

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Дышловой Сергей Анатольевич

**Противоопухолевое действие некоторых низкомолекулярных
соединений из морских беспозвоночных**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
Доктор химических наук
Академик РАН
Стоник В.А.

Владивосток – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	9
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
2.1. Педерины, оннамиды и микаламиды.....	21
2.2. Гуанидиновые алкалоиды из морской губки <i>Monanchora pulchra</i>	23
2.3. Тритерпеновые гликозиды голотурий	27
2.4. «Двухголовые» (биполярные) сфинголипиды морских губок	30
2.5. Герминальные опухолевые клетки	32
2.5.1. Абберрантное развитие и опухоли половых клеток	32
2.5.2. Цисплатин-устойчивые клеточные линии GCT	34
2.6. Рак простаты	34
2.7. Лимфома Бёркитта	38
2.8. Рак мочевого пузыря	39
2.9. Клетки JB6 P ⁺ Cl41 - модель для изучения канцеропреентивных веществ	40
2.10. Апоптоз	41
2.10.1. Каспаза-зависимый апоптоз	41
2.10.2. Каспаза-независимый апоптоз	43
2.11. Аутофагия	45
2.12. Исследование эффекта комбинирования препаратов.....	47
2.13. Протеомика и методы, применяемые в ней	49
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	51
3.1. <i>In vitro</i> скрининг низкомолекулярных соединений, выделенных из морских беспозвоночных, на цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток	51
3.1.1. Определение цитотоксической активности	51
3.2. Исследование микаламида А из асцидии <i>Polysincraton</i> sp.....	61
3.2.1. Выделение и установление структуры микаламида А из морской асцидии <i>Polysincraton</i> sp.	61
3.2.2. Исследование противоопухолевой <i>in vitro</i> активности микаламида А и механизмов её реализации	62
3.2.2.1. Исследование способности микаламида А предотвращать EGF-индуцируемую злокачественную трансформацию клеток JB6 P ⁺ Cl41 и колониобразование опухолевых клеток HeLa	62
3.2.2.2. Апоптоз-индуцирующая активность микаламида А	64

3.2.2.3. Эффект микаламида А на транскрипционную активность ядерных факторов AP-1, NF-κB и p53 в клетках JB6 Cl41	65
3.2.2.4. Исследование влияния микаламида А на MAPK p38, JNK1/2 и ERK1/2	68
3.2.2.5. Обсуждение результатов исследования биологической активности микаламида А.....	69
3.3. Исследование противоопухолевой <i>in vitro</i> активности гуанидиновых алкалоидов морской губки <i>Monanchora pulchra</i>	69
3.3.1. Исследование цитотоксической активности и механизмов действия монанхоцидина А (Мс-А) на моделях лекарственно-устойчивых герминальных опухолевых клеток	69
3.3.1.1. Исследование цитотоксической активности Мс-А.....	69
3.3.1.2. Эффект Мс-А на прогрессию клеточного цикла и экспрессию маркеров апоптоза в опухолевых клетках	72
3.3.1.3. Индукция неспецифической белковой деградации под действием Мс-А на опухолевые клетки	76
3.3.1.4. Индукция цитотоксической аутофагии опухолевых клеток NCCIT-R под действием Мс-А.....	79
3.3.1.5. Индукция пермеабиллизации лизосомных мембран (ПЛМ) опухолевых клеток под действием Мс-А.....	83
3.3.1.6. Обсуждение результатов исследования <i>in vitro</i> цитотоксической активности Мс-А на опухолевые клетки человека.....	86
3.3.1.7. Исследование эффекта Мс-А на протеом клеток NCCIT-R.....	89
3.3.1.7.1. Выявление белков, регулируемых под действием Мс-А в клетках NCCIT-R	89
3.3.1.7.2. Биоинформатический анализ протеомных данных.....	94
3.3.1.7.3. Валидация регуляции белков, открытых методом протеомики	97
3.3.1.7.4. Валидация предсказанного ингибирующего эффекта Мс-А на миграцию и колониобразование клеток NCCIT-R.....	100
3.3.1.7.5. Обсуждение результатов анализа эффекта Мс-А на протеом клеток NCCIT-.....	104
3.3.2. Исследование <i>in vitro</i> канцеропреентивной и цитотоксической активности гуанидиновых алкалоидов губки <i>Monanchora pulchra</i> на клетках JB6 Cl41 и HeLa	107
3.3.2.1. Исследование <i>in vitro</i> канцеропреентивной активности гуанидиновых алкалоидов губки <i>Monanchora pulchra</i>	107

