Czynniki transkrypcyjne FOXO – potencjalny punkt uchwytu leczenia chorób cywilizacyjnych

Agnieszka Przezak¹, Weronika Bielka¹, Tomasz Sroczyński¹

¹ Katedra i Zakład Fizjologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

FOXO transcription factors – a potential therapeutic target in civilization diseases

Forkhead box O family member proteins (FOXOs) are nuclear transcription factors which mediate the inhibitory action of insulin or insulin-like growth factor (IGF-1) on key functions in cells. They are expressed in nearly all tissues and they participate in controlling a large amount of processes occurring in cells such as proliferation and differentiation of cells, cell cycle progression, apoptosis, or reparation of deoxyribonucleic acid. Furthermore, they are involved not only in oxidative stress response or redox signaling, but also in glucose and lipids metabolism. They are generally responsible for maintaining the cellular homeostasis in response to changes in internal and external environment. The group of described molecules consists of four protein members called FOXO1 (FKHR), FOXO3A (FKHRL1), FOXO4 (AFX1) and FOXO6. The impaired activity of FOXO proteins is associated with development of metabolic syndrome and civilization diseases, including diabetes mellitus, its complications (diabetic nephropathy, retinopathy, diabetes-related muscle atrophy, cardiovascular diseases, impaired fracture and wound healing) and different types of cancers (prostate cancer, gliomas, thymic lymphomas, angiomas). There are two groups of synthesized chemical molecules that affect activity of FOXO1 and may be useful for treating for metabolic diseases, such as inhibitors of FOXO1 or modulators of signaling pathway of the gene *FOXO1*. Substances naturally occurring in the environment (for instance curcumin or magnoflorine) show similar properties and abilities to modulate action of all kind of FOXO proteins. In our article we describe, the role of FOXO transcription factors in a state of health and disease, especially in civilization diseases. Moreover, we briefly present already synthesized pharmaceutical drugs and natural substances which may affect the activity of these proteins, as well as we point at potential targets for future interventions in civilization diseases based on modifications of proteins FOXO activity or their genes.

Keywords: FOXO transcription factors, diabetes mellitus, metabolic syndrome, cancers.

Adres do korespondencji

Agnieszka Przezak, Katedra i Zakład Fizjologii,
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie,
Al. Powstańców Wielkopolskich 72,
70-111 Szczecin, Polska;
e-mail: pawand@poczta.onet.pl

Źródła finansowania

Projekt finansowany przez Ministra Nauki
i Szkolnictwa Wyższego w programie „Regionalna
Inicjatywa Doskonałości” w latach 2019–2022,
nr 002 / RID / 2018/19.

Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2020.12.15

Zaakceptowano: 2020.12.21

Opublikowano on-line: 2021.01.05

DOI

10.32383/farmopol/132182

ORCID

Agnieszka Przezak (ORCID id: 0000-0003-1164-3960)

Tomasz Sroczyński (ORCID id: 0000-0003-3056-3253)

Weronika Bielka (ORCID id: 0000-0001-6893-4844)

Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,
na licencji CC BY NC
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Wstęp

Białka FOXO (ang. *forkhead box class O*) są czynnikami transkrypcyjnymi, które uczestniczą w kontrolowaniu różnorodnych procesów komórkowych [1, 2]. Należą do nich cztery cząsteczki: FOXO1 (FKHR), FOXO3A (FKHRL1), FOXO4 (AFX1) i FOXO6, mające wpływ na różne mechanizmy ekspresji genów [3]. Służą to utrzymaniu wewnątrzkomórkowej homeostazy w odpowiedzi na zmiany środowiska wewnętrznego i zewnętrznego. Dotychczasowe badania na modelach zwierzęcych opierające się na zahamowaniu działania poszczególnych białek FOXO podkreślają ich duże znaczenie w fizjologii. Ablacja genu *FOXO1* w komórkach embrionalnych prowadzi do nieprawidłowego rozwoju naczyń i w efekcie jest letalna [4, 5]. Ablacja *FOXO3A* powoduje u myszy bezpłodność, nieprawidłowy rozwój pęcherzyków jajnikowych [6] i obniżenie puli macierzystych komórek nerwowych [7], a także pojawienie się rozległego stanu zapalnego w wielu narządach [6]. Ablacja *FOXO4* wzmacnia proces zapalny w jelicie grubym w odpowiedzi na czynniki zapalne [8], natomiast ablacja *FOXO6* prowadzi do nieprawidłowej konsolidacji pamięciowej bez wpływu na zdolność do uczenia się [9]. Mutacje w genach kodujących FOXO lub zmieniona ekspresja tych białek prowadzi do rozwoju cukrzycy, nowotworów oraz skrócenia długości życia u ssaków [10, 11].

