasus Larynx*. – 2010. – Vol. 37. – № 6. – P. 700-707.

352. Tanner, T.M. Anti-androgenic properties of Compound A, an analog of a non-steroidal plant compound / T.M. Tanner, G. Verrijdt, W. Rombauts, A. Louw, J.P. Hapgood, F. Claessens // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2003. – Vol. 201. – № 1-2. – P. 155-164.

353. Tarantino, P. HER2-Low breast cancer: Pathological and clinical landscape / P. Tarantino, E. Hamilton, S.M. Tolane, J. Cortes, S. Morganti, E. Ferraro, A. Marra, G. Viale, D. Trapani, F. Cardoso, F. Penault-Llorca, G. Viale, F. Andrè, G. Curigliano // *Journal of Clinical Oncology*. – 2020. – Vol. 38. – № 17. – P. 1951-1962.
354. Teleki, I. Correlations of differentially expressed gap junction connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with breast cancer progression and prognosis / I. Teleki, A.M. Szasz, M.E. Maros, B. Gyorffy, J. Kulka, N. Meggyeshazi, G. Kiszner, P. Balla, A. Samu, T. Krenacs // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 11. – P. e112541.
355. Terranova-Barberio, M. Exhausted T cell signature predicts immunotherapy response in ER-positive breast cancer / M. Terranova-Barberio, N. Pawlowska, M. Dhawan, M. Moasser, A.J. Chien, M.E. Melisko, H. Rugo, R. Rahimi, T. Deal, A. Daud, M.D. Rosenblum, S. Thomas, P.N. Munster // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 3584-3594.
356. Terranova-Barberio, M. HDAC inhibition potentiates immunotherapy in triple negative breast cancer / M. Terranova-Barberio, S. Thomas, N. Ali, N. Pawlowska, J. Park, G. Krings, M.D. Rosenblum, A. Budillon, P.N. Munster // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8. – № 69. – P. 114156-114172.
357. Timmermans, S. A general introduction to glucocorticoid biology / S. Timmermans, J. Souffriau, C. Libert // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1545-1562.
358. Todorović-Raković, N. Interleukin-8 in breast cancer progression / N. Todorović-Raković, J. Milovanović // *Journal of Interferon & Cytokine Research*. – 2013. – Vol. 33. – № 10. – P. 563-570.
359. Tseng, L.M. Distant metastasis in triple-negative breast cancer / L.M. Tseng, N.C. Hsu, S.C. Chen, Y.S. Lu, C.H. Lin, D.Y. Chang, H. Li, Y.C. Lin, H.K. Chang, T.C. Chao, F. Ouyang, M.F. Hou // *Neoplasma*. – 2013. – Vol. 60. – № 03. – P. 290-294.
360. Ungerleider, N.A. Breast cancer survival predicted by TP53 mutation status differs markedly depending on treatment / N.A. Ungerleider, S.G. Rao, A. Shahbandi, D. Yee, T. Niu, W.D. Frey, J.G. Jackson // *Breast Cancer Research*. – 2018. – Vol. 20. – № 1. – P. 115-123.
361. Vaidya, J.S. Role of Glucocorticoids in Breast Cancer / J.S. Vaidya, G. Baldassarre, M.A. Thorat, S. Massarut // *Current Pharmaceutical Design*. – 2010. – Vol. 16. – № 32. – P. 3593-3600.
362. Valente, I.V.B. The anti-proliferative effects of a frankincense extract in a window of opportunity phase in clinical trial for patients with breast cancer / I.V.B. Valente, D. Garcia, A. Abbott, L. Spruill, J. Siegel, J. Forcucci, G. Hanna, R. Mukherjee, M. Hamann, E. Hilliard, M. Lockett, D.J. Cole, N. Klauber-DeMore // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2024. – Vol. 204. – № 3. – P. 521-530.
363. Vasconcelos, I. The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease

free survival / I. Vasconcelos, A. Hussainzada, S. Berger, E. Fietze, J. Linke, F. Siedentopf, W. Schoenegg // *The Breast*. – 2016. – Vol. 29. – P. 181-185.