3.3.2.2. Исследование эффекта алкалоидов 11, 12, 18-20 и 23 на MAPK/AP-1 сигналинг.....	110
3.3.2.3. Исследование эффекта гуанидиновых алкалоидов на транскрипционную активность белка p53.....	115
3.3.2.4. Эффект алкалоидов 11, 12, 17–20, 23 и 27 на индукцию программируемой клеточной смерти, а также ареста клеточного цикла опухолевых клеток HeLa.....	116
3.3.2.5. Обсуждение результатов исследования <i>in vitro</i> канцеропревентивной и цитотоксической активности гуанидиновых алкалоидов губки <i>Monanchora pulchra</i>	119
3.4. Исследование противоопухолевой активности тритерпенового гликозида фрондозиды А (FrA) из кукумарии <i>Cucumaria okhotensis</i>	123
3.4.1. Исследование активности FrA на моделях рака простаты	123
3.4.1.1. Исследование эффекта FrA на жизнеспособность, способность к пролиферации, а также колониеобразование клеток рака простаты.....	123
3.4.1.2. Эффект FrA на прогрессию клеточного цикла и индукцию апоптоза клеток рака простаты.....	126
3.4.1.3. Эффект FrA на экспрессию некоторых про- и антиапоптотических белков в клетках рака простаты.....	130
3.4.1.4. Эффект FrA на цитопротекторную аутофагию в клетках рака простаты	131
3.4.1.5. Выявление белков, регулируемых в клетках PC-3 под действием цитотоксических концентраций FrA, с помощью методов протеомики.....	135
3.4.1.6. Анализ экспрессии открытых с помощью 2D-PAGE белков методами 1D- и 2D-Вестерн-блоттинга	137
3.4.1.7. Анализ возможных взаимодействий регулируемых под действием FrA белков	138
3.4.1.8. <i>In vivo</i> активность FrA на моделях рака простаты человека	139
3.4.1.8.1. Эффект FrA на рост первичных опухолей и формирование метастазов	139
3.4.1.8.2. Исследование побочных эффектов применения FrA <i>in vivo</i>	142
3.4.1.9. Обсуждение результатов экспериментов по воздействию FrA на опухолевые клетки рака простаты человека	144
3.4.2. Исследование активности FrA на моделях уротелиальной карциномы человека	147
3.4.2.1. Исследование эффекта FrA на жизнеспособность клеток уротелиальной карциномы человека.....	147
3.4.2.2. Исследование апоптоз-индуцирующего эффекта FrA в клетках уротелиальной карциномы человека.....	148
3.4.2.3. Исследование роли каспаз в FrA-индуцируемом апоптозе.....	149

3.4.2.4. Исследование эффекта FrA на MAPK в клетках RT112	152
3.4.2.5. Исследование эффекта FrA на аутофагию в клетках уротелиальной карциномы.....	153
3.4.2.6. Исследование комбинированного действия FrA с цисплатином или гемцитабином на клетки уротелиальной карциномы человека	156
3.4.2.7. Обсуждение результатов исследования эффекта FrA на клетки уротелиальной карциномы человека.....	156
3.4.3. Исследование активности FrA на моделях лимфомы Бёркитта	158
3.4.3.1. Исследование эффекта FrA на жизнеспособность клеток лимфомы Бёркитта	158
3.4.3.2. Эффект FrA на прогрессию клеточного цикла клеток лимфомы Бёркитта....	159
3.4.3.3. Исследование способности FrA индуцировать каспаза-независимый апоптоз клеток лимфомы Бёркитта.....	160
3.4.3.4. Исследование эффекта FrA на митохондрии и транслокацию AIF в клеточное ядро	163
3.4.3.5. Исследование роли белка p53 в FrA-индуцируемом апоптозе клеток лимфомы Бёркитта.....	166
3.4.3.6. Действие FrA на аутофагию в клетках лимфомы Бёркитта	167
3.4.3.7. Обсуждение результатов исследования активности FrA на моделях лимфомы Бёркитта.....	167
3.5. Исследование противоопухолевой активности ризохалинина (Rhiz) и его производных на моделях рака простаты человека	170
3.5.1. Исследование эффектов Rhiz <i>in vitro</i>	170
3.5.1.1. Исследование способности Rhiz ингибировать жизнеспособность клеток рака простаты человека	170
3.5.1.2. Исследование апоптоз-индуцирующей активности Rhiz в клетках рака простаты человека	171
3.5.1.3. Исследование эффекта Rhiz на аутофагию в клетках рака простаты	175
3.5.1.4. Исследование эффекта Rhiz на потенциал-зависимые калиевые каналы.....	179
3.5.1.5. Эффект Rhiz на AR-сигналинг в клетках рака простаты.....	182
3.5.1.6. Исследование эффекта Rhiz в комбинации с доцетакселом и кабазитакселом, а также с энзалутамидом при действии на AR-V7-положительные клеткам.....	184
3.5.2. Исследование эффекта Rhiz <i>in vivo</i>	185
3.5.2.1. Подбор дозы Rhiz для испытаний <i>in vivo</i>	185

