

# ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ЭНАНТИОМЕРОВ CPdA *IN VITRO* НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

А.В. Савинкова<sup>1</sup>, Л.Р. Тилова<sup>1</sup>, О.И. Борисова<sup>1</sup>, Е.М. Жидкова<sup>1,2</sup>, К.А. Кузин<sup>1</sup>, К.И. Кирсанов<sup>1</sup>,  
Г.А. Белицкий<sup>1</sup>, И.В. Будунова<sup>3</sup>, М.Г. Якубовская<sup>1</sup>, Е.А. Лесовая<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24, стр. 15;

<sup>2</sup>Московский технологический университет; Россия, 119454 Москва, пр-т Вернадского, 78;

<sup>3</sup>Северо-Западный университет; США, 60611 Чикаго, авеню Ист-Чикаго, 303;

<sup>4</sup>Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольтная, 9

**Контакты:** Екатерина Андреевна Лесовая lesovenok@yandex.ru

**Введение.** Глюкокортикоиды являются важным компонентом химиотерапии гемобластозов. Терапевтическое действие глюкокортикоидов реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR) по механизму транс-репрессии, развитие побочных эффектов связано с транс-активацией. Ранее было показано, что соединение класса селективных агонистов GR, CpdA, селективно запускает транс-репрессию в клетках лейкоза. CpdA представляет собой смесь 2 энантиомеров, которые могут по-разному взаимодействовать с рецептором.

**Цель исследования** – синтез энантиомеров CpdA и оценка их биологических свойств.

**Материалы и методы.** Синтез энантиомеров был осуществлен на основании дигидроксилирования алкенов по Шарплессу; противоопухолевую активность *in vitro* определяли по антипролиферативному и проапоптотическому эффекту. Лигандные свойства оценивали путем ПЦР-анализа экспрессии глюкокортикоид- и NF-κB-зависимых генов.

**Результаты и выводы.** Протемонстрировано, что энантиомеры CpdA обладают противоопухолевым действием *in vitro*, а также не вызывают запуска транс-активации. Более того, S-энантиомер CpdA является более перспективным кандидатом для дальнейших исследований *in vivo*.

**Ключевые слова:** глюкокортикоидный рецептор, энантиомеры, гемобластозы, транс-активация, транс-репрессия, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-61-69

## ANTI-TUMOR EFFECT OF CPdA ENANTIOMERS *IN VITRO* IN THE MODEL OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

A.V. Savinkova<sup>1</sup>, L.R. Tilova<sup>1</sup>, O.I. Borisova<sup>1</sup>, E.M. Zhidkova<sup>1,2</sup>, K.A. Kuzin<sup>1</sup>, K.I. Kirsanov<sup>1</sup>, G.A. Belitsky<sup>1</sup>, I.V. Budunova<sup>3</sup>,  
M.G. Yakubovskaya<sup>1</sup>, E.A. Lesovaya<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; bld. 15, 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia;

<sup>2</sup>Moscow Technological University; 78 Vernadsky av., Moscow 119454, Russia;

<sup>3</sup>Northwestern University; 303 East Chicago av., Chicago 60611, USA;

<sup>4</sup>Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov; 9 Vysokovoltynaya St., Ryazan 390026, Russia

**Introduction.** Glucocorticoids are the important component of combined chemotherapy of blood cancer. Therapeutic effects of glucocorticoids is realized via activation of glucocorticoid receptor transrepression, the development of side effects is associated with transactivation. We demonstrated earlier that compound belonging the class of selective glucocorticoid receptor agonists, CpdA, selectively induced transrepression in blood cancer cells. CpdA represents a mixture of two enantiomers, which can differ in interaction with the receptor.

**Aim.** The main aim of present study was to synthesize CpdA enantiomers and to evaluate their biological properties.

**Materials and methods.** Synthesis was carried out based on Sharpless dihydroxylation; anti-tumor activity *in vitro* was evaluated by antiproliferative and pro-apoptotic effects. Ligand properties were estimated by PCR-analysis of glucocorticoid- and NF-κB-dependent genes expression.

**Results and conclusions.** We demonstrated that CpdA enantiomers revealed anti-tumor activity *in vitro* and did not induce transactivation. Moreover, S-enantiomer of CpdA in the most tests demonstrated more pronounced activity and is more perspective molecule for future studies *in vivo*.

**Key words:** glucocorticoid receptor, enantiomers, hemoblastosis, transactivation, transrepression, anti-tumor activity

### Введение

Глюкокортикоиды являются важнейшим компонентом терапии ряда заболеваний, в том числе полихимиотерапии лейкозов у детей [1–7]. Однако их применение сильно ограничено развитием резистентности, а также ряда серьезных метаболических осложнений, в частности остеопороза, стероидного диабета, нарушений водно-солевого обмена и др. [4, 5, 8–10]. Терапевтическое действие глюкокортикоидов в основном реализуется через ДНК-независимую транс-репрессию – белок-белковое взаимодействие GR с факторами транскрипции, что ингибирует активность данных факторов и приводит к снижению жизнеспособности опухолевых клеток [11–13]. Развитие побочных эффектов связано с запуском трансактивационного механизма, при котором рецептор образует димер, транслоцируется в ядро и связывается с палиндромными последовательностями глюкокортикоид-рецептивных элементов в промоторах антиапоптотических, пролиферативных и провоспалительных генов, что приводит к усилению их транскрипции (рис. 1а) [14–16].

Использование селективных агонистов GR (SEGRA), которые, в отличие от глюкокортикоидов, не приводят к образованию димерного комплекса рецептора и, соответственно, запускают лишь транс-репрессорные механизмы, снижая тем самым вероятность развития побочных эффектов (рис. 1б), является перспективным направлением в гормональной терапии и химиотерапии гемобластозов. К классу SEGRA относится соединение растительного происхождения 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид, или CpдA (рис. 2б). GR-зависимый противоопухолевый эффект CpдA на моделях гемобластозов *in vitro* и *in vivo* был продемонстрирован ранее в отделе химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [17, 18]. Однако CpдA представляет собой рацемическую смесь из 2 энантиомеров (R и S) (рис. 2в), которые могут обладать одинаковыми физико-химическими свойствами, но по-разному взаимодействовать с GR и, следовательно, проявлять различную биологическую активность, что ранее не было изучено. Данные особенности могут выступать причиной различия их фармакодинамических и фармакокинетических свойств.

