

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-92-102>

Молекулярные механизмы действия нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора в клетках рака молочной железы

Е.М. Жидкова¹, В.П. Максимова¹, Д.Д. Григорьева¹, В.З. Ширинян², М.Г. Якубовская^{1,3}, Е.А. Лесовая^{1,3,4}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук»; Россия, 119991 Москва, Ленинский пр-кт, 47;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольтная, 9

Контакты: Екатерина Михайловна Жидкова e.zhidkova@ronc.ru

Введение. Глюкокортикоиды (ГС) широко применяются в терапии рака молочной железы (РМЖ) в качестве средства сопроводительной терапии для снижения побочных действий цитостатических препаратов. При этом они могут проявлять антипролиферативное действие на клетки люминального РМЖ. Биологическое действие ГС опосредовано активацией глюкокортикоидного рецептора (GR) по двум механизмам: транскрепрессии, обуславливающей терапевтический эффект ГС, и трансактиваии, ассоциированной с развитием побочных эффектов, резистентности к цитотоксическим препаратам, а также с прогрессией и метастазированием РМЖ. В настоящее время ведется активный поиск безопасной альтернативы ГС-терапии. Селективные агонисты ГС (SEGRA), особенностью механизма действия которых является избирательный запуск транскрепрессии, можно рассматривать как перспективную альтернативу ГС. Одним из наиболее полно охарактеризованных препаратов группы SEGRA является соединение Compound A (CpdA). Нестабильность CpdA ограничивает возможность его применения в клинической практике. Ранее наш коллектив синтезировал и охарактеризовал новый SEGRA – производное CpdA CpdA-03.

Цель исследования – сравнение влияния SEGRA CpdA-03, CpdA и дексаметазона на пролиферативную активность клеток РМЖ, а также на ядерную транслокацию рецептора и активацию GR-зависимых генов в клетках РМЖ.

Материалы и методы. В работе использовали клеточные линии РМЖ люминального (MCF-7) и трижды негативного (TN, MDA-MB-231) подтипов. Влияние CpdA-03 на пролиферацию оценивали прямым подсчетом живых клеток. Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии с окрашиванием йодистым пропидием. Для оценки изменения экспрессии GR-зависимых генов под действием CpdA-03 использовали количественную полимеразную цепную реакцию. Способность нового SEGRA индуцировать трансактивацию GR оценивали методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Выявлено, что CpdA-03 подавляет пролиферацию клеток люминального и трижды негативного РМЖ и при этом не стимулирует ассоциированное с трансактивацией фосфорилирование и транслокацию GR в ядро, а также подавляет экспрессию генов белков, регулирующих межклеточную адгезию и миграцию в клетках трижды негативного подтипа РМЖ.

Заключение. Наблюдаемое подавление пролиферации клеток, а также способность CpdA-03 регулировать экспрессию ряда ГС-индуцируемых генов в клетках трижды негативного РМЖ указывают на актуальность разработки лекарственного препарата на основе молекулы CpdA-03 для применения в комплексной терапии злокачественных новообразований, в том числе РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, глюкокортикоид, глюкокортикоидный рецептор, метастазирование, селективный агонист глюкокортикоидного рецептора, химиотерапия, побочный эффект

Для цитирования: Жидкова Е.М., Максимова В.П., Григорьева Д.Д. и др. Молекулярные механизмы действия нового селективного агониста глюкокортикоидного рецептора в клетках рака молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(3):92–102.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-92-102>

Molecular mechanisms of novel selective glucocorticoid receptor agonist action in breast cancer cells

E.M. Zhidkova¹, V.P. Maksimova¹, D.D. Grigoreva¹, V.Z. Shirinian², M.G. Yakubovskaya^{1,3}, E.A. Lesovaya^{1,3,4}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences; 47 Leninsky Prospekt, Moscow 119991, Russia;

³Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

⁴I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 9 Vysokovoltmaya St., Ryazan 390026, Russia

Contacts: Ekaterina Mikhailovna Zhidkova e.zhidkova@ronc.ru

Introduction. Glucocorticoids (GC) are widely used in breast cancer (BC) therapy to reduce the side effects of cytostatic drugs and may exhibit antiproliferative effects on luminal BC cells. The biological action of GC is mediated by glucocorticoid receptor (GR) by two mechanisms: transrepression, which determines the therapeutic effect of GC, and transactivation (associated with the development of side effects, resistance to cytotoxic drugs, cancer progression and metastasis). Selective GR agonists (SEGRA) which may selective activate transrepression are a promising alternative to GC to use in combination cancer therapy. One of the most studied SEGRA is Compound A (CpdA). The instability of CpdA limits its use in clinical practice. So recently we performed synthesis and evaluation of biological activities of the CpdA analogue, CpdA-03.

Aim. To compare the effects of SEGRA CpdA-03 and CpdA and dexamethasone on proliferative activity of breast cancer cells, as well as receptor nuclear translocation and activation of GR-dependent genes in breast cancer cells.

Materials and methods. Luminal (MCF-7) and triple negative (MDA-MB-231) BC cell lines were used. The effect of CpdA-03 on proliferation was evaluated by direct counting of viable cells with trypan blue staining. The effect of the compound on cell distribution by cell cycle phases was assessed by flow cytometry with propidium iodide staining. Changes in the expression of GR-dependent genes after incubation with CpdA-03 were evaluated by quantitative polymerase chain reaction. Additionally, the ability of the new SEGRA to induce transactivation-associated translocation of the receptor to the nucleus was evaluated by Western blotting.

Results. CpdA-03 was shown to suppress proliferation of luminal and triple negative BC cells. This compound causes changes in the expression of a number of GC-inducible genes, but does not stimulate GR phosphorylation and translocation to the nucleus in BC cells.

Conclusion. The observed suppression of cell proliferation, as well as the ability of CpdA-03 to reduce gene expression of proteins regulating intercellular adhesion and cell migration, intracellular signaling, stress response, and transcription in BC cells makes it relevant for further development of the drug for use in the combination therapy of cancers including breast cancer.

Keywords: breast cancer, glucocorticoid, glucocorticoid receptor, metastasis, selective glucocorticoid receptor agonist, chemotherapy, side effect

For citation: Zhidkova E.M., Maksimova V.P., Grigoreva D.D. et al. Molecular mechanisms of novel selective glucocorticoid receptor agonist action in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2024;11(3):92–102. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-3-92-102>

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) в настоящее время занимает 1-е место по распространенности (22,4 % случаев) и смертности у женского населения России [1, 2]. Современная молекулярная классификация РМЖ выделяет 3 основных подтипа РМЖ: люминальный (гормонозависимый), HER2-положительный (HER2 – рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа) и трижды негативный (ТНРМЖ) [3, 4]. Выявление молекулярного подтипа опухоли определяет стратегию терапии. При РМЖ люминального подтипа наблюдается повышенный уровень экспрессии рецептора эстрогена (ER), что обуславливает высокую эффективность гормональной терапии. Опухоли HER2-положительного подтипа характеризуются отсут-

ствием экспрессии ERα, но в то же время чувствительны к таргетной анти-HER2-терапии. При ТНРМЖ отсутствуют мишени для специфической терапии, поэтому назначают адъювантную терапию, которая сочетает в себе хирургическое вмешательство и курсовую химиотерапию производными таксанов, антрациклинов или препаратов платины [4]. В случае развития резистентности или рецидива гормонозависимого РМЖ также проводят адъювантную химиотерапию [4].