3.5.2.2. Эффект на Rhiz рост первичных опухолей и индукцию апоптоза опухолевых клеток <i>in vivo</i>	186
3.5.2.3. Исследование побочных эффектов Rhiz <i>in vivo</i>	189
3.5.3. Обсуждение результатов исследования противоопухолевой активности Rhiz на моделях рака простаты человека	190
3.5.4. Исследование эффекта Rhiz на протеом клеток рака простаты человека	193
3.5.4.1. Выявление белков, регулируемых под действием Rhiz на клетки PC-3.....	193
3.5.4.2. Биоинформатический анализ полученных данных	195
3.5.4.3. Валидация регулируемых белков, открытых методом протеомики.....	197
3.5.4.4. Способность Rhiz ингибировать миграцию опухолевых клеток PC-3	198
3.5.4.5. Исследование цитопротекторной роли киназы ERK1/2 в клеточном ответе на действие Rhiz	198
3.5.4.6. Обсуждение результатов исследования эффекта Rhiz на протеом клеток рака простаты человека	201
3.5.5. Исследование активности синтетических производных ризохалина.....	203
3.5.5.1. Исследование цитотоксической активности синтетических производных ризохалина.....	204
3.5.5.2. Исследование эффекта синтетических производных ризохалина на прогрессию клеточного цикла.....	205
3.5.5.3. Проапоптотическая активность синтетических производных ризохалина	206
3.5.5.4. Эффект синтетических производных ризохалина <i>in vitro</i> на аутофагию	208
3.5.5.5. Эффект синтетических производных ризохалина на сигналинг андрогенового рецептора <i>in vitro</i>	209
3.5.5.6. Обсуждение результатов исследования эффектов синтетических производных ризохалина <i>in vitro</i>	213
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	214
4.1. Приборы и материалы	214
4.1.1. Приборы	214
4.1.2. Реагенты	214
4.1.3. Клеточные культуры	217
4.1.4. Выделение исследуемых веществ.....	219
4.1.4.1. Общая информация	219
4.1.4.2. Сбор биологического материала и выделение микаламида А.....	219
4.2. Стандартные методики для определения биологической активности веществ..	220

4.2.1. Растворы веществ, используемые в экспериментах по исследованию биологической активности	220
4.2.2. Определение цитотоксической активности веществ методом MTS или MTT.....	220
4.2.3. Определение способности веществ влиять на пролиферацию клеток (метод с использованием красителя трипанового синего)	222
4.2.4. Определение канцеропреventивной активности веществ	222
4.2.5. Определение способности веществ ингибировать колониеобразование опухолевых клеток в мягком агаре	223
4.2.6. Определение способности веществ ингибировать формирование и рост колоний опухолевых клеток на твёрдой подложке	223
4.2.7. Люциферазный метод определения AP-1-, NFκB- и p53-зависимой транскрипционной активности.....	224
4.2.8. Приготовление белковых экстрактов для 1D- и 2D-Вестерн-блоттинга, а также 2D-PAGE.....	225
4.2.9. Определение концентрации белка (метод Бредфорд).....	225
4.2.10. Вестерн-блоттинг.....	226
4.2.11. Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле (2D-PAGE).....	228
4.2.12. Анализ рисунков 2D-гелей	229
4.2.13. Идентификация белков методом масс-спектрометрии.....	229
4.2.14. Двумерный Вестерн-блоттинг (2D-Вестерн-блоттинг)	230
4.2.15. Анализ экспрессии простатического специфического антигена (PSA).....	231
4.2.16. Исследование синергического, аддитивного или антагонистического эффекта веществ при их комбинировании.....	231
4.2.17. Исследование антагонистического эффекта SP600125 (ингибитора JNK1/2).....	232
4.2.18. Окрашивание одномерных SDS-полиакриламидных гелей красителем кумасси бриллиантовым синим G 250.....	232
4.2.19. Исследование белков, содержащихся в образцах 1 и 2, методом масс-спектрометрии (см. 3.3.1.3.).....	233
4.2.20. Определение активированной каспазы-3 с помощью FACS.....	233
4.2.21. Окрашивание лизосом красителем акридиновым оранжевым	234
4.2.22. Измерение выхода катепсина В в межклеточное пространство	234
4.2.23. Клеточное фракционирование	235
4.2.24. Полимеразно-цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ).....	236
4.2.25. Метод проточной цитометрии для исследования способности веществ индуцировать апоптоз.....	237