Таким образом, данное исследование было направлено на изучение биологических эффектов энантиомеров нестероидного лиганда GR, CpдA, на модели острого лимфобластного лейкоза *in vitro* с целью определения перспективности использования соединений данного класса в химиотерапии гемобластозов.

### Материалы и методы

**Синтез энантиомеров CpдA.** Синтез чистых энантиомеров CpдA осуществлен на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова на основании ассиметричного дигидроксилирования алкенов по Шарплессу [19] (рис. 3) по следующей схеме.

Стирол, защищенный ацетатной группой (3), обрабатывали коммерчески доступной реакционной смесью AD-mix-β (тетраоксид осмия OsO<sub>4</sub> в качестве окислителя, гексацианоферрат (III) калия K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] в качестве кооксиданта, карбонат калия K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в качестве буфера для поддержания щелочной среды и аддукт фталазина с дигидрохинидином, позволяющий получить чистый (R) – энантиомер CpдA; Sigma-Aldrich, США). Диол (4) обрабатывали в пиридине тозилхлоридом и N-Вос-N-метиламидом лития и получали спирт (5). При обработке продукта (5) тионилхлоридом с последующим удалением Вос-защитной группы при добавлении безводного хлороводорода получали (R) – энантиомер CpдA. Получение (S) – энантиомера CpдA проводили по аналогичной схеме с помощью реакционной смеси AD-mix-α (Sigma-Aldrich, США), где в качестве стереоселективного катализатора использовали аддукт фталазина с дигидрохиномидом. Оценку чистоты полученных энантиомеров проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с хиральной неподвижной фазой. Данные, полученные после хроматографии на хиральной неподвижной фазе, подтверждали образование R- и S-изомеров с энантиомерным избытком 98 %. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (400 МГц, d<sub>6</sub>-DMSO): 2.23 м. д. (s, 3H); 2.51–2.52 (m, 3H); 3.19–3.27 (m, 2H), 4.88–4.91 (m, 1H); 6.83–6.85 (d, 2H); 7.16–7.19 (d, 2H).

**Клеточные линии и обработка клеток.** В работе использовали клетки острого лимфобластного лейкоза линии СЕМ. Культура клеток СЕМ была получена в фазе обострения от пациентки с острым лимфобластным лейкозом [20–23]. Клетки культивировали в стандартной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 5 % эмбриональную сыворотку телят (РАА, Австрия) и гентамицин («ПанЭко», Россия) (50 ед/мл) при 37 °С и в 5 % CO<sub>2</sub>. Клетки обрабатывали 1 мкМ дексаметазона (Dex, Sigma-Aldrich, США), 1 мкМ CpдA или энантиомерами CpдA (R, S в концентрациях 1 мкМ).

**Трансдукция клеток лентивирусными векторами.** Вирусные стоки высокого титра получали путем котрансфекции клеток линии 293Т лентивирусными векторами (плазида pGreenPuro-shGR, несущая короткую шпилечную РНК к гену GR, и контрольная плазида pGIPZ) (System Biosciences, США) совместно с упаковочной плазмидой psPAX2 (плазида № 12260) и плазидами pCMV-VSV-G (плазида № 8454) и pMD2.G (плазида № 12259), кодирующими