Современные исследования роли ядерных рецепторов в патогенезе РМЖ не ограничиваются анализом роли рецепторов эстрогена и прогестерона. Изучение действия экспрессии рецептора глюкокортикоидов (GR) и его эндо- и экзогенных лигандов на прогрессию РМЖ также является актуальным прикладным направлением

биомедицинской науки. Прежде всего, это связано с тем, что в рекомендуемые режимы адъювантной/постнеоадъювантной терапии РМЖ включены синтетические глюкокортикоиды (GC) [4]. Их применяют для снятия побочных эффектов химиотерапии и расширения терапевтического интервала препаратов.

В настоящее время отсутствует дифференцированный подход к использованию GC в терапии РМЖ. Их назначают симптоматически при люминальном РМЖ и в качестве обязательного компонента при проведении неоадъювантной химиотерапии ТНРМЖ. Особо стоит отметить, что GC в высоких дозах применяются в качестве компонентов местной и общей анестезии при проведении биопсии и резекции опухоли. Активация GR может подавлять эстрогензависимую пролиферацию клеток [5] и увеличивать продолжительность жизни пациентов с гормонозависимыми опухолями [6, 7]. В то же время в клетках HER2-положительного РМЖ и ТНРМЖ активация GR ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [8]. Глюкокортикоиды снижают терапевтический эффект доксорубина, паклитаксела и трастузумаба за счет ингибирования индуцируемого препаратами апоптоза в клетках РМЖ различных подтипов [9–13] в связи с активацией киназ SGK-1 и MKP-1 [9] и аутофагии [14–16].

Реализация биологического действия GR может протекать по двум основным механизмам. Доминирующий механизм, реализуемый при формировании комплекса GC-GR, включает стадии образования гомодимера, фосфорилирования GR по остатку Ser211, транслокации комплекса в ядро и связывания с респонсивными элементами GR (GRE). Поскольку данный механизм ассоциирован с транслокацией рецептора в ядро и последующей активацией транскрипции генов, он носит название трансактивации [17]. Механизм транспрессии предполагает образование гетеродимерного комплекса GR с другими транскрипционными факторами в цитоплазме клеток (например, AP1, транскрипционного ядерного фактора κ B (NF- κ B), STAT). Такое белок-белковое взаимодействие (тетеринг) приводит к инактивации факторов транскрипции, снижению экспрессии их респонсивных генов и опосредует терапевтическое действие GC [18].

В последние десятилетия разрабатывают селективные модуляторы рецептора GR (SEGRA), которые рассматривают в качестве возможной замены GC в клинической практике. При связывании с препаратами группы SEGRA GR теряет способность формировать гомодимер и реализовывать механизм трансактивации. В то же время механизм транспрессии и терапевтическое действие запускаются в полном объеме [19, 20]. Данная группа препаратов не ограничивается структурными аналогами GC. Среди малых молекул выявлен ряд соединений с доказанной активностью SEGRA: AZD7594, AZD5423, ZK245186 и Compound A (CpdA) (рис. 1) [19, 20]. По мнению разработчиков, данные препараты следует применять в основном в терапии

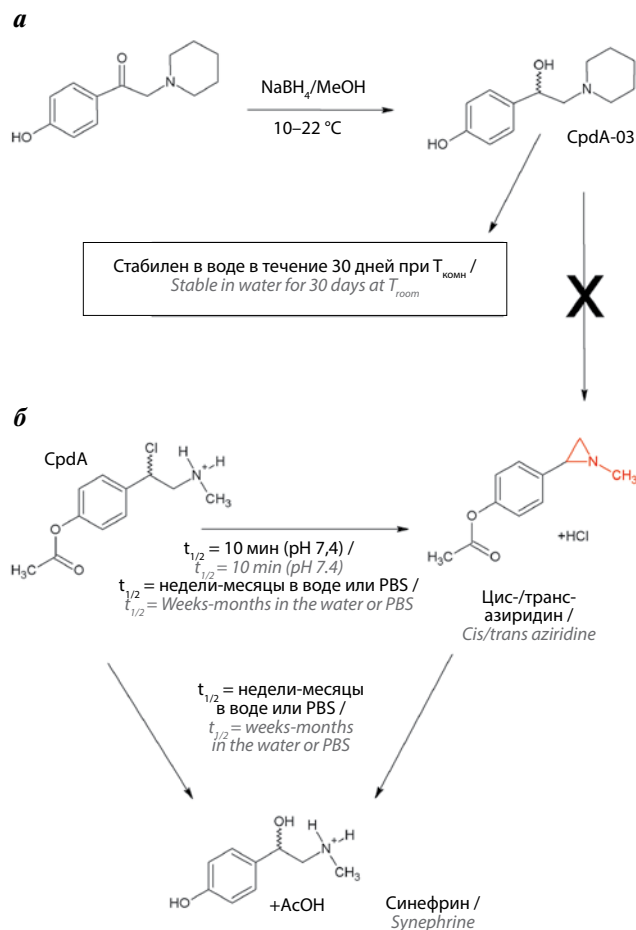


Рис. 1. Сравнение CpdA и CpdA-03: а – схема синтеза CpdA-03 (адаптировано из [25]); б – схема превращений CpdA в растворах (адаптировано из [24]). $T_{\text{комн}}$ – комнатная температура; $t_{1/2}$ – время полураспада молекулы

Fig. 1. CpdA and CpdA-03 comparison: а – scheme of CpdA-03 synthesis (adapted from [25]); б – scheme of CpdA degradation in water solution (adapted from [24]). T_{room} – room temperature; $t_{1/2}$ – molecule half-life

астмы и ревматоидного артрита. Исследования их биологического действия в отношении злокачественных новообразований проведены лишь для SEGRA CpdA. Данная молекула имеет высокое сродство к GR и селективно запускает транспрессию в клетках лейкозов, лимфом и рака предстательной железы [21–23]. Однако исследования стабильности этого соединения показали, что в водном растворе структура CpdA подвергается конформационным изменениям, которые приводят к формированию структурного аналога азиридина – канцерогена группы 2В (см. рис. 1, б) [24]. В связи с этим проведены синтез ряда производных CpdA, а также оценка их лигандных свойств и противоопухолевой активности [24]. В ходе работы получена кандидатная молекула 4-[1-гидрокси-2-(пиперидин-1-ил)этил]фенол (CpdA-03), для которой показано не только сродство к GR, но и отсутствие способности индуцировать трансактивацию. Описаны способность CpdA-03 подавлять экспрессию провоспалительных генов (*IL-1*, *IL-6*) и активность NF- κ B, антипролиферативный

и проапоптотический эффекты на клеточных моделях опухолей системы крови *in vitro*, а также способность подавлять прогрессию лимфомы на мышинной модели *in vivo* [25]. Также стоит отметить, что данная молекула отличается простотой синтеза и, в отличие от CpдA, высокой стабильностью при длительном хранении в водных растворах (рис. 1, а) [25], что делает ее перспективной для внедрения в клиническую практику.