4.2.26. Метод проточной цитометрии для исследования влияния веществ на клеточный цикл.....	237
4.2.27. Исследование эффекта вещества на клеточную миграцию.....	238
4.2.28. Биоинформатический анализ протеомных данных.....	238
4.2.29. Подавление экспрессии гена p53 посредством трансфекции с использованием малых интерферирующих РНК (siRNA)	239
4.2.30. Световая микроскопия	240
4.2.31. Иммуноцитохимический метод и флуоресцентная микроскопия	240
4.2.32. Электронная микроскопия.....	241
4.2.33. Модели подкожных мышечных ксенографтов	241
4.2.34. Оценка роста опухолей и формирования метастазов	242
4.2.35. Оценка количества диссеминированных опухолевых клеток, а также циркулирующих опухолевых клеток при помощи <i>Alu</i> -ПЦР.....	243
4.2.36. Анализ крови животных	244
4.2.37. Статистическая обработка полученных данных	244
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	245
6. ВЫВОДЫ	248
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	250

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одной из главных причин смертности в настоящее время являются онкологические заболевания. Согласно отчёту Всемирной организации здравоохранения за 2015 год, рак является второй после сердечно-сосудистых заболеваний причиной смертности в мире, на долю которой ежегодно приходится порядка 9 миллионов смертей. Следует отметить, что в последние десятилетия достигнут значительный прогресс в диагностике (в том числе ранней) и лечении рака. Однако, несмотря на достижения в создании новых медицинских технологий и улучшении терапии таких болезней, следует признать, что на настоящий момент лечение онкопатологий всё еще остается весьма проблематичным. Ситуация осложняется не только отсутствием в ряде случаев эффективных лекарств, способных останавливать или тормозить прогрессию опухоли, но и наличием у имеющихся препаратов серьезных побочных эффектов. Следовательно, разработка и исследование механизмов действия новых противоопухолевых препаратов по-прежнему является актуальной проблемой современной науки.

Химические соединения, которые обещают стать основой разрабатываемых сейчас препаратов, могут быть получены как при помощи органического синтеза, так и выделены из природных источников. Изучение новых природных соединений нередко открывает их неожиданные свойства, которые могут оказаться интересными и перспективными для применения не только в онкологии и других разделах медицины, но и в качестве молекулярных инструментов для клеточной и молекулярной биологии, а также биохимии. Согласно последним данным, около 60% известных лекарственных препаратов было созданы на основе природных соединений, их аналогов или производных. Следует отметить, что некоторые морские природные соединения отличаются ярко выраженной и часто селективной биологической активностью, и поэтому нередко являются хорошими молекулярными моделями для дальнейших синтетических модификаций с целью получения более активных продуктов. Более того, многие эволюционно-отобранные природные молекулы довольно часто проявляют высокую биологическую активность и при этом относительно невысокую токсичность *in vivo*. Как правило, такие соединения являются низкомолекулярными, в большинстве своём относящимися к так называемым вторичным метаболитам. Вторичные метаболиты – это молекулы (как правило, обладающие биологической активностью), образующиеся из широко распространённых предшественников, участвующих в первичном метаболизме. Такими предшественниками могут быть, например, сахара, аминокислоты, уксусная кислота и др. Довольно часто