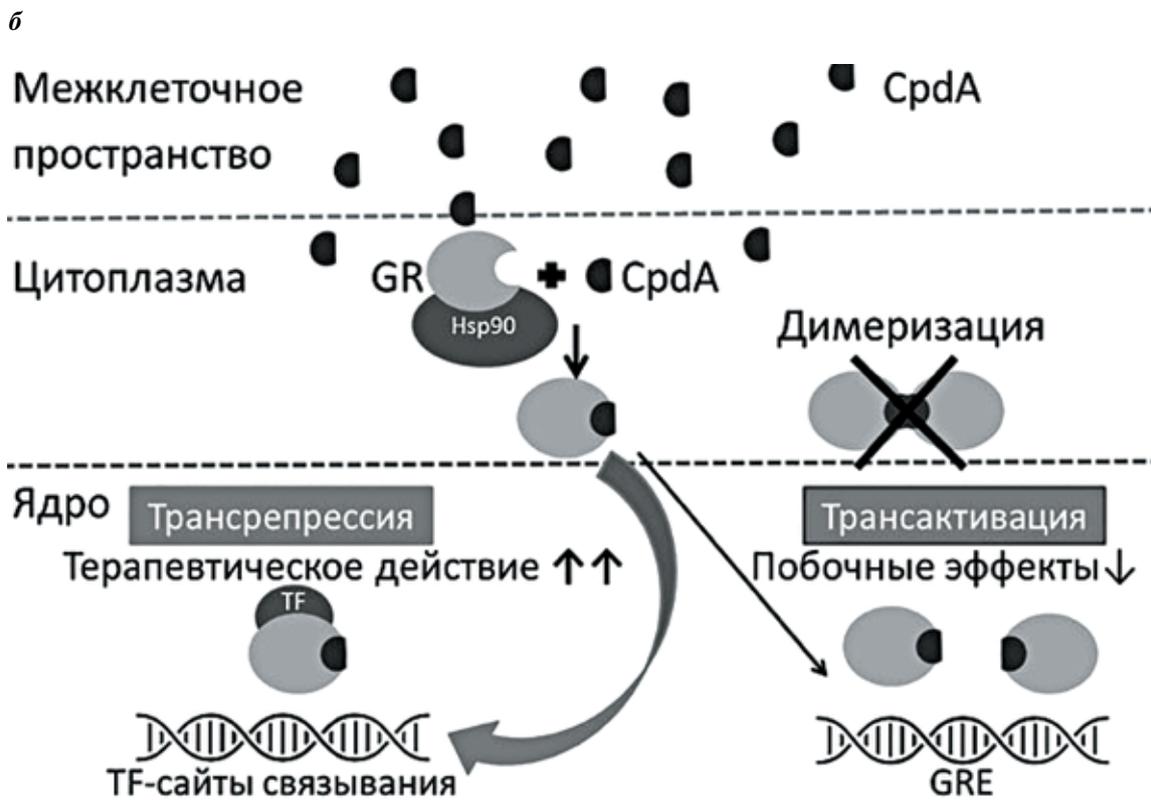
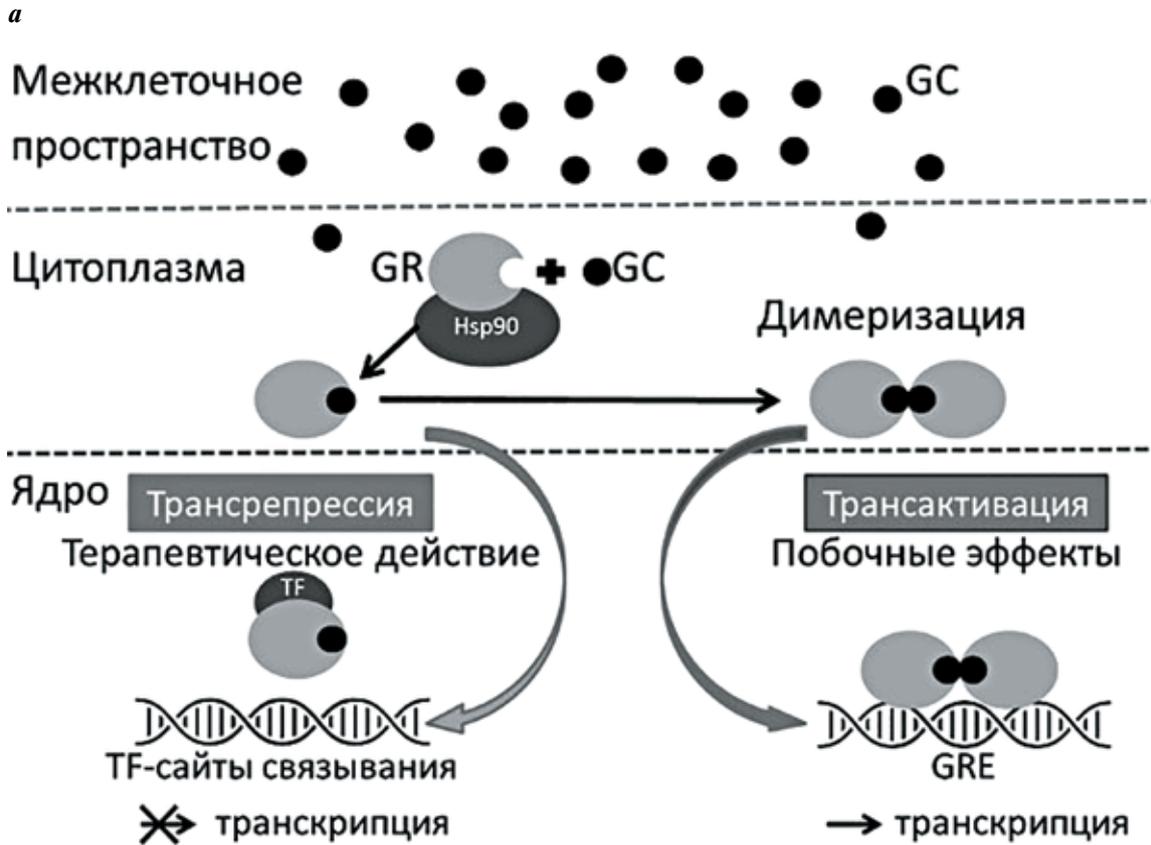


Рис. 1. Механизмы действия глюкокортикоидов (а) и SEGRA (б) на примере CpdA

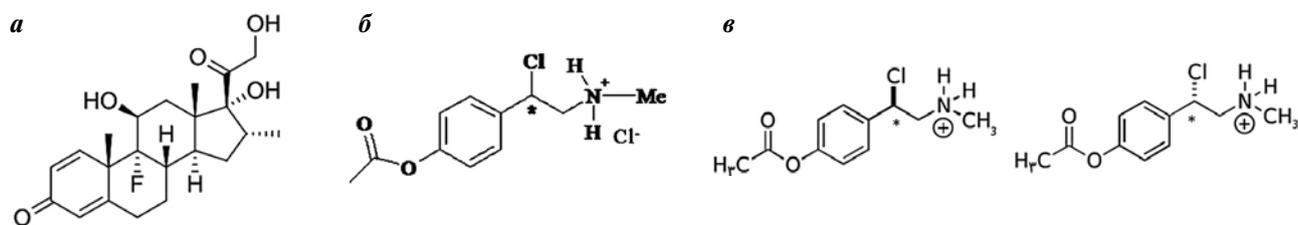


Рис. 2. Структурные формулы глюкокортикоида дексаметазона (а), CpDA (б) и энантиомеров CpDA (в). \*Хиральный атом углерода в молекуле CpDA

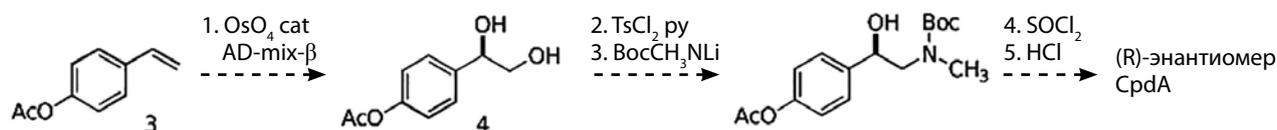


Рис. 3. Синтез чистых энантиомеров CpDA на основании асимметричного дигидроксилирования алкенов по Шарплессу

оболочечные гликопротеины (Addgene, США). Трансфекцию проводили с помощью реагента TransIT®-293 (Mirus-Bio, США) по протоколу производителя. Супернатант, содержащий вирусные частицы, собирали через 24–48 ч после трансфекции, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и использовали для инфекции клеток СЕМ. В результате инфекции была получена стабильная линия клеток СЕМ-shGR, экспрессирующая короткую шпилечную РНК к гену GR, и контрольная линия СЕМ-pGIPZ. Далее полученные трансформированные клетки культивировали на селективной среде, содержащей антибиотик пурамицин, в течение 14–21 сут. Об эффективности трансдукции лентивирусных конструкций судили по интенсивности пролиферации клеток в среде с пурамицином, по интенсивности флуоресценции GFP (клетки исследовали на флуоресцентном микроскопе Zeiss, с использованием фильтра для GFP-флуоресценции при 400-кратном увеличении), а также по результатам иммуноблоттинга.