Białka FOXO działają jako jądrowe czynniki transkrypcyjne, które pośredniczą w kaskadzie reakcji wyzwalanych przez insulinę i IGF-1, mających na celu zahamowanie wybranych funkcji komórki [1]. Aktywność omawianych białek jest regulowana przede wszystkim przez potranslacyjne modyfikacje [2], których działanie opiera się na trzech głównych mechanizmach: transporcie FOXO z lub do jądra komórkowego, zmianie powinowactwa FOXO do DNA oraz modyfikacji aktywności transkrypcyjnej FOXO. Są to przede wszystkim fosforylacja, acetylacja i glikozylacja [12].

W niniejszym artykule przedstawiono potencjalne możliwości wpływu farmakologicznego na aktywność czynników transkrypcyjnych FOXO w komórkach, co stworzy nowe opcje terapeutyczne w wybranych chorobach cywilizacyjnych.

Choroby metaboliczne

Można wyróżnić dwie grupy leków związanych z FOXO1, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób metabolicznych – inhibitory białka FOXO1 oraz modulatory ścieżki sygnałowej genu *FOXO1* [13].

Do inhibitorów FOXO1 należy AS1842856 (kwas 5-amino-7-(cykloheksylamino)-1-etylo-6-fluoro-

4-okso-1,4-dihydrochinolino-3-karboksylowy), który łączy się bezpośrednio i selektywnie z czynną formą białka FOXO1, blokując jej aktywność transkrypcyjną. Doustne podanie AS1842856 myszom z wyindukowaną cukrzycą skutkowało znacznym spadkiem glikemii na czczo oraz zahamowaniem ekspresji genów odpowiedzialnych za glukoneogenezę [14]. Inna cząsteczka, AS1708727, spowodowała u myszy znaczną redukcję glikemii i poziomu trójglicerydów oraz zmniejszoną ekspresję wątrobowych enzymów kluczowych dla procesu glukoneogenezy (glukozy-6-fosfatazy i karboksykinazy fosfoenolopirogronianowej) oraz apolipoproteiny apoC-III [15].

Inną możliwością wpływu na czynniki transkrypcyjne FOXO jest modyfikacja białek, które w prawidłowych warunkach oddziałują z FOXO, co pośrednio przekłada się na zmianę aktywności tych czynników. Proteina związana z masą tłuszczową i otyłością (ang. *fat mass and obesity-related protein*, FTO) powoduje zwiększenie ekspresji mRNA *FOXO1*. Selektywne zahamowanie tego białka doprowadzi do zmniejszenia puli cząsteczek FOXO1. Odkryto, że entakapon i jego analogi mają zdolność inhibicji białka FTO, dzięki czemu zmniejszają ekspresję *FOXO1*, co prowadzi do zahamowania glukoneogenezy i indukcji termogenezy u myszy. Doniesienia te sugerują możliwość zastosowania entakaponu w leczeniu cukrzycy typu II i otyłości [16].

Powikłania cukrzycy

Wysoki poziom glukozy u pacjentów z cukrzycą indukuje stres oksydacyjny, który prowadzi do apoptozy komórek nabłonka barwnikowego w siatkówce i rozwoju retinopatii cukrzycowej [17]. Zaobserwowano, że zmianom tym towarzyszy nadekspresja FOXO6. Zablockowanie genu *FOXO6* w badaniach spowodowało redukcję liczby komórek siatkówki ulegających apoptozie oraz osłabiło produkcję reaktywnych form tlenu, aldehydu malonowego, a także przywróciło aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, prowadząc do zmniejszenia nasilenia stresu oksydacyjnego. Powyższe wnioski sugerują, że zablockowanie *FOXO6* może być potencjalnym celem terapeutycznym w zapobieganiu wystąpieniu lub późniejszym leczeniu retinopatii cukrzycowej [18].