вторичные метаболиты являются специфичными для отдельных таксонов, видов или даже штаммов. Они чрезвычайно разнообразны по своему химическому строению и биологическим функциям. До середины прошлого века основным источником новых природных веществ были наземные растения, животные и почвенные микроорганизмы. Ситуация изменилась в 1943 году в связи с изобретением акваланга, что сделало доступными для сбора и изучения многие морские организмы. Как известно, процессы вторичного обмена в морских организмах существенно отличаются от соответствующих процессов, происходящих в наземных. Это обусловлено специфическими условиями обитания данных организмов, такими как водная среда, низкие стабильные температуры, высокое давление, значения pH, высокая солёность морской воды, слабая освещённость, низкая концентрация кислорода и др. Поэтому морские природные низкомолекулярные вещества, как правило, отличаются своими химическими структурами от производимых наземными животными и растениями соединений. За последние несколько десятков лет из морских организмов было выделено около тридцати тысяч новых природных соединений, для многих из них были показаны перспективные физиологические активности. Некоторые из этих соединений проходили клинические испытания в качестве активных субстанций новых лекарственных препаратов. Так, к середине 2018 года шесть лекарственных препаратов, созданных на основе морских природных соединений, были одобрены FDA (Американская служба контроля пищевых и фармацевтических препаратов) для использования в клинической практике, еще один такой препарат был зарегистрирован в Европе и два в России (оба разработаны в ТИБОХ ДВО РАН). При этом 4 препарата из этого списка используют в лечении онкологии. В то же время на различных этапах клинических испытаний сейчас находятся ещё порядка 25 препаратов, созданных на основе молекул морского происхождения, почти все они проходят испытания в качестве потенциальных противоопухолевых лекарств. Активными субстанциями этих потенциальных лекарств являются морские природные соединения: халихондрины, бриостатины, гемаистерлин, дискодермолид, спонгистатин, аплидин, салиноспирамид А и др. Следует отметить, что почти половина из новых препаратов, представляет собой конъюгаты антител и активных природных молекул, т.н. ADC (antibody-drug conjugates). В этих случаях активная (как правило, цитотоксическая) природная молекула или её производное является своего рода «боеголовкой», инициирующей смерть опухолевой клетки, в то время как связанное с ней антитело обеспечивает специфическую доставку к опухолевой клетке, а значит и высокую селективность препарата. Первыми из лекарств, основанных на морских природных соединениях и разрешённых к применению в клинической практике, стали противоопухолевые препараты «ага-А» или «видарабин» и

«ара-С» или «цитарабин», разработанные на основе необычных содержащих арабинозу нуклеозидных метаболитов из губки *Cryptotethia crypta*. В 2007 году для лечения некоторых видов опухолей был разрешён препарат «трабектин» (йонделис), разработанный на основе алкалоида эктеинасцидина-743 (ЕТ-743), выделенного из асцидии *Ecteinascidia turbinata*. В 2010 году еще один противоопухолевый препарат нового поколения «эребулинмезилат» на основе макролидов морских губок был разрешен к производству и применению в США и странах Европы. Наконец, в 2011 году для лечения некоторых лимфом был разрешён препарат адцетрис, или брентуксимаб (ведотин), представляющий собой конъюгат анти-CD30-антител и монометилауристатина Е – производного морского необычного пептида долостатина 10.

Наиболее богатым источником морских биологически активных соединений с самого начала их поиска продолжают оставаться морские беспозвоночные, в частности, губки и асцидии. Это обстоятельство связывают с «неподвижным» образом жизни соответствующих животных и, как следствие, необходимостью вырабатывать защитные химические вещества. Такие соединения способны влиять на клеточный цикл, взаимодействовать с ферментами и другими молекулярными мишенями, они часто проявляют антибактериальные, антикоагулянтные, противовирусные, противогрибковые, противовоспалительные, а также противоопухолевые свойства. Таким образом, можно сделать вывод, что поиск и выделение новых вторичных метаболитов морских беспозвоночных, исследование их химического строения, особенностей и молекулярных механизмов физиологического действия с целью получения новых веществ с уникальной биологической активностью, в том числе противоопухолевой, являются актуальными.

Настоящая работа посвящена изучению особенностей физиологического действия серии природных соединений, полученных из морских губок, асцидий, голотурий и других морских беспозвоночных и проявляющих цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток человека. Все эти вещества были выделены или синтезированы в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Почти все из них были также открыты в этом институте и ранее известны не были. В рамках диссертационной работы было изучено действие этих веществ на различные опухолевые клетки человека *in vitro* и на лабораторных животных в экспериментах *in vivo*.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы было изучение молекулярных механизмов действия ряда морских природных соединений, проявляющих цитотоксические свойства в отношении опухолевых клеток, а также изучение их

противоопухолевого действия. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выполнить поиск веществ, выделенных из морских беспозвоночных, которые стимулируют программируемую гибель опухолевых клеток и/или вызывают цитотоксическую или цитопротекторную аутофагию. Основываясь на противоопухолевой активности данных веществ *in vitro*, установить, какие из них перспективны для дальнейшего изучения.