364. Vayssière, B.M. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity *in vivo* / B.M. Vayssière, S. Dupont, A. Choquart, F. Petit, T. Garcia, C. Marchandeu, H. Gronemeyer, M. Resche-Rigon // *Molecular Endocrinology*. – 1997. – Vol. 11. – № 9. – P. 1245-1255.

365. Vega-Rubín-de-Celis, S. The role of beclin 1-dependent autophagy in cancer / S. Vega-Rubín-de-Celis // *Biology*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 4-17.

366. Veneris, J.T. Glucocorticoid receptor expression is associated with inferior overall survival independent of BRCA mutation status in ovarian cancer / J.T. Veneris, L. Huang, J.E. Churpek, S.D. Conzen, G.F. Fleming // *International Journal of Gynecologic Cancer*. – 2019. – Vol. 29. – № 2. – P. 357-364.

367. Verschaeve, L. Mutagenicity of ethyleneimine / M. Kirsch-Volders // *Mutat Res*. – 1990. – Vol. 238. – № 1. – P. 39-55.

368. Vilasco, M. Glucocorticoid receptor and breast cancer / M. Vilasco, L. Communal, N. Mourra, A. Courtin, P. Forgez, A. Gompel // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2011. – Vol. 130. – № 1. – P. 1-10.

369. Virani, S. The impact of dietary unsaturated fat or the mediterranean diet on women diagnosed with breast cancer: a systematic review / S. Virani, S. Afreen, A. Perthiani, E. Sangster, N. Lanka, P. Acharya, A.K. Yu // *Cureus*. – 2024. – Vol. 16. – № 7. – P. 65362-65376.

370. Volden, P.A. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression / P.A. Volden, S.D. Conzen // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2013. – Vol. 30. – P. S26-S31.

371. Voss, T.C. Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism / T.C. Voss, R.L. Schiltz, M.-H. Sung, P.M. Yen, J.A. Stamatoyannopoulos, S.C. Biddie, T.A. Johnson, T.B. Miranda, S. John, G.L. Hager // *Cell*. – 2011. – Vol. 146. – № 4. – P. 544-554.

372. Wan, Y. Overlapping but distinct gene regulation profiles by glucocorticoids and progestins in human breast cancer cells / Y. Wan, S.K. Nordeen // *Molecular Endocrinology*. – 2002. – Vol. 16. – № 6. – P. 1204-1214.

373. Wang, M. Exosomal proteins: Key players mediating pre-metastatic niche formation and clinical implications (Review) / M. Wang, X. Zhao, F. Huang, L. Wang, J. Huang, Z. Gong, W. Yu // *International Journal of Oncology*. – 2021. – Vol. 58. – № 4. – P. 4-16.

374. Wang, Y. Curcumin in treating breast cancer: a review / Y. Wang, J. Yu, R. Cui, J. Lin, X. Ding // *SLAS Technology*. – 2016. – Vol. 21. – № 6. – P. 723-731.

375. Wang, Y. Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway / Y. Wang, H. Zhang. – 2019. – № 1206. – P. 67-83.

376. Wang, Z. Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor *in vivo* / Z. Wang, J. Frederick, M.J. Garabedian // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 29. – P. 26573-26580.

377. Watkins, J.L. Clinical impact of selective and nonselective beta-blockers on survival in patients with ovarian cancer / J.L. Watkins, P.H. Thaker, A.M. Nick, L.M. Ramondetta, S. Kumar, D.L. Urbauer, K. Matsuo, K.C. Squires, R.L. Coleman, S.K. Lutgendorf, P.T. Ramirez, A.K. Sood // *Cancer*. – 2015. – Vol. 121. – № 19. – P. 3444-3451.

378. Webster, J.C. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative β isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance / J.C. Webster, R.H. Oakley, C.M. Jewell, J.A. Cidlowski // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98. – № 12. – P. 6865-6870.

379. Weigel, N.L. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions / N.L. Weigel, N.L. Moore // *Molecular Endocrinology*. – 2007. – Vol. 21. – № 10. – P. 2311-2319.