W badaniach przeprowadzonych nad kurkumina, substancją zawartą w kurkumie [19], została zaobserwowana jej właściwość nefroprotektoryjna. Kurkumina podawana doustnie szczurom z wyindukowaną cukrzycą spowodowała znaczącą redukcję stężenia mocznika, azotu mocznika i kreatyniny we krwi oraz zmniejszenie stężenia albuminy w moczu i wzrost klirensu kreatyniny,

przy jednoczesnym braku wpływu na poziom glukozy czy insuliny w surowicy. Zapobiegła ona także uszkodzeniu kanalików nerkowych i mitochondriów, rozplemowi komórki mezangium oraz pogrubieniu błony podstawnej. U szczurów, którym suplementowano kurkuminę, zaobserwowano między innymi zwiększenie poziomu FOXO3A w jądrze komórkowym, co może być jednym z potencjalnych mechanizmów odpowiadających za nefroprotektoryjne właściwości kurkuminy. Kurkumina może być potencjalnie stosowana u pacjentów z nefropatią cukrzycową z powodu jej zapobiegającego wpływu przed uszkodzeniem nerek i zdolności do zmniejszania albuminurii [20].

Istotnym problemem pacjentów chorujących na cukrzycę jest upośledzone gojenie ran. Jest to związane między innymi z czynnikiem transkrypcyjnym FOXO1, którego aktywność jest regulowana przez obecny w warunkach stanu zapalnego czynnik martwicy nowotworów α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), co prowadzi do nasilenia apoptozy i zmniejszonej proliferacji fibroblastów [21, 22]. Badania *in vitro* sugerują, że FOXO1 może negatywnie oddziaływać na fibroblasty poprzez ekspresję czynników proapoptycznych [23]. Z tego powodu FOXO1 może stanowić w przyszłości cel terapeutyczny, zwłaszcza u pacjentów cierpiących na zespół stopy cukrzycowej.

Pacjenci z cukrzycą borykają się nie tylko z problemem upośledzonego gojenia ran, ale także z trudnością w gojeniu złamań [24]. W cukrzycy z powodu wysokiego poziomu TNF- α dochodzi do zwiększenia aktywacji FOXO1 i nasilenia apoptozy chondrocytów w kostninie [25], a także nasilonej resorpcji tychże chondrocytów [26]. W badaniach na myszach udowodniono, że delecja genu *FOXO1* w chondrocytach zapobiega wywieraniu negatywnego efektu cukrzycy na mechaniczną siłę w gojącym się złamaniu [27], co sugeruje kolejny potencjalny cel uchwytu w terapii powikłań cukrzycy.

Jednym z rzadszych powikłań cukrzycy jest cukrzycowa martwica mięśni. Zaobserwowano, że magnofloryna, alkaloid szeroko rozpowszechniony wśród roślin należących do magnoliowatych, berberysowatych czy makowatych [28], nie tylko zapobiega martwicy mięśni, lecz także zwiększa miogenezę. Zastosowanie magnofloryny u myszy z wyindukowaną cukrzycą zapobiegło utracie masy ciała, spowodowało redukcję glikemii, zwiększyło masę mięśni dzięki ochronie przed degradacją, obniżyło poziom stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego w mięśniach poprzez wpływ na ekspresję genów związanych z atrofią mięśni szkieletowych. Te efekty zostały osiągnięte między innymi poprzez zmniejszenie aktywności czynników FOXO i zmniejszenie ekspresji genów

regulowanych przez nie. Dzięki swojemu działaniu magnofloryna może w przyszłości zostać zastosowana w terapii cukrzycowej martwicy mięśni i związanej z cukrzycą kacheksji [29].

Choroby układu sercowo-naczyniowego

Utrata właściwej regulacji białka FOXO1 może być związana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju kardiomiopatii cukrzycowej [30]. Podwyższony poziom glukozy i lipidów we krwi, obserwowany w cukrzycy, może prowadzić do nieodwracalnych morfologicznych i funkcjonalnych zmian w mięśniu sercowym [31]. Indukowana hiperglikemią i opornością na insulinę aktywacja FOXO1 w kardiomiocytach prowadzi do upośledzenia kurczliwości mięśnia sercowego [32]. Myszy ze specyficzną dla mięśnia sercowego inhibicją FOXO1 były chronione przed rozwinieniem kardiomiopatii cukrzycowej, co było związane z redukcją ekspresji genu *PDK4* (genu kodującego kinazę inaktywującą dehydrogenazę pirogronianową), a w konsekwencji zwiększeniem metabolizmu glukozy. To sugeruje kluczową rolę FOXO1 w regulowaniu metabolizmu mięśnia sercowego i zamianie utleniania wolnych kwasów tłuszczowych na utlenianie glukozy [33]. Ponadto, FOXO1 przyczynia się do akumulacji lipidów w kardiomiocytach poprzez zwiększony przepływ wolnych kwasów tłuszczowych, co ma miejsce w otyłości, dyslipidemii i cukrzycy [34]. Selektywne inhibitory FOXO1 mogą znaleźć zastosowanie w zapobieganiu rozwojowi chorób układu sercowo-naczyniowego u pacjentów z cukrzycą [31].