**Иммуноблоттинг.** Для проведения иммуноблоттинга тотальные клеточные лизаты выделяли по методу, описанному ранее [7]. Концентрацию белка определяли с помощью реагента Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, США). Белки разделяли с помощью

электрофореза в полиакриламидном геле с SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (LI-COR, США). Для иммуноблоттинга использовали антитела к GR- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology, США). Для предотвращения неспецифической сорбции мембраны в течение 1 ч инкубировали с 5 % раствором блокирующего агента Blotto (Bio-Rad, США) в TBS-буфере (20 мМ Трис-НCl, pH 7.6, 150 мМ NaCl), затем инкубировали с первичными антителами в течение 6 ч при комнатной температуре. Для контроля загрузки и переноса мембраны инкубировали с антителами к GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, США). Мембраны отмывали и инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой, образовавшиеся комплексы проявляли хемилуминесцентным реагентом (все реактивы Amersham, Великобритания). Количественный анализ проводился путем денситометрического сканирования с использованием компьютерной программы Image Quant for Windows.

**Определение антипролиферативного эффекта.** Антипролиферативный эффект определяли путем прямого подсчета клеток. Клетки культивировали в 24-луночном планшете в присутствии исследуемых соединений или растворителя (0,1 % этанола или

Условия проведения ПЦР и последовательность используемых праймеров

Праймер	Последовательность		Размер продукта
	прямой праймер	обратный праймер	
FKBP51	5'-gaatggtgaggaacgcgat-3'	5'-tgccaagactaaagacaatggt-3'	250
GILZ	5'-cagcccagccatgaacacc-3'	5'-cgcagaaccaccagggcct-3'	144
CCND1	5'-gctggagcccgtgaaaaga-3'	5'-ctcccctctgcatctttg-3'	135
CCND2	5'-ctacctccagctgctccta-3'	5'-cccagccaagaacgggcc-3'	161
RPL27	5'-accgctacccccgaaagtg-3'	5'-cccgtcgggcct tgcgtta-3'	125

ДМСО); подсчет клеток проводили через 24 ч после обработки. Каждая экспериментальная или контрольная группа состояла из 3 лунок.

**Определение уровня апоптоза.** Уровень апоптоза определяли с помощью метода проточной цитофлуориметрии после окраски йодистым пропидием (PI), для чего клетки центрифугировали, осадок суспендировали в 1 мл раствора, содержащего 5 мкг/мл PI, 0,1 % цитрата натрия и 0,3 % NP-40. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Число апоптотических клеток определяли как пре-G1-пик на ДНК-гистограмме.

**Количественная амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), сопряженная с обратной транскрипцией.** Для обратной транскрипции использовали набор MMLV Reverse Transcriptase, случайные праймеры, смесь для ПЦР (Invitrogen, США) и тотальную РНК, выделенную с помощью набора для выделения РНК RNeasy kit (Qiagen, США). Количественный ПЦР-анализ в режиме реального времени проводили с использованием ПЦР-анализатора Bio-Rad iQ5. Программа амплификации была следующей: 95 °С – 10 мин, 40 циклов (95 °С – 15 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с). Относительное изменение экспрессии исследуемой мРНК вычисляли методом  $\Delta\Delta Ct$ , где  $\Delta\Delta Ct$  определяли путем вычитания среднего  $\Delta Ct$  контроля из  $\Delta Ct$  экспериментальных образцов [24]. В качестве контроля использовали ген рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Праймеры для амплификации были сконструированы с помощью базы данных Primer-Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) и пакета программ Oligo 6. Последовательности праймеров приведены в таблице.

**Статистическая обработка данных.** Все эксперименты повторены трижды. Средние значения и среднеквадратичное отклонение рассчитывали с помощью пакета программ Microsoft Excel и сравнивали с парным двухвыборочным t-тестом Стьюдента для средних. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

#### GR-зависимый противоопухолевый эффект энантиомеров CpдA *in vitro* на модели острого лимфобластного лейкоза

Согласно терминологии, используемой в современной литературе, противоопухолевое действие препарата *in vitro* (т. е. клеточные культуры) включает способность препарата подавлять пролиферацию и индуцировать апоптоз в клетках линии интересующей нозологической формы злокачественного новообразования. Линия острого лимфобластного лейкоза СЕМ использовалась в исследованиях нашей лаборатории ранее. Было показано, что GR в данной клеточной линии экспрессируется на достаточно