2. Изучить противоопухолевые свойства *in vitro*, а также некоторые аспекты молекулярного механизма противоопухолевого действия и зависимость «структура – активность» в ряду монанхоцидина А и других гуанидиновых алкалоидов морской губки *Monanchora pulchra* на моделях лекарственно-устойчивых и лекарственно-чувствительных герминальных опухолей человека.

3. Изучить противоопухолевую активность и некоторые аспекты молекулярного механизма действия морского гликозида фрондозид А, выделенного из дальневосточной голотурии *Cucumaria okhotensis*. Использовать для этой цели модели лекарственно-устойчивого и лекарственно-чувствительного рака простаты человека, а также уротелиальной карциномы человека и лимфомы Бёркитта.

4. Изучить противоопухолевую активность и некоторые аспекты молекулярного механизма действия агликона биполярного гликосфинголипида ризохалина, выделенного из морской губки *Rhizochalinina incrustata*, а также его производных на моделях лекарственно-устойчивого и лекарственно-чувствительного рака простаты человека.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Асцидия *Polysincraton* sp. содержит микаламид А. Микаламид А проявляет канцеропреентивные свойства, способность подавлять транскрипционную активность ядерных факторов AP-1 и NFκB, а также индуцировать p53-независимый апоптоз.

2. Алкалоид монанхоцидин А из морской губки *Monanchora pulchra* индуцирует цитотоксическую аутофагию и вызывает нарушение проницаемости лизосомных мембран опухолевых клеток, подавляет миграцию этих клеток, а также способен преодолевать лекарственную устойчивость опухолевых клеток.

3. Подобные птиломикалину А гуанидиновые алкалоиды активируют киназы JNK1/2 и ERK1/2, а также транскрипционную активность ядерного фактора AP-1, индуцируя p53-независимую программируемую клеточную смерть. Гуанидиновый

алкалоид пульхранин А способен ингибировать транскрипционную активность ядерного фактора AP-1 и активировать киназу JNK1/2, приводя к p53-независимой гибели клеток. Урупосидин А способен вызывать активацию киназ JNK1/2 и ERK1/2 и индуцировать p53- и каспаза-независимую клеточную смерть.

4. Тритерпеновый гликозид фрондозид А активен против лекарственно-устойчивого рака простаты человека *in vitro* и *in vivo*. Механизм его действия включает в себя индукцию апоптоза опухолевых клеток с одновременным ингибированием цитопротекторной аутофагии.

5. Фрондозид А способен индуцировать каспаза- и p53-независимый апоптоз клеток уротелиальной карциномы человека и лимфомы Бёркитта *in vitro*, ингибировать цитопротекторную аутофагию и усиливать цитотоксические эффекты цисплатина. Это соединение способно воздействовать на митохондрии опухолевых клеток лимфомы Бёркитта и вызывать транслокацию апоптогенной формы фактора индукции апоптоза AIF в ядро опухолевой клетки.

6. Ризохалинин проявляет противоопухолевую активность в моделях лекарственно-устойчивого рака простаты человека *in vitro* и *in vivo*. Механизм его противоопухолевого действия включает в себя индукцию каспаза-зависимого апоптоза и ингибирование цитопротекторной аутофагии. Потенциал-зависимые калиевые каналы являются одной из молекулярных мишеней данного соединения.

7. Ризохалинин и 18-гидроксиризохалинин являются наиболее активными соединениями в ряду изученных производных ризохалина и способны ингибировать AR-FL- и AR-V7-зависимый сигналинг. Элиминирование остатка моносахарида от молекулы ризохалина, из которой были получены данные соединения, является необходимым для проявления вышеупомянутых свойства.

Научная новизна и практическая ценность работы. Изучена большая серия природных соединений из числа недавно выделенных российскими учёными из морских беспозвоночных, а также полученных из них производных, в результате найдены вторичные метаболиты этих животных, проявляющие цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток. В их числе гуанидиновые алкалоиды из морских губок, собранных в морях Дальнего Востока России; тритерпеновые и стероидные метаболиты из различных беспозвоночных; некоторые гликозиды, в том числе фрондозид А из дальневосточной голотурии *Cucumaria okhotensis*; необычный биполярный гликосфинголипид ризохалин и его агликон; микаламид А из асцидии *Polysincraton* sp. и другие. Цитотоксическая активность этих соединений проявляется в их наномолярных

или микромолярных концентрациях. Некоторые из этих веществ тормозят в нецитотоксических концентрациях образование микроколоний опухолевых клеток при действии на эти клетки эпидермального фактора роста EGF (микаламид А, монанхоцидин В, урупоцидин А и др.).