380. Weikum, E.R. Tethering not required: the glucocorticoid receptor binds directly to activator protein-1 recognition motifs to repress inflammatory genes / E.R. Weikum, I.M.S. de Vera, J.C. Nwachukwu, W.H. Hudson, K.W. Nettles, D.J. Kojetin, E.A. Ortlund // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45. – № 14. – P. 8596-8608.

381. Weilbaecher, K.N. Cancer to bone: a fatal attraction / K.N. Weilbaecher, T.A. Guise, L.K. McCauley // *Nature Reviews Cancer*. – 2011. – Vol. 11. – № 6. – P. 411-425.

382. West, D.C. Discovery of a glucocorticoid Receptor (GR) activity signature using selective GR antagonism in ER-negative breast cancer / D.C. West, M. Kocherginsky, E.Y. Tonsing-Carter, D.N. Dolcen, D.J. Hosfield, R.R. Lastra, J.P. Sinnwell, K.J. Thompson, K.R. Bowie, R. V Harkless, M.N. Skor, C.F. Pierce, S.C. Styke, C.R. Kim, L. de Wet, G.L. Greene, J.C. Boughey, S.D. Conzen // *Clinical Cancer Research*. – 2018. – Vol. 24. – № 14. – P. 3433-3446.

383. West, D.C. GR and ER coactivation alters the expression of differentiation genes and associates with improved ER+ breast cancer outcome / D.C. West, D. Pan, E.Y. Tonsing-Carter, K.M. Hernandez, C.F. Pierce, S.C. Styke, K.R. Bowie, T.I. Garcia, M. Kocherginsky, S.D. Conzen // *Molecular Cancer Research*. – 2016. – Vol. 14. – № 8. – P. 707-719.

384. White, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer / E. White // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 6. – P. 401-410.

385. Wibbe, N. Cell adhesion at the tight junctions: new aspects and new functions / N. Wibbe, K. Ebnet // *Cells*. – 2023. – Vol. 12. – № 23. – P. 2701-2714.

386. Wiechmann, T. Identification of dynamic glucocorticoid-induced methylation changes at the FKBP5 locus / T. Wiechmann, S. Röh, S. Sauer, D. Czamara, J. Arloth, M. Ködel, M. Beintner, L. Knop, A. Menke, E.B. Binder, N. Provençal // *Clinical Epigenetics*. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 83-97.

387. Wijetunga, N.A. Novel epigenetic changes in CDKN2A are associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia / N.A. Wijetunga, T.J. Belbin, R.D. Burk, K. Whitney, M. Abadi, J.M. Greally, M.H. Einstein, N.F. Schlecht // *Gynecologic Oncology*. – 2016. – Vol. 142. – № 3. – P. 566-573.

388. Winters, S. Breast cancer epidemiology, prevention, and screening / S. Winters, C. Martin, D. Murphy, N.K. Shokar. – 2017. – P. 1-32.

389. Witzel, I. Breast cancer brain metastases: biology and new clinical perspectives / I. Witzel, L. Oliveira-Ferrer, K. Pantel, V. Müller, H. Wikman // *Breast Cancer Research*. – 2016. – Vol. 18. – № 1. – P. 8-17.

390. Wozniak, M.A. Focal adhesion regulation of cell behavior / M.A. Wozniak, K. Modzelewska, L. Kwong, P.J. Keely // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2004. – Vol. 1692. – № 2-3. – P. 103-119.

391. Wu, M. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease / M. Wu, G. Chen, Y.-P. Li // *Bone Research*. – 2016. – Vol. 4. – № 1. – P. 16009-16030.

392. Wu, Q. p-Synephrine suppresses lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibition of the NF- κ B signaling pathway / Q. Wu, R. Li, L.W. Soromou, N. Chen, X. Yuan, G. Sun, B. Li, H. Feng // *Inflammation Research*. – 2014. – Vol. 63. – № 6. – P. 429-439.