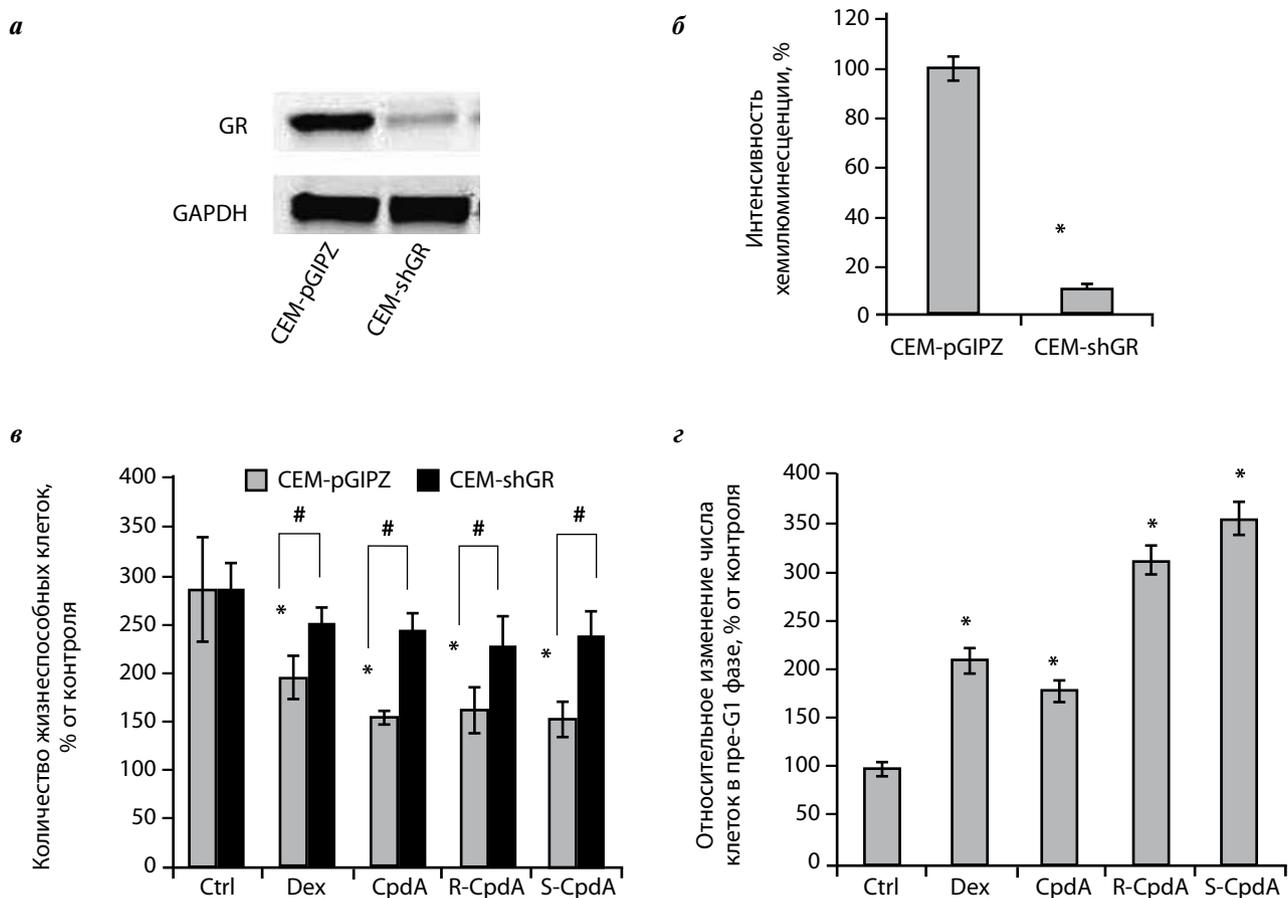
высоком уровне, его ген не несет в себе мутаций, функциональная активность рецептора также была подтверждена ранее [10, 11, 23, 25].

Для доказательства того, что антипролиферативное действие энантиомеров CpдA реализуется через GR, нами была получена сублиния клеток СЕМ-shGR со сниженной экспрессией рецептора при помощи коротких шпилечных РНК к гену GR, как было описано ранее [23]. В качестве контрольной сублинии клеток использовали клетки СЕМ-pGIPZ, полученные с помощью лентивирусной трансдукции плазмиды pGIPZ в геном клеток СЕМ. На рис. 4а, б представлены результаты иммуноблоттинга тотальных клеточных лизатов данных сублиний и денситометрический анализ полученных данных. Можно увидеть, что экспрессия GR в клетках СЕМ-shGR снизилась на ~ 90 %.

Определение антипролиферативного эффекта проводили в течение 24-часовой инкубации с растворителем, Dex, CpдA или энантиомерами CpдA (R, S) с помощью прямого подсчета клеток. Рабочие концентрации CpдA и Dex эквивалентны (1 мкМ), поскольку данные соединения обладают сходной аффинностью к GR [26] и определены нами ранее [11, 25]. Рабочие концентрации энантиомеров CpдA были эквивалентны концентрации рацемата, так как по химической структуре, а следовательно, по молекулярной массе данные соединения абсолютно идентичны. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-pGIPZ после обработки Dex в течение 24 ч составило  $69,1 \pm 8,3$  %, после обработки CpдA –  $54,7 \pm 4,2$  %. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-pGIPZ после обработки энантиомерами CpдA составило  $57,2 \pm 8,2$  % после обработки S-энантиомером CpдA в течение 24 ч, а после аналогичной обработки R-энантиомером CpдA –  $43,8 \pm 7,4$  % (рис. 4в). В то же время антипролиферативный эффект всех исследуемых соединений на клетки с подавленной экспрессией GR был гораздо менее выражен. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-shGR после обработки Dex в течение 24 ч составило  $87,3 \pm 7,6$  %, после обработки рацематом CpдA –  $86,0 \pm 4,6$  %. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-shGR после обработки энантиомерами CpдA составило  $80,0 \pm 11,8$  % после обработки S-энантиомером CpдA в течение 24 ч, а после аналогичной обработки R-CpдA –  $83,3 \pm 9,4$  % (рис. 4г).

Таким образом, был продемонстрирован GR-зависимый антипролиферативный эффект энантиомеров CpдA, сопоставимый с антипролиферативным действием глюкокортикоидов, а также ранее исследованным антипролиферативным эффектом рацемической смеси CpдA [11, 25].

При исследовании проапоптотического эффекта энантиомеров CpдA с помощью проточной цитофлуо-



**Рис. 4.** GR-зависимый противоопухолевый эффект энантиомеров Cpda *in vitro*: а – оценка экспрессии GR в клетках CEM после трансдукции лентивирусных конструкций pGF-shGR и pGIPZ методом иммуноблоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали иммуноблоттинг с антителами к GAPDH; б – денситометрический анализ данных иммуноблоттинга. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH; в – антипролиферативный эффект энантиомеров Cpda на клетки CEM. Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью прямого подсчета. Представлено количество живых клеток после обработки 1 мкМ Dex, 1 мкМ Cpda или энантиомеров Cpda (R, S в концентрациях 1 мкМ) в процентах от контроля, обработанного растворителем; \* – статистически достоверное отличие от контроля ( $p < 0,05$ ), # – статистически достоверное отличие количества жизнеспособных клеток CEM-shGR от CEM-pGIPZ; г – проапоптотический эффект энантиомеров Cpda в клетках CEM. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по количеству клеток в пре-G1-фазе; \* – статистически достоверное отличие от контроля ( $p < 0,05$ )

риметрии показано, что в клетках CEM инкубация с Dex, Cpda и с обоими энантиомерами Cpda вызвала запуск апоптоза в клетках острого лимфобластного лейкоза CEM.