Были найдены необычные свойства у ряда отобранных для дальнейших исследований соединений. В частности, были впервые найдены морские природные соединения, индуцирующие цитотоксическую аутофагию (монанхоцидин А) или ингибирующие цитопротекторную аутофагию опухолевых клеток (ризохалинин и фрондозид А). Такая стимуляция гибели опухолевых клеток под действием различных веществ, в том числе лекарств, гораздо менее изучена, чем апоптоз.

Были установлены особенности действия тестируемых веществ на внутриклеточные процессы, в частности, их влияние на митоген-активируемые киназы (МАРК), ядерные факторы, апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), активность и расщепление каспаз, ионные каналы и др. Так, был охарактеризован не только необычный неапоптотический механизм цитотоксического действия алкалоида монанхоцидина А, но и его способность преодолевать лекарственную устойчивость опухолевых клеток, а также ингибировать их миграцию. Были выявлены некоторые аспекты молекулярных механизмов цитотоксического действия морских гуанидиновых алкалоидов монанхоцидина В, монанхомикалина С, птилиомикалина А, пульхранина А, урупоцидина А, монанхомикалина В и нормонанхоцидина D. Установлено, что морской тритепеновый гликозид фрондозид А, кроме ингибирования цитопротекторной аутофагии опухолевых клеток, индуцирует их p53-независимый апоптоз и вызывает транслокацию AIF из митохондрий в ядро, предварительно стимулируя переход AIF в свою апоптогенную форму.

Испытания противоопухолевого действия фрондозид А и ризохалинина *in vivo* на мышах с привитыми опухолями рака простаты человека показали, что эти вещества тормозят рост опухолей и могут считаться новыми лидерными соединениями для разработки на их основе противоопухолевых лекарств. Изучение противоопухолевой активности ряда синтезированных производных ризохалинина выявило зависимость структуры от активности и определило направления дальнейшей модификации данного класса соединений с целью оптимизации их противоопухолевых свойств. Таким образом, полученные результаты создают основу для развития проектов, направленных на практическое использование новых природных соединений, выделенных из морских беспозвоночных, в онкологии и/или в качестве реагентов для клеточной биологии и биохимии.

Личный вклад автора. Автором было самостоятельно спланировано и проведено подавляющее большинство описанных в настоящей работе экспериментов. Их результаты были проанализированы, и на этом основании были сделаны выводы о дальнейших перспективах исследований в данном направлении. Спектральные данные микаламида А были получены д.х.н. Калиновским В.И. и к.х.н. Дмитренко П.С.; идентификация белков в протеомных экспериментах была проведена доктором Симоной Фенц; эксперименты с применением электронной микроскопии были выполнены профессором Керстин Аманн; электрофизиологические эксперименты были выполнены доктором Робертом Берингом и профессором Кристианой Бауэр. Выделение и установление структур изученных соединений было выполнено д.х.н. Макарьевой Т.Н., к.х.н. Шубиной Л.К., д.х.н. Фёдоровым С.Н., к.х.н. Табакмахер К.М., к.х.н. Гузий А.Г., д.х.н. Калинин В.И., д.х.н. Авиловым С.А., к.х.н. Сильченко А.С. акад. РАН, д.х.н. Стоником В.А. и другими сотрудниками Лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН, в некоторых случаях с участием автора данной работы. Синтез производных ризохалина был выполнен к.х.н. Табакмахер К.М. и д.х.н. Макарьевой Т.Н. Полученные при выполнении диссертационного исследования результаты были самостоятельно оформлены соискателем в виде научных статей, за исключением тех статей, в которых основной фокус был сделан не на механизмы действия, а на выделение и установление структуры соединений, а полученные соискателем результаты применяли для характеристики противоопухолевых свойств этих веществ.

Публикация результатов исследования. Основные результаты данной работы опубликованы в журналах «International Journal of Cancer», «Oncotarget», «Orgnic Letters», «Annals of Oncology», «Marine drugs», «PROTEOMICS», «FEBS Journal», «Bioorganic & Medicinal Chemistry», «Oncology Research and Treatment», «BMC Cancer», «Leukemia and Lymphoma», «Natural Products Research», «Journal of Chemistry», «Natural Products Communications». Под редакцией соискателя была опубликованы книги «Marine Compounds and Cancer» и «Marine Compounds and Cancer 2017». Результаты работы представлены на международной конференции EMBO conference «Autophagy: From molecular principles to human diseases» в 2017 г (Цавтат-Дубровник, Хорватия); на международной конференции 10th European Conference on Marine Natural Products в 2017 г (Колимбари, Греция); на международных конференциях Wilsede Meeting “Modern Trends in Human Leukemia and Cancer” в 2012 и 2016 гг (Вильседе, Германия); на конгрессе немецкого общества гемато-онкологов в 2014 г (Гамбург, Германия); на международном

конгрессе FEBS Congress “Mechanisms in Biology” в 2013 г (Санкт-Петербург, Россия); на международном симпозиуме “Efficacy of biomarkers and personalized cancer therapeutics” в 2012 г (Париж, Франция).