Цель исследования — оценка действия синтетического SEGRA CpдA-03 на клетки РМЖ. Проведено сравнение влияния SEGRA CpдA-03, CpдA и дексаметазона (Dex) на клеточную пролиферацию и прохождение клеток по фазам клеточного цикла, выявлены мишени CpдA-03 и CpдA среди GC-регулируемых генов в клетках РМЖ. Дополнительно оценена способность CpдA-03 индуцировать транскрипцию и ядерную транслокацию GR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Клеточные линии люминального РМЖ (MCF-7) и ТНРМЖ (MDA-MB-231) культивировали в стандартной среде, как описано ранее [26]. Клеточные сублинии с подавленной экспрессией GR (MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR) получены путем вирусной трансдукции [27].

Подсчет клеток. Клетки высевали в 24-луночные планшеты по 30 тыс. клеток на лунку. После прикрепления клеток к подложке в культуральную среду вносили 10 нМ CpдA-03; 0,1 % растворителя (диметилсульфоксида, ДМСО) или соединения сравнения (10 нМ Dex (Macklin, Китай) или CpдA (Sigma Aldrich, США)) и инкубировали в течение 120 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Затем клетки снимали с подложки раствором трипсина-ЭДТА и окрашивали 0,4 % раствором трипанового синего (1:1). Количество живых клеток регистрировали с помощью автоматического счетчика клеток TC-20 (Bio-Rad, США). Число живых клеток в контрольных (обработанных растворителем) образцах принимали за 100 %.

Проточная цитофлуориметрия. Клетки высевали в 24-луночные планшеты, обрабатывали и инкубировали, как описано выше. Затем их фиксировали и окрашивали [26]. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (не менее 20 тыс. событий на экспериментальную точку). Все эксперименты проведены в 2 технических и 3 биологических повторах.

Количественная полимеразная цепная реакция. Клетки высевали в 6-луночные планшеты (10 тыс. клеток в лунку), культивировали в присутствии 10 нМ Dex, CpдA или CpдA-03 в течение 24 ч, после чего с помощью реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) по протоколу производителя выделяли тотальную РНК и с использованием набора MMLV RT (ЗАО «Евроген», Россия) проводили реакцию обратной транскрипции. В пашку с лиофилизированными праймерами (RT²

Profiler™ PCR Array Human Glucocorticoid Signaling (PAHS-154Z), Qiagen, Германия) вносили 500 мкг комплементарной ДНК и 20 мкл qPCRmix-HS (ЗАО «Евроген», Россия). Амплификацию проводили в соответствии с рекомендациями производителя (95 °C — 15 мин, 40 циклов: 95 °C — 15 с, 60 °C — 60 с).

Вестерн-блоттинг. Для сравнения уровня GR в клетках РМЖ 500 тыс. клеток лизировали 60 мин при 4 °C и постоянном перемешивании в буфере RIPA (10 мМ Трис; pH 7,4; 150 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 0,1 % додецилсульфат натрия; 0,5 % дезоксихолат натрия; 1 % Тритон-X 100; 10 % глицерин) с добавлением ингибитора протеиназ (Sigma Aldrich, США) и ингибитора фосфатаз (Sigma Aldrich, США). Для оценки влияния лигандов на степень ядерной транслокации GR клетки высевали в 6-луночные планшеты по 500 тыс. клеток в лунку, инкубировали с 10 нМ Dex, CpдA или CpдA-03 в течение 2, 4 и 8 ч. Для выделения тотальной фракции клетки лизировали буфером RIPA. Для выделения ядерной фракции их ресуспендировали в буфере FB (10 мМ HEPES (pH 7,4); 10 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl₂; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ EGTA, ингибитор протеинкиназ), лизировали путем продавливания через иглу калибра 26, инкубировали на льду 20 мин и центрифугировали (720 g, 4 °C, 20 мин). Осадок ресуспендировали в буфере FB и продавливали 10 раз через иглу калибра 23. Центрифугировали в тех же условиях, осадок ресуспендировали в трис-солевом буфере (pH 7,4) и обрабатывали ультразвуком (3 с, 4 °C, мощность 2 амплитуды).

Концентрацию белка измеряли классическим методом Бредфорда [28]. Разделение белков проводили в полиакриламидном геле с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану гибридизировали 16 ч с антителами к pGR-Ser211 (PA5-17668, Invitrogen, США), GR (sc-12763, Santa Cruz Biotechnology, США), гистону H3 (A16235, Abclonal, Китай) или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе GAPDH (Abcam, Великобритания). Далее проводили гибридизацию со вторичными антителами (Abcam, Великобритания). Количественный анализ выполняли с помощью набора Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad, США) с последующей обработкой изображений в программе ImageJ.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполнены в 3 биологических повторах. Для проверки на нормальность применяли критерий Колмогорова—Смирнова. По полученным с помощью вестерн-блоттинга и проточной цитофлуориметрии данным вычислены средние значения (M) и стандартная ошибка среднего (SEM). Результаты представлены в формате M ± SEM. Статистические различия вычислены с помощью пакета программ GraphPad Prism 8 с применением *t*-критерия Стьюдента. Для статистической обработки результатов количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали программное обеспечение GeneGlobe (Qiagen, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка антипролиферативного действия CpdA-03.

Для оценки влияния уровня экспрессии GR на ответ клеток проведен сравнительный анализ уровня экспрессии GR в клетках PMЖ, а также получены сублинии с нокаутом GR (MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR). Экспрессия GR в линии MDA-MB-231 оказалась в 1,5 раза выше, чем в MCF-7 (рис. 2, а). В полученных сублиниях подавление GR составило $75 \pm 5\%$ для линии MCF-7/shGR и $66 \pm 5\%$ для MDA-MB-231/shGR (рис. 2, б). Визуальные наблюдения свидетельствовали о том, что нокаут GR не способствовал гибели или снижению пролиферативной активности клеток PMЖ.

Глюкокортикоиды, как и SEGRA, обладают антипролиферативным действием на клетки PMЖ [26, 29], при этом они применяются курсами в качестве вспомогательных, но не цитотоксических агентов в терапии PMЖ. В связи с этим мы сравнили антипролиферативное влияние CpdA-03, Dex и CpdA путем прямого подсчета жизнеспособных клеток при длительной (120 ч) инкубации в нецитотоксичных дозах (10 нМ), моделируя таким образом курсовое воздействие GC и SEGRA. Выявлено, что за 120 ч CpdA-03 снижает пролиферацию клеток MCF-7 и MDA-MB-231 на 31 ± 15 и $21 \pm 8\%$ соответственно (рис. 3, а). В то же

время пролиферативная активность клеток указанных линий с подавленной экспрессией GR (MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR) остается неизменной. Соединение CpdA-03 индуцирует накопление клеток PMЖ в стационарной (G1) фазе клеточного цикла (рис. 3, б). Доля клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 в фазе G1 увеличилась с $60 \pm 0,4$ до $78 \pm 2,0\%$ и с $49 \pm 1,9$ до $69 \pm 0,4\%$ соответственно.