Количество клеток, находящихся в пре-G<sub>1</sub> фазе, после обработки Dex в течение 24 ч составило  $210,5 \pm 4,5$  % относительно контроля, после обработки рацемической смесью Cpda –  $178,9 \pm 2,6$  %. В то же время после обработки R- и S-энантиомерами количество клеток, находящихся в пре-G<sub>1</sub> фазе, составило  $310,5 \pm 2,6$  % и  $352,6 \pm 5,3$  % соответственно. Необходимо отметить, что степень индукции апоптоза обоими энантиомерами была значительно выше данного показателя, полученного при обработке клеток рацематом Cpda или дексаметазоном.

Проапоптотический эффект энантиомеров Cpda на клетки острого лимфобластного лейкоза CEM

коррелировал со степенью подавления роста и жизнеспособности данных клеток при инкубации с этими соединениями. Таким образом, можно сделать следующий вывод: антипролиферативный эффект энантиомеров Cpda связан с запуском апоптоза, причем R- и S-энантиомеры обладают более выраженным проапоптотическим эффектом, чем их рацемическая смесь или Dex.

#### Транс-репрессорный и транс-активационный потенциал энантиомеров Cpda

ДНК-независимая транс-репрессия, запускаемая GR, обусловлена белок-белковым взаимодействием GR с другими транскрипционными факторами, такими как NF-κB, AP-1, Ets-1, Elk-1, SRF, CRE/ATF и NFATc [26]. Мы исследовали транс-репрессорный потенциал энантиомеров Cpda в сравнении

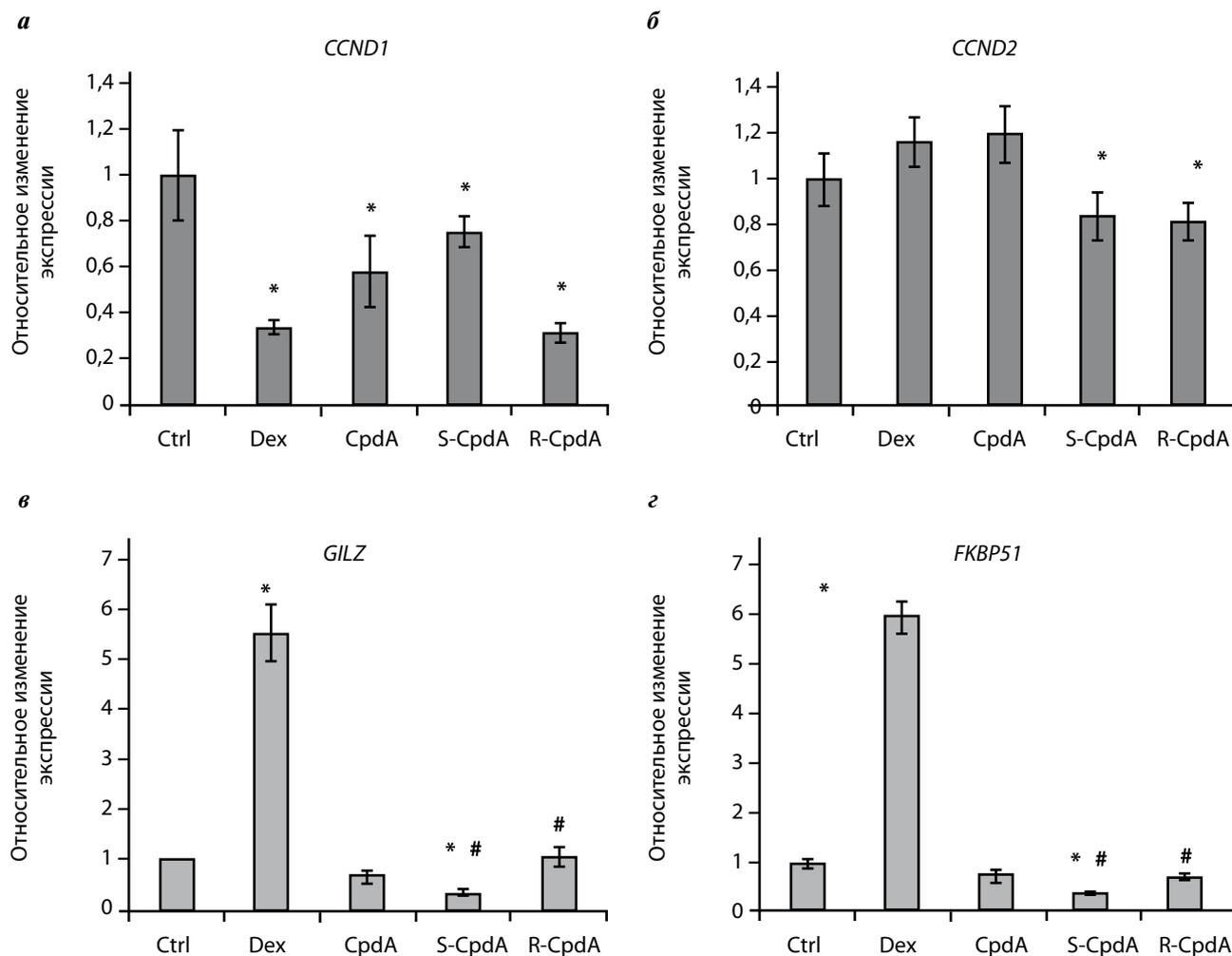
с рацемической смесью CpдA и дексаметазоном с помощью количественной ПЦР генов, регулируемых как NF- $\kappa$ B, так и AP-1 – регуляторов клеточного цикла циклинов D1 и D2, содержащих в промоторной области сайты связывания NF- $\kappa$ B.