Nowotwory

Czynnik transkrypcyjny FOXO1 pełni funkcję supresorową w rozwoju guzów, a jego inaktywacja została udowodniona w wielu typach ludzkich nowotworów. Aktywacja FOXO1 hamuje przeżycie komórek nowotworu prostaty i glejaków poprzez nasilenie ekspresji proapoptycznych czynników [35, 36]. Nasilenie aktywacji FOXO1 może ograniczać przerzutowanie komórek raka prostaty poprzez hamowanie ich migracji i inwazji [37]. Natomiast równoczesna delecja genów *FOXO1*, *FOXO3A* i *FOXO4* zwiększa podatność na powstawanie chłoniaków grasicy i naczyniaków. Całkowita utrata funkcji genu *FOXO* w tymocytach prowadzi do nasilenia proliferacji komórek i ich przetrwania, a w konsekwencji – do powstawania chłoniaków [38]. Wiele współcześnie stosowanych chemioterapeutyków (np. paklitaksel, dokсорubicyna, epirubicyna, lapatynib, gefitynib, imatynib, czy cisplatyna) wykazuje działanie przeciwnowotworowe poprzez, między innymi,

aktywację czynników FOXO, a utrata aktywności FOXO w komórkach nowotworowych może odpowiadać za występowanie zjawiska oporności na leczenie [39]. Także substancje występujące naturalnie w żywności, takie jak resweratrol czy kwercetyna, ograniczają wzrost nowotworów poprzez aktywację czynników FOXO [40]. Modyfikacja aktywności białek FOXO może być wykorzystywana w przyszłości do stworzenia nowych strategii leczenia nowotworów, zwłaszcza w przypadku wystąpienia oporności na typowe leczenie standardowymi lekami.

Podsumowanie

Czynniki transkrypcyjne FOXO, ze względu na swoje rozpowszechnienie w tkankach i wielokierunkowość działań, mogą stanowić cel terapeutyczny w wielu jednostkach chorobowych, zwłaszcza w chorobach, które w dzisiejszym świecie stanowią główny problem zdrowotny społeczeństw w krajach wysoko rozwiniętych i rozwijających się. Niezbędne są dalsze badania nad fizjologicznym działaniem białek FOXO, nad ich udziałem w patogenezie chorób cywilizacyjnych oraz nad substancjami, które selektywnie oddziaływałyby na FOXO w danej tkance czy komórce i które można byłoby zastosować w terapii chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy, zespołu metabolicznego czy nowotworów.

Piśmiennictwo

- Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004; 117(4): 421–426. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00452-0.
- Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, Koo CY. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(7): 482–495. doi: 10.1038/nrc3539.
- Kaestner KH, Knöchel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/Forkhead transcription factors. *Genes Dev*. 2000; 14(2): 142–146. Dostępny w Internecie: <http://genesdev.cshlp.org/content/14/2/142.long>. Dostęp: 19.11.2020.
- Furuyama T, Kitayama K, Shimoda Y, Ogawa M, Sone K, Yoshida-Araki K, Hisatsune H, Nishikawa S, Nakayama K, Nakayama K, Ikeda K, Motoyama N, Mori N. Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J Biol Chem*. 2004; 279(33): 34741–34749. doi: 10.1074/jbc.M314214200.
- Hosaka T, Biggs WH 3rd, Tieu D, Boyer AD, Varki NM, Cavenee WK, Arden KC. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 2004; 101(9): 2975–2980. doi: 10.1073/pnas.0400093101.
- Lin L, Hron JD, Peng SL. Regulation of NF- κ B, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity* 2004; 21(2): 203–213. doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.016.
- Renault VM, Rafalski VA, Morgan AA, Salih DA, Brett JO, Webb AE, Villeda SA, Thekkat PU, Guillerey C, Denko NC, Palmer TD, Butte AJ, Brunet A. FoxO3 regulates neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(5): 527–539. doi: 10.1016/j.stem.2009.09.014.
- Zhou W, Cao Q, Peng Y, Zhang QJ, Castrillon DH, DePinho RA, Liu ZP. FoxO4 inhibits NF- κ B and protects mice against colonic injury and inflammation. *Gastroenterology* 2009; 137(4): 1403–1414. doi: 10.1053/j.gastro.2009.06.049.
- Salih DA, Rashid AJ, Colas D, de la Torre-Ubieta L, Zhu RP, Morgan AA, Santo EE, Ucar D, Devarajan K, Cole CJ, Madison DV, Shamloo