Анализ влияния CpdA-03 на экспрессию зависимых от глюкокортикоидного рецептора генов. Оценка влияния CpdA-03 на уровень экспрессии GR-зависимых генов в клетках PMЖ проведена с использованием панели лиофилизированных праймеров с помощью количественной ПЦР (рис. 4). Панель генов включает широкий спектр GC-регулируемых генов, степень активации/подавления которых может зависеть от концентраций и времени воздействия. Для сравнительной оценки изменения профилей экспрессии панели генов мы выбрали время инкубации 24 ч. В линии MCF-7 Dex, CpdA и CpdA-03 регулируют экспрессию 18, 19 и 61 гена соответственно, в линии MDA-MB-231 — 77, 82 и 53 генов соответственно. CpdA-03 оказывает ингибирующее действие на гены, кодирующие белки межклеточной адгезии и миграции клеток (*HAS2*, *RHOV*, *RHOJ*, *SNTA1*, *PLEKHF1*, *EHD3*), участвующие в передаче внутриклеточных сигналов (*BMPER*, *PLD1*, *SPHK1*,

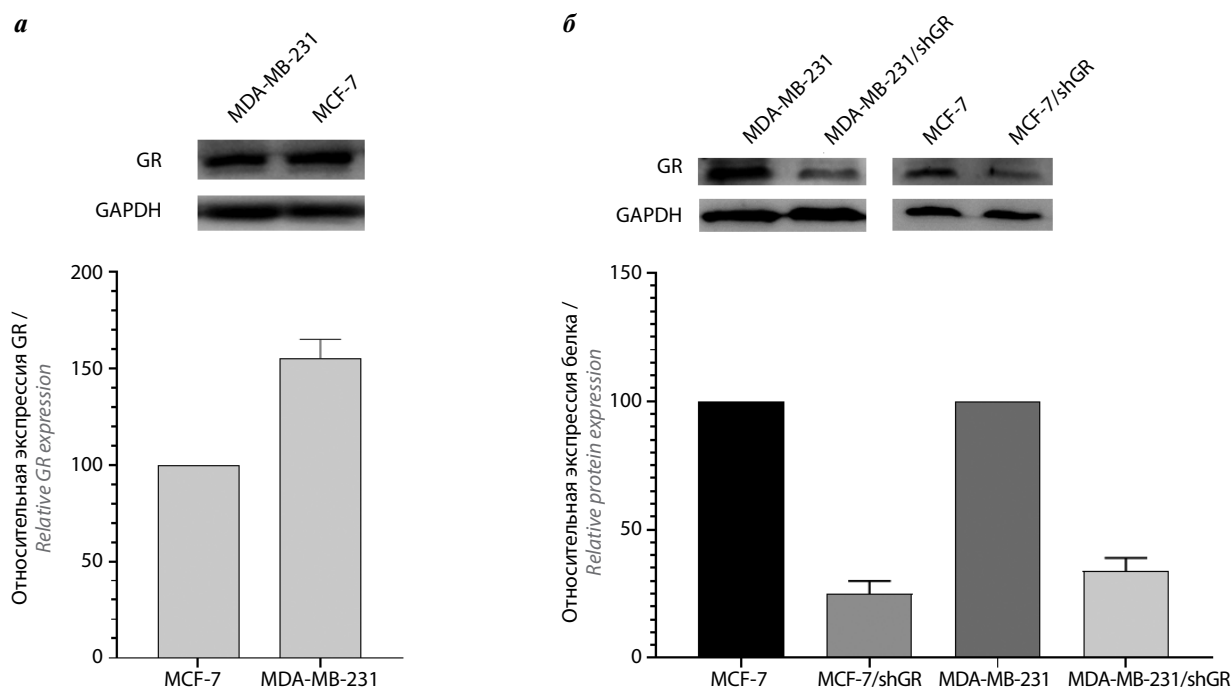


Рис. 2. Относительная экспрессия глюкокортикоидного рецептора (GR) в клетках рака молочной железы. Анализ проведен методом вестерн-блоттинга с использованием антител к GR и GAPDH: а — сравнение уровня экспрессии GR в клетках рака молочной железы. Экспрессия GR в MCF-7 принята за 100 %; б — относительная экспрессия GR в сублиниях MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR. Клетки с нокаутом GR получены путем лентивирусной трансдукции вектора, несущего короткую шпилечную РНК к матричной РНК рецептора. Результаты представлены в процентах относительно контроля

Fig. 2. The relative expression of glucocorticoid receptor (GR) in breast cancer cells. The analysis was performed using Western blotting with antibodies to GR and GAPDH: а — comparison of the GR expression level in breast cancer cells. Glucocorticoid receptor expression in MCF-7 is assumed to be 100 %; б — relative expression of GR in the MCF-7/shGR and MDA-MB-231/shGR. Glucocorticoid receptor knockout cells were obtained by lentiviral transduction of a short hairpin RNA to GR matrix RNA vector. The results are presented as a percentage relative to the control