При обработке Dex клеток линии СЕМ экспрессия гена CCND1 снизилась в 3,1 раза, в то время как при обработке CpдA этот показатель снизился в 1,7 раза. При обработке S- и R-энантиомерами экспрессия того же гена в клетках была подавлена в 1,3 и 2,2 раза соответственно (рис. 5а).

Экспрессия гена CCND2 после обработки Dex и CpдA возросла на 20 %, однако это увеличение было статистически недостоверным. При обработке S- и R-энантиомерами экспрессия указанного гена незначительно снизилась по сравнению с рацемической смесью в 1,2 и 1,3 раза соответственно (рис. 5б).

Так, было показано, что энантиомеры CpдA обладают более высоким транс-репрессорным потенциалом, чем рацемическая смесь.

Запуск транс-активационного механизма GR в клетке происходит при связывании гомодимера рецептора с палиндромными последовательностями нуклеотидов в ДНК – глюкокортикоид-респонсивных элементов. Это приводит к ацетилированию гистонов, уменьшению плотности хроматина, что увеличивает доступ к ДНК фермента РНК-полимеразы II, катализирующего синтез мРНК [27]. Таким образом, в клетке активируются процессы транскрипции генов и образования белков, обладающих про-пролиферативным и антиапоптотическим действием. В данной работе мы исследовали транс-активационный потенциал энантиомеров CpдA путем оценки изменения экспрессии GR-зависимых генов, несущих в своих



**Рис. 5.** Влияние энантиомеров CpдA на запуск транс-репрессии (а, б) и транс-активации (в, г) в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 1 ч (CCND1), 4 ч (CCND2) и 24 ч (GILZ и FKBP51) в присутствии растворителя, 1 мкМ Dex, 1 мкМ CpдA или энантиомеров CpдA (R, S в концентрациях 1 мкМ). Уровень экспрессии генов определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (Rpl27); \* – статистически достоверное отличие от контроля ( $p < 0,05$ ), # – статистически достоверное отличие экспрессии генов GILZ и FKBP51 от экспрессии данных генов в клетках, обработанных Dex

промоторах респонсивные элементы глюкокортикоидов с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. На основании данных литературы о профилях экспрессии генов после обработки глюкокортикоидами [28] в качестве таких характеристических генов мы выбрали гены белка 51, связывающего FK506 (FK506 Binding Protein 51, FKBP51), и белка Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ).

Исследовали изменение экспрессии генов FKBP51 и GILZ при обработке Dex, SpdA и энантиомерами SpdA клеток СЕМ. Для каждого из этих генов в литературе подробно описаны последовательности глюкокортикоид-респонсивных элементов и отмечено возрастание экспрессии после обработки глюкокортикоидами [28–32]. Количество мРНК вышеперечисленных генов сильно возрастало после обработки Dex в 6,1 и 5,5 раза для FKBP51 и GILZ соответственно, в то время как при инкубации клеток СЕМ с SpdA экспрессия этих генов не изменялась (рис. 5*в*, *г*). Экспрессия гена FKBP51 при обработке клеток СЕМ S-энантиомером SpdA снижалась в 2 раза, экспрессия гена GILZ – в 3 раза (рис. 5*в*, *г*). Однако в присутствии R-энантиомера экспрессия гена GILZ незначительно повышалась (на 10 и 20 % соответственно), но эти показатели были статистически неотличимы от контроля (рис. 5*в*, *г*). Необходимо отметить, что ген FKBP51 является не только маркером транс-активации, он играет важную роль в развитии резистентности к глюкокортикоидам. Для гена GILZ описано его антиапоптотическое действие в Т-лимфоцитах [11, 25]. Таким образом, поскольку S-энантиомер SpdA не увеличивает экспрессию данных генов или подавляет ее, то можно рассматривать S-SpdA как более безопасный агонист GR, не вызывающий развитие резистентности.

Таким образом, энантиомеры SpdA по своему эффекту на экспрессию GR-зависимых генов FKBP51 и GILZ отличаются от рацемической смеси SpdA. В частности, S-энантиомер проявил большую

способность к подавлению транс-активации и запуску транс-репрессии по сравнению с рацемической смесью. Различия в биологических свойствах энантиомеров SpdA обусловлены, как нам представляется, различиями в конформации образовавшегося комплекса «лиганд-рецептор», и следовательно, различной аффинностью к транскрипционными факторам, с которыми взаимодействует активированный GR.

### Заключение

Данная работа показывает, что в клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ энантиомеры SpdA проявляют GR-зависимый антипролиферативный эффект в большей степени, чем рацемат SpdA и дексаметазон, использовавшиеся в качестве положительного контроля. Антипролиферативный эффект энантиомеров SpdA обусловлен, с одной стороны, развитием апоптоза, а с другой – селективным запуском транс-репрессии, в результате которой снижалась пролиферативная активность злокачественных клеток кроветворной системы.

Таким образом, энантиомеры SpdA проявляют GR-зависимый противоопухолевый эффект *in vitro* на модели острого лимфобластного лейкоза. Энантиомеры SpdA способны селективно запускать транс-репрессию GR, не индуцируя механизм транс-активации, что снижает риск развития побочных эффектов, а также резистентности к данным соединениям. Биологические эффекты S-энантиомера SpdA на клетки острого лимфобластного лейкоза СЕМ более выражены по сравнению с глюкокортикоидом дексаметазоном, рацемической смесью и R-SpdA. Следовательно, S-SpdA является более перспективным кандидатом для дальнейших исследований *in vivo*.

*Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 15-04-04006, 16-04-01410 и гранта фонда «Династия».*

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Басов П. В. Влияние глюкокортикоидных гормонов на Т-лимфоциты у больных туберкулезом легких. Проблемы туберкулеза 1990;1:30–3.
2. Витовская О. П. Медикаментозно индуцированная глаукома. Офтальмологические ведомости 2014;7(3):58–62.
3. Иванова А. А. Механизмы антилейкемического действия и возможные пути развития резистентности при использовании глюкокортикоидов в терапии острых лейкозов (обзор литературы). Гематология и трансфузиология 2000;45(2):12–5.
4. Спичак И. И., Богачева М. В., Билялутдинова Д. И. и др. Частота стероидного диабета на программной полихимиотерапии у детей с лимфобластным лейкозом. Педиатрический вестник Южного Урала 2014; 1–2:30–3.
5. Страчунский Л. С., Козлов С. Н. Глюкокортикоидные препараты. Методическое пособие. Смоленск, 1997.
6. Cutolo M. Glucocorticoids and chronotherapy in rheumatoid arthritis. RMD open 2016;2(1):1–10. DOI: 10.1136/rmdopen-2015–000203. PMID: 27042335.
7. Klaustermeyer W. B., Choi S. H. A perspective on systemic corticosteroid therapy in severe bronchial asthma in adults. Allergy Asthma Proc 2016;37(3):192–8. DOI: 10.2500/aap.2016.37.3941. PMID: 27178888.

8. Топорова И.Ю., Паровичникова Е.Н., Клясова Г.А. и др. Частота развития и структура инфекционных осложнений, возникающих у больных с гемобластозами на различных этапах программной химиотерапии. *Гематология и трансфузиология (приложение)* 2012;54.
9. Lekva T., Bollerslev T.J., Kristo C. et al. The glucocorticoid-induced leucine zipper gene (GILZ) expression decreases after successful treatment of patients with endogenous Cushing's syndrome and may play a role in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;V(1):246–55. DOI: 10.1210/jc.2009–0595. PMID: 19875485.
10. Thompson E.B., Harmon J.M. Glucocorticoid resistance in human leukemia *in vivo* and *in vitro*. *Adv Exp Med Biol* 1986;196:111–27. DOI: 10.1007/978-1-4684-5101-6\_8. PMID: 3521219.
11. Лесовая Е.А., Емельянов А.Ю., Кирсанов К.И. и др. Противоопухолевое действие нестероидного лиганда глюкокортикоидного рецептора, СрдА, на клетки линий Т-клеточного лейкоза. *Биохимия (Москва)* 2011;76(11):1242–52.
12. Polman J.A., de Kloet E.R., Datson N.A. Two populations of glucocorticoid receptor-binding sites in the male rat hippocampal genome. *Endocrinology* 2013;154(5):1832–44. DOI: 10.1210/en.2012–2187. PMID: 23525215.
13. Ray A., Prefontaine K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- $\kappa$ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(2):752–6. PMID: 8290595.
14. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2012. 633 с.
15. Hudson W.H., Youn C., Ortlund E.A. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20(1):53–8. DOI: 10.1038/nsmb.2456. PMID: 23222642.
16. Surjit M., Ganti K.P., Mukherji A. et al. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-legged glucocorticoid receptor. *Cell* 2011;145(2):224–41. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.027. PMID: 21496643.
17. Bosscher de K., Haegeman G., Elewaut D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(4):497–504. DOI: 10.1016/j.coph.2010.04.007. PMID: 20493772.
18. Lesovaya E., Yemelyanov A., Swart A.C. et al. Discovery of Compound A – a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity. *Oncotarget* 2015;6(31):30730–44. DOI: 10.18632/oncotarget.5078. PMID: 26436695.
19. Sharpless K.B., Amberg W., Bennani Y.L. et al. The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and process improvement. *JOC* 1992;57(10):2768–71. DOI: 10.1021/jo00036a003.
20. Antakly T., Eisen H.J. Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in steroid-sensitive and -resistant human leukemic cells. *Cancer Res* 1990;50(4):1337–45. PMID: 2404592.
21. Foley G.E., Lazarus H., Farber S. et al. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 1965;18:522–9. PMID: 14278051.
22. Norman M.R., Thompson E.B. Characterization of a glucocorticoid-sensitive human lymphoid cell line. *Cancer Res* 1977;37(10):3785–91. PMID: 269011.
23. Thompson E.B., Medh R.D., Zhou F. et al. Glucocorticoids, oxysterols, and cAMP with glucocorticoids each cause apoptosis of CEM cells and suppress c-myc. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69(1–6):453–61. PMID: 10419025.
24. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006;27:95–125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. PMID: 16460794.
25. Lesovaya E., Yemelyanov A., Kirsanov K. et al. Combination of a selective activator of the glucocorticoid receptor Compound A with a proteasome inhibitor as a novel strategy for chemotherapy of hematologic malignancies. *Cell Cycle* 2013;12(1):133–44. DOI: 10.4161/cc.23048. PMID: 23255118.
26. Yemelyanov A., Czornog J., Gera L. et al. Novel steroid receptor phyto-modulator compound A inhibits growth and survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2008;68(12):4763–73. DOI: 10.1158/0008–5472.CAN-07–6104. PMID: 18559523.
27. Adcock I.M. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther* 2000;13(3):115–26. DOI: 10.1006/pupt.2000.0243. PMID: 10873549.
28. Chauhan D., Auclair D., Robinson E.K. et al. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene* 2002;21(9):1346–58. DOI: 10.1038/sj.onc.1205205. PMID: 11857078.
29. Bruscoli S., Donato V., Vèlardy E. et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *J Biol Chem* 2010;285(14):10385–96. DOI: 10.1074/jbc.M109.070136. PMID: 20124407. PMID: PMC2856245.
30. Kochel I., Strzadala L. FK506-binding proteins in the regulation of transcription factors activity in T cells. *Postepy Hig Med Dosw* 2004;58:118–27. PMID: 15077060.
31. Shipp L.E., Lee J.V., Yu C.Y. et al. Transcriptional regulation of human dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) gene by glucocorticoids. *PLoS One* 2010;5(10):13754. DOI: 10.1371/journal.pone.0013754. PMID: 21060794.
32. Tchen C.R., Martins J.R., Paktiawal N. et al. Glucocorticoid regulation of mouse and human dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) genes: unusual cis-acting elements and unexpected evolutionary divergence. *J Biol Chem* 2010;285(4):2642–52. DOI: 10.1074/jbc.M109.037309. PMID: 19940143.