393. Wu, W. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells / W. Wu, S. Chaudhuri, D.R. Brickley, D. Pang, T. Karrison, S.D. Conzen // *Cancer Research*. – 2004. – Vol. 64. – № 5. – P. 1757-1764.

394. Wu, Y. Tamoxifen resistance in breast cancer is regulated by the EZH2-ER α -GREB1 Transcriptional Axis / Y. Wu, Z. Zhang, M.E. Cenciarini, C.J. Proietti, M. Amasino, T. Hong, M. Yang, Y. Liao, H.-C. Chiang, V.G. Kaklamani, R. Jeselsohn, R.K. Vadlamudi, T.H.-M. Huang, R. Li, C. De Angelis, X. Fu, P. V Elizalde, K. Xu // *Cancer Research*. – 2018. – Vol. 78. – № 3. – P. 671-684.

395. Wüst, S. Therapeutic and adverse effects of a non-steroidal glucocorticoid receptor ligand in a mouse model of multiple sclerosis / S. Wüst, D. Tischner, M. John, J.P. Tuckermann, C.

Menzfeld, U.-K. Hanisch, J. van den Brandt, F. Lühder, H.M. Reichardt // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4. – № 12. – P. e8202.

396. Xing, K. Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: an insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy / K. Xing, B. Gu, P. Zhang, X. Wu // BMC Immunology. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 39-48.

397. Xu, W.W. Synephrine hydrochloride suppresses esophageal cancer tumor growth and metastatic potential through inhibition of Galectin-3-AKT/ERK Signaling / W.W. Xu, C.-C. Zheng, Y.-N. Huang, W.-Y. Chen, Q.-S. Yang, J.-Y. Ren, Y.-M. Wang, Q.-Y. He, H.-X. Liao, B. Li // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2018. – Vol. 66. – № 35. – P. 9248-9258.

398. Yang, F. Glucocorticoid receptor: megatrans switching mediates the repression of an ER α -regulated transcriptional program / F. Yang, Q. Ma, Z. Liu, W. Li, Y. Tan, C. Jin, W. Ma, Y. Hu, J. Shen, K.A. Ohgi, F. Telese, W. Liu, M.G. Rosenfeld // Molecular Cell. – 2017. – Vol. 66. – № 3. – P. 321-331.

399. Yao, C. Role of interleukin-8 in the progression of estrogen receptor-negative breast cancer / C. Yao, Y. Lin, C. Ye, J. Bi, Y. Zhu, S. Wang // Chinese medical journal. – 2007. – Vol. 120. – № 20. – P. 1766-1772.

400. Yeeravalli, R. Molecular mediators of breast cancer metastasis / R. Yeeravalli, A. Das // Hematology / Oncology and Stem Cell Therapy. – 2021. – Vol. 14. – № 4. – P. 275-289.

401. Yemelyanov, A. Novel steroid receptor phyto-modulator Compound A inhibits growth and survival of prostate cancer cells / A. Yemelyanov, J. Czwornog, L. Gera, S. Joshi, R.T. Chatterton, I. Budunova // Cancer Research. – 2008. – Vol. 68. – № 12. – P. 4763-4773.

402. Yoshioka, Y. 4-Hydroxyderricin and xanthoangelol isolated from *Angelica keiskei* prevent dexamethasone-induced muscle loss / Y. Yoshioka, Y. Samukawa, Y. Yamashita, H. Ashida // Food & Function. – 2020. – Vol. 11. – № 6. – P. 5498-5512.

403. Yu, Q. MLLT6/ATF2 axis restrains breast cancer progression by driving DDIT3/4 expression / Q. Yu, J. Zhao, A. Yang, X. Li // Molecular Cancer Research. – 2024. – Vol. 22. – № 9. – P. 796-811.

404. Yudt, M.R. Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta / M.R. Yudt, C.M. Jewell, R.J. Bienstock, J.A. Cidlowski // Molecular and Cellular Biology. – 2003. – Vol. 23. – № 12. – P. 4319-4330.

405. Yun, C.W. The roles of autophagy in cancer / C.W. Yun, S.H. Lee // International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – Vol. 19. – № 11. – P. 3466-3484.