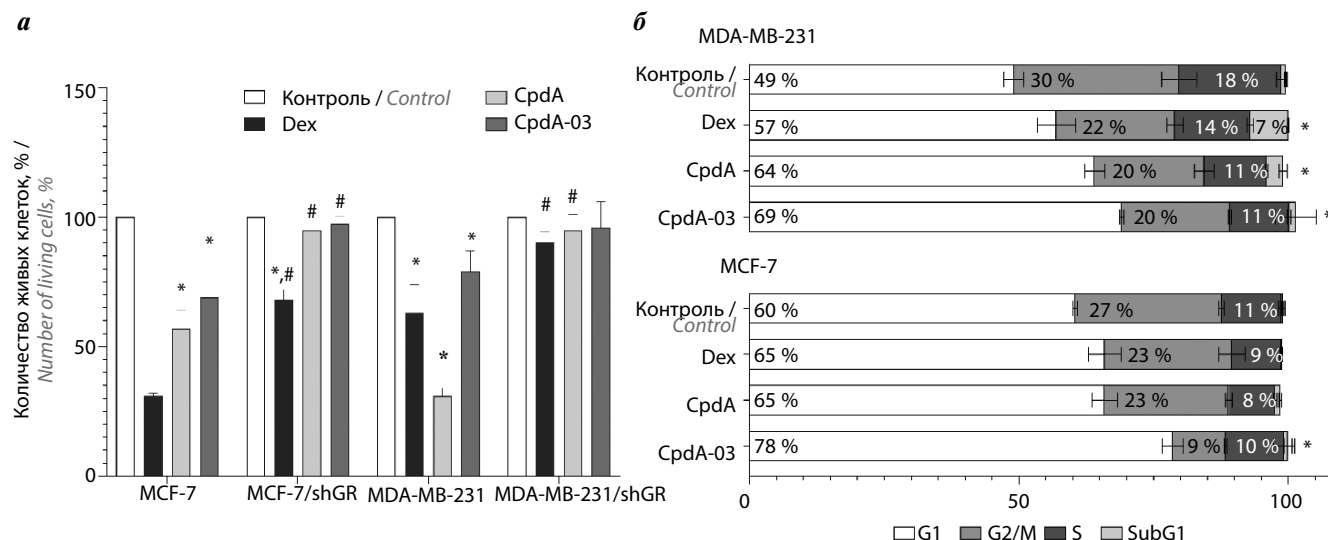


Рис. 3. Антипролиферативное действие Cpda-03 на клетки рака молочной железы: а — результаты прямого подсчета клеток. Клетки инкубировали 120 ч с 10 нМ дексаметазона (Dex), Cpda, Cpda-03 или диметилсульфоксида (ДМСО). Затем проводили подсчет живых клеток методом исключения с использованием красителя трипанового синего. Результаты представлены в виде % от числа клеток в контрольных образцах; б — результаты проточной цитофлуориметрии. Клетки инкубировали 120 ч с 10 нМ Dex, Cpda, Cpda-03 или ДМСО. Затем фиксировали в этаноле, проводили отмывку центрифугированием в PBS, ресуспендировали в PI-буфере и анализировали на проточном цитофлуориметре. *Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). #Статистически значимое различие с соответствующим образцом на линии с нокдауном глюкокортикоидного рецептора

Fig. 3. Antiproliferative effect of Cpda-03 in breast cancer cells: а — live cell count. Cells were cultivated in the presence of 10 nM dexamethasone (Dex), Cpda, Cpda-03 or dimethyl sulfoxide (DMSO) for 120 h, then cells were collected and stained with trypan blue and live cell were counted. Data are presented as % of cells from control; б — cytometry with PI staining. Cells were cultivated in the presence of 10 nM Dex, Cpda, Cpda-03 or DMSO for 120 h, then cells were fixed with ethanol. Then cell were washed and stained with PI and analyzed by flow cytometry. *A statistically significant difference from the control ($p < 0.05$). #A statistically significant difference between results for wild type and shGR cell lines

TNF, USP2), ответе на стресс (DDIT4, PDCD7, SESN1), процессинге РНК (ADAR1), а также факторы транскрипции (FOSL2, TBL1XR1, TNFAIP3, TSC22D3, VDR, ZFP3, ZHX3).

Исследование влияния Cpda-03 на динамику транслокации глюкокортикоидного рецептора в ядро и фосфорилирование по Ser211. В отличие от Dex исследуемый SEGRA Cpda-03 не индуцирует ассоциированное с запуском трансаактивации фосфорилирование GR по Ser211 (рис. 5). В линии MCF-7 наиболее высокий уровень pGR-Ser211 в ядре и цитоплазме наблюдали через 2 ч инкубации с Dex. При этом через 4 ч активный GR находился только в ядре клеток, в тотальной фракции уровень pGR-Ser211 снижался до базального. В то же время в линии ТНРМЖ (MDA-MB-231) наблюдалось времязависимое увеличение pGR-Ser211 в ядерной фракции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Стандартные протоколы терапии РМЖ включают высокие дозы Dex. Этот препарат обладает антипролиферативным действием в отношении опухолевых клеток, а также способностью снижать побочные эффекты цитостатических препаратов. Однако применение GC ассоциировано с возникновением большого количества нежелательных явлений начиная от дисбаланса всех метаболических систем организма

и заканчивая усилением метастазирования. Активация транскрипции GR-зависимых генов в клетках РМЖ приводит к инвазии и миграции опухолевых клеток, развитию резистентности клеток РМЖ к противоопухолевым препаратам, а также к ряду метаболических осложнений [5–14]. Препараты класса SEGRA обладают терапевтическим действием, сравнимым с действием классических GC, при этом их применение не вызывает трансаактивацию GR и реализацию связанных с ней нежелательных явлений. Эффективность препаратов класса SEGRA показана для многих нозологий, включая опухоли системы крови [19–25].

Результаты нашего исследования показали, что новый препарат класса SEGRA (Cpda-03) обладает сравнимым с Cpda и Dex цитостатическим действием на клетки люминального РМЖ и ТНРМЖ. Необходимо отметить, что данный эффект зависел от количества активного GR в клетках, поскольку на пролиферативную активность клеток с подавленной экспрессией GR (MCF-7/shGR и MDA-MB-231/shGR) Cpda и Cpda-03 не влияли. Дексаметазон снижал пролиферацию клеток люминального РМЖ с подавленной экспрессией GR (MCF-7/shGR), поскольку GC обладают способностью регулировать ERα [30]. Отсутствие подобной корреляции в цитостатических эффектах SEGRA косвенно свидетельствует о том, что они не являются лигандами ERα. Данное наблюдение подтверждает, что