- M, Butte AJ, Bonni A, Josselyn SA, Brunet A. FoxO6 regulates memory consolidation and synaptic function. *Genes Dev*. 2012; 26(24): 2780–2801. doi: 10.1101/gad.208926.112.
- Hwangbo DS, Gershan B, Tu MP, Palmer M, Tatar M. Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 2004; 429(6991): 562–566. doi: 10.1038/nature02549.
- Lee SS, Kennedy S, Tolonen AC, Ruvkun G. DAF-16 target genes that control C. elegans life-span and metabolism. *Science* 2003; 300(5619): 644–647. doi: 10.1126/science.1083614.
- Brent MM, Anand R, Marmorstein R. Structural basis for DNA recognition by FoxO1 and its regulation by posttranslational modification. *Structure* 2008; 16(9): 1407–1416. doi: 10.1016/j.str.2008.06.013.
- Peng S, Li W, Hou N, Huang N. A Review of FoxO1-Regulated Metabolic Diseases and Related Drug Discoveries. *Cells* 2020; 9(1): 184. doi:10.3390/cells9010184.
- Nagashima T, Shigematsu N, Maruki R, Urano Y, Tanaka H, Shimaya A, Shimokawa T, Shibasaki M. Discovery of Novel Forkhead Box O1 Inhibitors for Treating Type 2 Diabetes: Improvement of Fasting Glycemia in Diabetic db/db Mice. *Mole Pharmacol*. 2010; 78(5): 961–970. doi:10.1124/mol.110.065714.
- Tanaka H, Nagashima T, Shimaya A, Urano Y, Shimokawa T, Shibasaki M. Effects of the novel Foxo1 inhibitor AS1708727 on plasma glucose and triglyceride levels in diabetic db/db mice. *Eur J Pharmacol*. 2010; 645(1–3): 185–191. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.07.018.
- Peng S, Xiao W, Ju D, Sun B, Hou N, Liu Q, Wang Y, Zhao H, Gao C, Zhang S, Cao R, Li P, Huang H, Ma Y, Wang Y, Lai W, Ma Z, Zhang W, Huang S, Wang H, Zhang Z, Zhao L, Cai T, Zhao YL, Wang F, Nie Y, Zhi G, Yang YG, Zhang EE, Huang N. Identification of entacapone as a chemical inhibitor of FTO mediating metabolic regulation through FOXO1. *Sci Transl Med*. 2019; 11(488): eaau7116. doi: 10.1126/scitranslmed.aau7116.
- Masuda T, Shimazawa M, Hara H. Retinal diseases associated with oxidative stress and the effects of a free radical scavenger (edaravone). *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:9208489. doi: 10.1155/2017/9208489.
- Zhou Z, Liu J, Bi C, Chen L, Jiao Y, Cui L. Knockdown of FOXO6 inhibits high glucose-induced oxidative stress and apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *J Cell Biochem*. 2018; 120(6): 9716–9723. doi:10.1002/jcb.28252.
- Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett*. 2005; 223(2): 181–190. doi: 10.1016/j.canlet.2004.09.041.
- ALTamimi JZ, AlFaris NA, Al-Farga AM, Alshammari GM, Bin-Mowyna MN, Yahya MA. Curcumin reverses diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetes in rats by inhibition of PKC / p⁶⁶Shc axis and activation of FOXO-3a. *J Nutr Biochem*. 2020; 87: 108515. doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108515.
- Desta T, Li J, Chino T, Graves DT. Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res*. 2010; 89(6): 609–614. doi: 10.1177/0022034510362960.
- Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N, Behl Y, Alikhani M, Yang J, Braasch C, Graves DT. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- α dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia* 2010; 53(2): 378–388. doi: 10.1007/s00125-009-1529-y.
- Alikhani M, Alikhani Z, Graves DT. FOXO1 functions as a master switch that regulates gene expression necessary for tumor necrosis factor-induced fibroblast apoptosis. *J Biol Chem*. 2005; 280(13): 12096–12102. doi: 10.1074/jbc.M412171200.
- Ding ZC, Zeng WN, Rong X, Liang ZM, Zhou ZK. Do patients with diabetes have an increased risk of impaired fracture healing? A systematic review and meta-analysis. *ANZ J Surg*. 2020. doi: 10.1111/ans.15878.
- Alblowi J, Kayal RA, Siqueira M, McKenzie E, Krothapalli N, McLean J, Conn J, Nikolajczyk B, Einhorn TA, Gerstenfeld L, Graves DT. High levels of tumor necrosis factor- α contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. *Am J Pathol*. 2009; 175(4): 1574–1585. doi: 10.2353/ajpath.2009.090148.
- Kayal RA, Alblowi J, McKenzie E, Krothapalli N, Silkman L, Gerstenfeld L, Einhorn TA, Graves DT. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone* 2009; 44(2): 357–363. doi: 10.1016/j.bone.2008.10.042.
- Lu Y, Alharbi M, Zhang C, O'Connor JP, Graves DT. Deletion of FOXO1 in chondrocytes rescues the effect of diabetes on mechanical strength in fracture healing. *Bone* 2019; 123: 159–167. doi: 10.1016/j.bone.2019.03.026.