406. Zannas, A.S. Epigenetic programming by stress and glucocorticoids along the human lifespan / A.S. Zannas, G.P. Chrousos // Molecular Psychiatry. – 2017. – Vol. 22. – № 5. – P. 640-646.

407. Zaret, K.S. Reversible and persistent changes in chromatin structure accompany activation of a glucocorticoid-dependent enhancer element / K.S. Zaret, K.R. Yamamoto // *Cell*. – 1984. – Vol. 38. – № 1. – P. 29-38.

408. Zeyen, L. Crosstalk between p38 MAPK and GR signaling / L. Zeyen, O.M. Seternes, I. Mikkola // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 6. – P. 3322-3333.

409. Zhang, C. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma / C. Zhang, B. Beckermann, G. Kallifatidis, Z. Liu, W. Rittgen, L. Edler, P. Büchler, K.-M. Debatin, M.W. Büchler, H. Friess, I. Herr // *International journal of oncology*. – 2006. – Vol. 29. – № 5. – P. 1295-1301.

410. Zhang, Y. Dexamethasone enhances the lung metastasis of breast cancer via a PI3K-SGK1-CTGF pathway / Y. Zhang, G. Shi, H. Zhang, Q. Xiong, F. Cheng, H. Wang, J. Luo, Y. Zhang, P. Shi, J. Xu, J. Fu, N. Chen, L. Cheng, Y. Li, L. Dai, Y. Yang, D. Yu, H. Deng // *Oncogene*. – 2021. – Vol. 40. – № 35. – P. 5367-5378.

411. Zhang, Z. Serum- and Glucocorticoid-inducible Kinase 1 is essential for osteoclastogenesis and promotes breast cancer bone metastasis / Z. Zhang, Q. Xu, C. Song, B. Mi, H. Zhang, H. Kang, H. Liu, Y. Sun, J. Wang, Z. Lei, H. Guan, F. Li // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2020. – Vol. 19. – № 2. – P. 650-660.

412. Zhao, S.-Q. Anti-inflammatory effect of external use of escin on cutaneous inflammation: possible involvement of glucocorticoids receptor / S.-Q. Zhao, S.-Q. Xu, J. Cheng, X.-L. Cao, Y. Zhang, W.-P. Zhou, Y.-J. Huang, J. Wang, X.-M. HU // *Chinese Journal of Natural Medicines*. – 2018. – Vol. 16. – № 2. – P. 105-112.

413. Zhidkova, E.M. *In vitro* screening of effectiveness and antiproliferative effects of potential DDIT4 inhibitors for breast cancer cell lines / E.M. Zhidkova, D.D. Grigoreva, E.S. Lylova, V.P. Maksimova, G.R. Sagitova, G.I. Khayrieva, E.S. Trapeznikova, K.I. Kirsanov, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *Siberian journal of oncology*. – 2022. – Vol. 21. – № 3. – P. 50-60.

414. Zhidkova, E.M. Comparative analysis of biological effects of selective activator of the glucocorticoid receptor CpdA on different subtypes of breast cancer cell lines / E.M. Zhidkova, K.A. Kuzin, L.R. Tilova, A. V Savinkova, O.I. Borisova, M.D. Lavrova, V.P. Maximova, K.I. Kirsanov, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *Siberian journal of oncology*. – 2017. – Vol. 16. – № 6. – P. 41-46.

415. Zhidkova, E.M. Nutritional sensor REDD1 in cancer and inflammation: friend or foe? / E.M. Zhidkova, E.S. Lylova, D.D. Grigoreva, K.I. Kirsanov, A. V Osipova, E.P. Kulikov, S.A. Mertsalov, G.A. Belitsky, I. Budunova, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 17. – P. 9686-9693.

416. Zhidkova, E.M. A Brief Overview of the paradoxical role of glucocorticoids in breast cancer / E.M. Zhidkova, E.S. Lylova, A. V Savinkova, S.A. Mertsalov, K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya // *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. – 2020. – Vol. 14. – P. 117822342097466-117822342097472.

417. 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. 8904-8928.