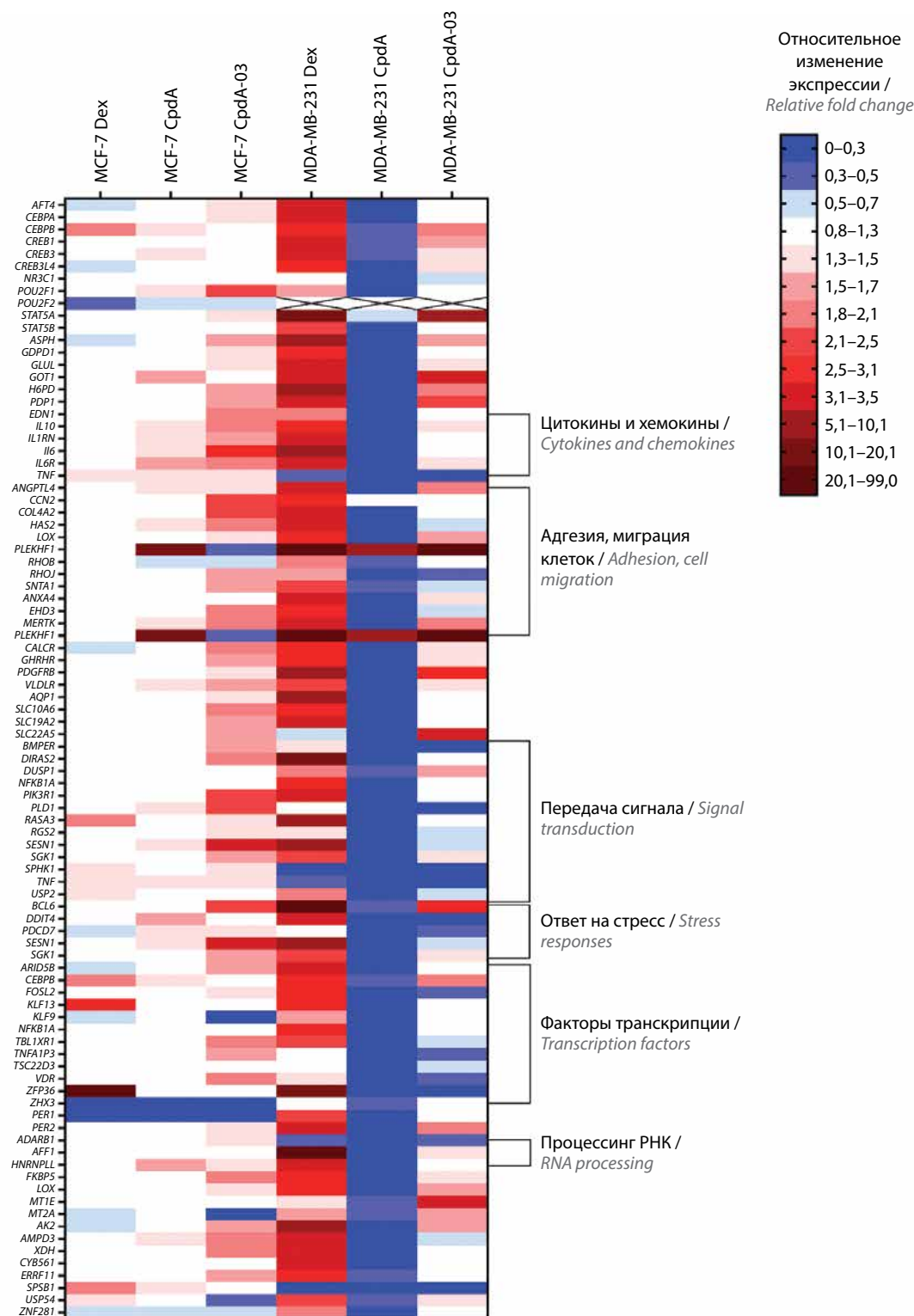


Рис. 4. Оценка экспрессии глюкокортикоид-респонсивных генов в клетках рака молочной железы. Клетки инкубировали с 10 нМ Cpda-03, Cpda или дексаметазона (Dex) в течение 24 ч. Относительное изменение экспрессии оценивали с помощью набора RT2 Profiler™ PCR Array Human Glucocorticoid Signaling PAHS-154Z (Qiagen, Германия). Результаты анализа представлены в виде тепловой диаграммы, иллюстрирующей относительное изменение экспрессии генов

Fig. 4. Analysis of glucocorticoid-response genes expression. Cells were cultivated in the presence of 10 nM Cpda-03, Cpda or dexamethasone (Dex) for 24 h. Relative fold change were evaluated by RT2 Profiler™ PCR Array Human Glucocorticoid Signaling PAHS-154Z (Qiagen, Germany) assay. Data were presented as heat map of relative fold change

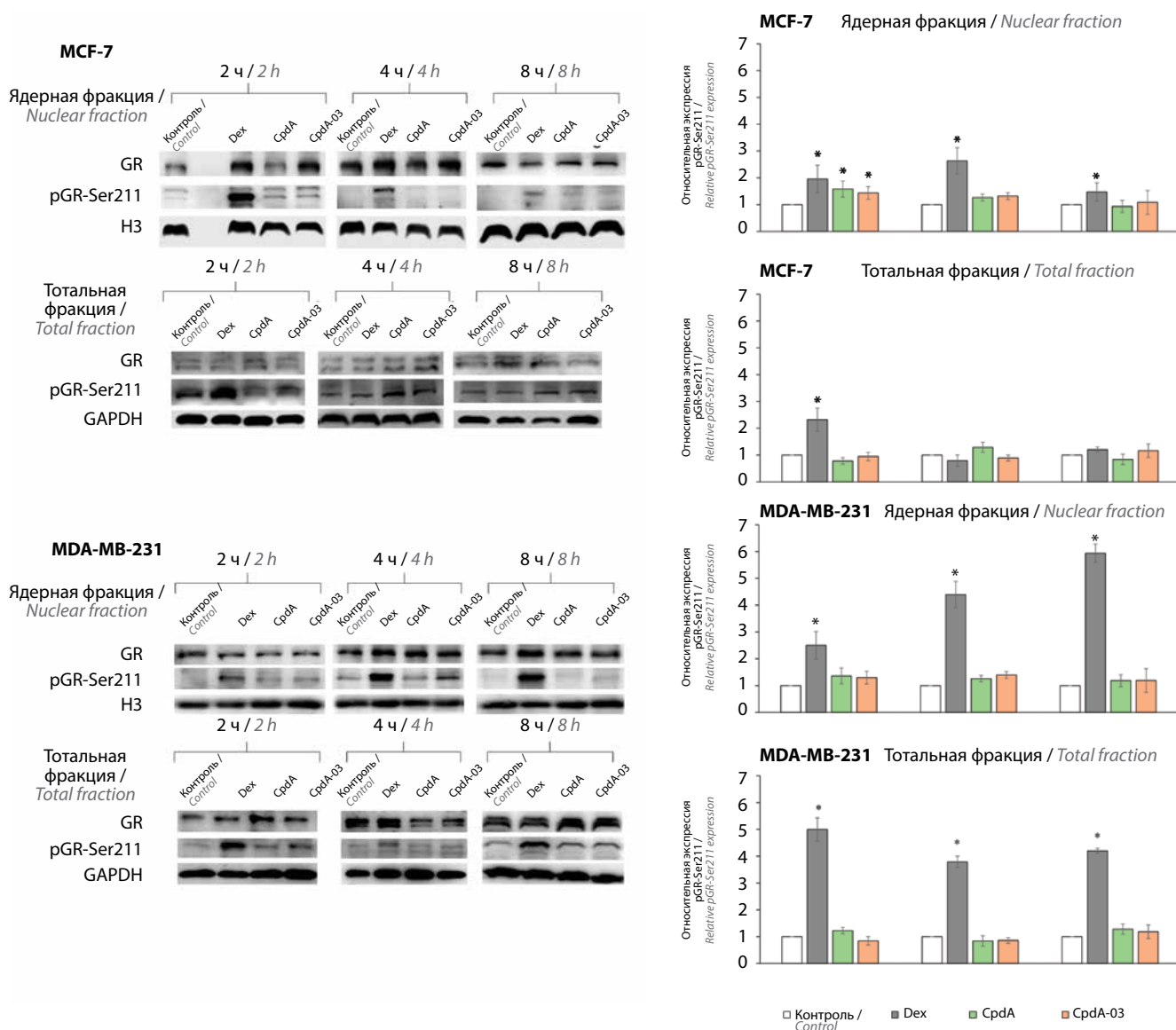


Рис. 5. Динамика транслокации и фосфорилирования глюкокортикоидного рецептора (GR). Клетки инкубировали с 10 нМ CpdA-03, CpdA и дексаметазона (Dex) в течение 2, 4 или 8 ч. Уровень экспрессии белков определяли методом вестерн-блоттинга с использованием специфичных антител к GR или pGR-Ser211. Представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно уровня гистона H3 или GAPDH. *Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$)