28. Okon E, Luszczki JJ, Kukula-Koch W, Halasa M, Jarzab A, Khurelbat D, Stepulak A, Wawruszak A. Synergistic or Additive Pharmacological Interactions between Magnoflorine and Cisplatin in Human Cancer Cells of Different Histological Origin. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(8): 2848. doi: 10.3390/ijms21082848.
29. Yadav A, Singh A, Phogat J, Dahuja A, Dabur R. Magnoflorine prevent the skeletal muscle atrophy via Akt/mTOR/FoxO Signal Pathway and increase slow-MyHC production in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Ethnopharmacol.* 2020; 113510. doi:10.1016/j.jep.2020.113510.
30. Kandula V, Kosuru R, Li H, an D, Zhu Q, Lian Q, Ge RS, Xia Z, Irwin MG. Forkhead box transcription factor 1: role in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15: 44. doi: 10.1186/s12933-016-0361-1.
31. Menghini R, Casagrande V, Iuliani G, Rizza S, Mavilio M, Cardellini M, Federici M. Metabolic aspects of cardiovascular diseases: is FoxO1 a player or a target? *Int J Biochem Cell Biol.* 2019; 118: 105659. doi:10.1016/j.biocel.2019.105659.
32. Qi Y, Zhu Q, Zhang K, Thomas C, Wu Y, Kumar R, Baker KM, Xu Z, Chen S, Guo S. Activation of Foxo1 by insulin resistance promotes cardiac dysfunction and β -myosin heavy chain gene expression. *Circ Heart Fail.* 2015; 8(1): 198–208. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001457.
33. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. The impact of FOXO-1 to cardiac pathology in diabetes mellitus and diabetes-related metabolic abnormalities. *Int J Cardiol.* 2017. 245: 236–244. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.07.096.
34. Puthanveetil P, Wang Y, Zhang D, Wang F, Kim MS, Innis S, Pulinnikunnil T, Abrahani A, Rodrigues B. Cardiac triglyceride accumulation following acute lipid excess occurs through activation of a FoxO1-iNOS-CD36 pathway. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(2): 352–363. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.009.
35. Modur V, Nagarajan R, Evers BM, Milbrandt J. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem.* 2002; 277(49): 47928–47937. doi: 10.1074/jbc.M207509200.
36. Ciechomska I, Pyrzynska B, Kazmierczak P, Kaminska B. Inhibition of Akt kinase signalling and activation of Forkhead are indispensable for upregulation of FasL expression in apoptosis of glioma cells. *Oncogene* 2003; 22(48): 7617–7627. doi: 10.1038/sj.onc.1207137.
37. Zhang H, Pan Y, Zheng L, Choe C, Lindgren B, Jensen ED, Westendorf JJ, Cheng L, Huang H. FOXO1 inhibits Runx2 transcriptional activity and prostate cancer cell migration and invasion. *Cancer Res.* 2011; 71(9): 3257–3267. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2603.
38. Paik JH, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, Miao L, Tothova Z, Horner JW, Carrasco DR, Jiang S, Gilliland DG, Chin L, Wong WH, Castrillon DH, DePinho RA. FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* 2007; 128(2): 309–323. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.029.
39. Jiramongkol Y, Lam EW. FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2020; 39(3): 681–709. doi: 10.1007/s10555-020-09883-w.
40. Shi F, Li T, Liu Z, Qu K, Shi C, Li Y, Qin Q, Cheng L, Jin X, Yu T, Di W, Que J, Xia H, She J. FOXO1: Another avenue for treating digestive malignancy? *Semin Cancer Biol.* 2018; 50: 124–131. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.09.009.