Fig. 5. Glucocorticoid receptor (GR) nuclear translocation and phosphorylation. Cells were cultivated in the presence of 10 nM dexamethasone (Dex), CpdA, CpdA-03 for 2, 4 or 8 h, then western blot analysis of GR and pGR-Ser211 in total and nuclear protein fraction were performed. GAPDH or histone H3 served as loading control. *A statistically significant difference from the control ($p < 0.05$)

антипролиферативное действие CpdA-03 в клетках РМЖ различных биологических подтипов реализуется посредством активации GR. Результаты цитофлуориметрического анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла продемонстрировали, что CpdA-03 вызывает арест клеток РМЖ в фазе G1 клеточного цикла. В целом показано, что клетки линии ТНРМЖ (MDA-MB-231) более восприимчивы к лигандам GR, чем клетки люминального РМЖ (MCF-7). Стоит отметить, что клетки MCF-7 изначально обладают менее агрессивным фенотипом, меньшим миграционным потенциалом и слабой подвижностью по сравнению с линией MDA-MB-231 [31].

Известно, что фосфорилирование в положении Ser211 является основным маркером трансаактивации GR [32], которая связана с реализацией основных побочных эффектов GC. В клетках РМЖ Dex индуцирует фосфорилирование довольно быстро (за 2–4 ч), в то время как при действии соединений класса SEGRA уровень фосфорилирования рецептора остается неизменным относительно контроля. Результаты нашего исследования показали, что CpdA и CpdA-03 не индуцируют не только ядерную транслокацию, но и трансаактивационное фосфорилирование GR. CpdA и его синтетический аналог CpdA-03 также не приводят к увеличению транскрипции GC-зависимых транскрипционных

факторов (*NFKBIA*, *KLF9*, *KLF13*, *FOSL2*) и кофакторов GR (семейство CREB). Более того, SEGRA снижают экспрессию гена *NR3C1*, кодирующего GR, в клетках ТНРМЖ.

Реализация антипролиферативных и иных эффектов SEGRA CpdA и CpdA-03, вероятно, не связана с ядерной транслокацией GR и опосредуется тетерингом (белок-белковым взаимодействием комплекса лиганда с GR и других транскрипционных факторов). Индукция фосфорилирования и ядерной транслокации, а также запуск GC-зависимых генов при действии Dex наиболее выражены в клетках ТНРМЖ, что, вероятно, связано с разницей в базальном уровне экспрессии GR в клетках. Изменение профиля экспрессии GR-зависимых генов в клетках MDA-MB-231 после воздействия препаратов группы SEGRA также более выражено по сравнению с ответом клеток люминального РМЖ (MCF-7) (затрагивает большее число генов, уровень изменений также более выражен).

Стоит отметить, что SEGRA, в отличие от Dex, не вызывают активации гена *DDIT4*, опосредующего развитие GC-индуцированного остеопороза и атрофии кожи [33]. Также CpdA и CpdA-03 снижают уровень экспрессии киназ RHOV и RHOJ, гиперэкспрессия которых коррелирует с неблагоприятным прогнозом и высоким риском метастазирования РМЖ [34, 35]. В целом под действием CpdA наблюдается подавление большей части исследуемых GR-зависимых генов (81 из 83), при этом CpdA-03 ингибирует 52 из 83 исследуемых генов или не влияет на их экспрессию. Данные различия связаны с более высоким сродством CpdA к GR, что показано нами ранее *in vitro* [25]. Поскольку в литературе описаны связь экспозиции GC и усиление метастатического потенциала РМЖ [7, 8, 36], наблюдаемые различия во влиянии GC

и изучаемых SEGRA на группу генов, регулирующих адгезию и миграцию клеток ТНРМЖ, представляют особый интерес. В частности, в настоящее время назначение GC пациенткам с РМЖ проводится на основании симптомов без учета молекулярного подтипа опухоли и уровня экспрессии GR. Более широкое исследование влияния GC и SEGRA на экспрессию генов и белков данной группы позволит выявить молекулярные механизмы GR-опосредованного метастазирования РМЖ, ввести в диагностическую практику определение статуса GR у пациенток с данной патологией и персонализировать лечение.

Также стоит отметить, что ниша противовоспалительных лекарственных препаратов на основе SEGRA довольно широка, а исследования их активности в отношении опухолей проведены только для нестабильного низкомолекулярного соединения CpdA. Полученные нами данные продемонстрировали GR-зависимое антипролиферативное действие нового соединения класса SEGRA CpdA-03 в отношении клеток РМЖ *in vitro*. Показан избирательный запуск транскрипции GR, опосредующий снижение жизнеспособности клеток. Высокая стабильность молекулы CpdA-03 и ее селективность в отношении активации GR делают ее первым перспективным препаратом класса SEGRA, способным заменить GC в онкологической практике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные линии РМЖ с высоким базальным уровнем экспрессии GR чувствительны к действию SEGRA CpdA-03. Новый SEGRA CpdA-03 потенциально является более безопасной альтернативой классическим GC в терапии ТНРМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bray F., Laversanne M., Sung H. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2024;74(3):229–63. DOI: 10.3322/caac.21834
- Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой, И.В. Лисичниковой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2023. 275 с. Malignant tumors in Russia in 2022 (morbidity and mortality). Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova, I.V. Lisichnikova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2023. 275 p. (In Russ.).
- Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406(6797):747–52. DOI: 10.1038/35021093
- Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жигулев А.Н. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Злокачественные опухоли 2023;13(3s2):157–200. DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200 Tyulyandin S.A., Artamonova E.V., Zhigulev A.N. et al. Practical recommendations for the drug treatment of breast cancer. *Zlokachestvennye opukholi* = Malignant Tumors 2023;13(3s2):157–200. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2023-13-3s2-1-157-200
- Karmakar S., Jin Y., Nagaich A.K. Interaction of glucocorticoid receptor (GR) with estrogen receptor (ER) α and activator protein 1 (AP1) in dexamethasone-mediated interference of ER α activity. *J Biol Chem* 2013;288(33):24020–34. DOI: 10.1074/jbc.M113.473819
- Keith B.D. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC Cancer* 2008;8:84. DOI: 10.1186/1471-2407-8-84
- West D.C., Pan D., Tonsing-Carter E.Y. et al. GR and ER coactivation alters the expression of differentiation genes and associates with improved ER+ breast cancer outcome. *Mol Cancer Res* 2016;14(8):707–19. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0433
- Pan D., Kocherginsky M., Conzen S.D. Activation of the glucocorticoid receptor is associated with poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Res* 2011;71(20):6360–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0362
- Wu W., Chaudhuri S., Brickley D.R. et al. Microarray analysis reveals glucocorticoid-regulated survival genes that are associated with inhibition of apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res* 2004;64(5):1757–64. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-2546

10. Sumikawa T., Shigeoka Y., Igishi T. et al. Dexamethasone interferes with trastuzumab-induced cell growth inhibition through restoration of AKT activity in BT-474 breast cancer cells. *Int J Oncol* 2008;32(3):683–8.
11. Kim M.J., Chae J.S., Kim K.J. et al. Negative regulation of SEK1 signaling by serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase 1. *EMBO J* 2007;26(13):3075–85. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601755
12. Pang D., Kocherginsky M., Krausz T. et al. Dexamethasone decreases xenograft response to Paclitaxel through inhibition of tumor cell apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2006;5(8):933–40. DOI: 10.4161/cbt.5.8.2875
13. Sui M., Chen F., Chen Z., Fan W. Glucocorticoids interfere with therapeutic efficacy of paclitaxel against human breast and ovarian xenograft tumors. *Int J Cancer* 2006;119(3):712–7. DOI: 10.1002/ijc.21743
14. Zambrano J., Yeh E.S. Autophagy and apoptotic crosstalk: mechanism of therapeutic resistance in HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 2016;10:13–23. DOI: 10.4137/BCBCR.S32791
15. Karantza-Wadsworth V., Patel S., Kravchuk O. et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007;21(13):1621–35. DOI: 10.1101/gad.1565707
16. Wu W.K., Coffelt S.B., Cho C.H. et al. The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene* 2012;31(8):939–53. DOI: 10.1038/onc.2011.295
17. Groeneweg F.L., van Royen M.E., Fenz S. et al. Quantitation of glucocorticoid receptor DNA-binding dynamics by single-molecule microscopy and FRAP. *PLoS One* 2014;9(3):e90532. DOI: 10.1371/journal.pone.0090532
18. Ramamoorthy S., Cidlowski J.A. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr Dev* 2013;24:41–56. DOI: 10.1159/000342502
19. Sundahl N., Bridelance J., Libert C. et al. Selective glucocorticoid receptor modulation: new directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol Ther* 2015;152:28–41. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.05.001
20. Van Moortel L., Gevaert K., De Bosscher K. Improved glucocorticoid receptor ligands: fantastic beasts, but how to find them? *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:559673. DOI: 10.3389/fendo.2020.559673
21. Lesovaya E.A., Yemelyanov A.Y., Kirsanov K.I. et al. Antitumor effect of non-steroid glucocorticoid receptor ligand CpdA on leukemia cell lines CEM and K562. *Biochemistry (Mosc)* 2011;76(11):1242–52. DOI: 10.1134/S000629791111006X
22. Yemelyanov A., Czwornog 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
23. Tanner T.M., Verrijdt G., Rombauts W. et al. Anti-androgenic properties of Compound A, an analog of a non-steroidal plant compound. *Mol Cell Endocrinol* 2003;201(1–2):155–64. DOI: 10.1016/s0303-7207(02)00411-2
24. Wüst S., Tischner D., John M. et al. Therapeutic and adverse effects of a non-steroidal glucocorticoid receptor ligand in a mouse model of multiple sclerosis. *PLoS One* 2009;4(12):e8202. DOI: 10.1371/journal.pone.0008202
25. Zhidkova E.M., Tilova L.R., Fetisov T.I. et al. Synthesis and anti-cancer activity of the novel selective glucocorticoid receptor agonists of the phenylethanamine series. *Int J Mol Sci* 2024;25(16):8904. DOI: 10.3390/ijms25168904
26. Жидкова Е.М., Кузин К.А., Тилова Л.Р. и др. Сравнительный анализ биологических эффектов селективного агониста глюкокортикоидного рецептора CpdA на клеточные линии рака молочной железы различных молекулярных подтипов. *Сибирский онкологический журнал* 2017;16(6):41–6. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6-41-46
27. Zhidkova E.M., Kuzin K.A., Tilova L.R. et al. Comparative analysis of biological effects of selective activator of the glucocorticoid receptor CpdA on different subtypes of breast cancer cell lines. *Sibirskiy onkologicheskij zhurnal = Siberian Journal of Oncology* 2017;16(6): 41–6. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-6- 41-46
28. 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
29. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
30. Chen Z., Lan X., Wu D. et al. Ligand-dependent genomic function of glucocorticoid receptor in triple-negative breast cancer. *Nat Commun* 2015;6:8323. DOI: 10.1038/ncomms9323
31. Tonsing-Carter E., Hernandez K.M., Kim C.R. et al. Glucocorticoid receptor modulation decreases ER-positive breast cancer cell proliferation and suppresses wild-type and mutant ER chromatin association. *Breast Cancer Res* 2019;21(1):82. DOI: 10.1186/s13058-019-1164-6
32. Neve R.M., Chin K., Fridlyand J. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006;10(6):515–27. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.10.008
33. Wang Z., Frederick J., Garabedian M.J. Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor *in vivo*. *J Biol Chem* 2002;277(29):26573–80. DOI: 10.1074/jbc.M110530200
34. Baida G., Bhalla P., Kirsanov K. et al. REDD1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. *EMBO Mol Med* 2015;7(1):42–58. DOI: 10.15252/emmm.201404601
35. Bou Malhab L.J., Nair V.A., Qaisar R. et al. Towards understanding the development of breast cancer: the role of rhoj in the obesity microenvironment. *Cells* 2024;13(2):174. DOI: 10.3390/cells13020174. DOI: 10.3390/cells13020174
36. Fritz G., Brachetti C., Bahlmann F. et al. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* 2002;87(6):635–44. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600510
37. Obradovic M.M.S., Hamelin B., Manevski N. et al. Glucocorticoids promote breast cancer metastasis. *Nature* 2019;567(7749):540–4. DOI: 10.1038/s41586-019-1019-4

Вклад авторов

Е.М. Жидкова: выполнение ПЦР, подсчет клеток, анализ и интерпретация результатов, подготовка иллюстраций, написание текста статьи;
В.П. Максимова: проведение проточной цитофлуориметрии;
Д.Д. Григорьева: проведение вестерн-блоттинга;
В.З. Ширинян: проведение синтеза CpdA-03, подготовка иллюстраций, написание текста статьи;
М.Г. Якубовская: написание текста статьи;
Е.А. Лесовая: подготовка иллюстраций, написание текста статьи.

Authors' contributions

E.M. Zhidkova: performing PCR, counting cells, analyzing and interpreting the results, preparing illustrations, article writing;
V.P. Maksimova: conducting flow cytometry;
D.D. Grigoreva: conducting Western blotting;
V.Z. Shirinyan: carrying out the synthesis of CpdA-03, preparing illustrations, article writing;
M.G. Yakubovskaya: article writing;
E.A. Lesovaya: preparing illustrations, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.М. Жидкова / E.M. Zhidkova: <https://orcid.org/0000-0003-3318-9391>
В.П. Максимова / V.P. Maksimova: <https://orcid.org/0000-0003-0896-2952>
Д.Д. Григорьева / D.D. Grigoreva: <https://orcid.org/0000-0003-2675-089X>
В.З. Ширинян / V.Z. Shirinyan: <https://orcid.org/0000-0001-9480-3565>
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>
Е.А. Лесовая / E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the local biomedical ethics committees of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.