Всего автором опубликовано 76 работ, из которых по теме диссертации – 33, включая 28 научных статей, опубликованных в изданиях из списка ВАК, и 5 материалов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 341 цитируемую работу. Работа изложена на 277 страницах, содержит 114 рисунков и 12 таблиц.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность своему наставнику д.х.н. Фёдорову С.Н., а также своему научному консультанту академику Стонику В.А. Автор благодарит к.х.н. Шубину Л.К. за неоценимый вклад в химическую часть настоящего исследования, д.х.н. Макарьеву Т.Н. – за предоставленные для исследования вещества, ценные консультации, советы и идеи; м.н.с. Кузьмич А.С. – за помощь в проведении ряда биологических экспериментов; д.х.н. Калиновского А.И. и к.х.н. Дмитренко П.С. – за получение и помощь в обработке спектральных данных; д.х.н. Ермакову С.П. и к.б.н. Аминина Д.Л. – за ряд советов по организации биологической части исследования; чл.-корр. РАН Васьковского В.Е. – за помощь в работе с научной литературой и сборе информации; к.б.н. Менчинскую Е.С. – за вклад в экспериментальную работу по изучению фрондозидов А; к.х.н. Гузий А.Г., к.х.н. Табакмахер К.С., д.б.н. Калинина В.И., д.х.н. Авилова С.А., к.х.н. Сильченко А.С. и других коллег из Лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН – за выделение и очистку некоторых исследуемых веществ, а также научные консультации. Автор выражает глубокую признательность своим немецким коллегам из Университетской клиники Эппендорф (Гамбург, Германия), и, в особенности, профессору Гунхилд фон Амсбург, Джесике Хаушильд, доктору Фридману Хонекеру, доктору Штефану Балабанову и профессору Карстену Букамаеру.

Перечень используемых сокращений и обозначений

Спектрометрия

HRESI-MS – масс-спектрометрия высокого разрешения с использованием ионизации электроспреем

MALDI – масс-спектрометрия с использованием матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации

MS/MS – тандемная масс-спектрометрия

ToF – времяпролётный метод снятия масс-спектров

Хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ТСХ – тонкослойная хроматография

Единицы измерения

g – единица измерения относительной силы центрифугирования (RCF); саму RCF рассчитывали по формуле $RCF = 11.18 \times (\text{радиус ротора центрифуги [см]}) \times (\text{скорость центрифугирования [кол-во оборотов в мин]} / 1000)^2$

v/v – выраженное в процентах количество мл вещества, содержащееся в 1 мл раствора

w/v – выраженное в процентах количество граммов вещества, содержащееся в 1 мл раствора

ед/мл – единиц активности/мл

мкМ – микромоль/л

Исследуемые морские природные соединения

Микаламид А

МусА – микадамид А

Фрондозд А

FrA – фрондозид А

Гуанидиновые алкалоиды морской губки *Monanchora pulchra*

Мс-А – монанхоцидин А

Мс-В – монанхоцидин В

Мм-С – монанхомикалин С

Pt-A – птиломикалин А

Pch-A – пульхранин А

Ur-A – урупацидин А

Мм-В – монанхомикалин В

Nm-D – нормонанхоцидин D

Ризохалинин

Rhiz – ризохалинин (агликон ризохалина)

Исследование биологической активности

2D-Вестерн-блоттинг – двумерный Вестерн-блоттинг

2D-PAGE – двумерный электрофорез в полиакриламидном геле, используемый при анализе протеома клеток

3-МА – 3-метиладенин

ADT – (androgen deprivation therapy) – антигормональная терапия, применяемая при лечении рака простаты, направленная на предотвращение связывания андрогенов с андрогеновым рецептором

AIF – апоптоз-индуцирующий фактор

Aniso – анизомидин

АО – акридиновый оражевый

AP-1 – активаторный белок-1, транскрипционный фактор

APS – персульфат аммония

AR – андрогеновый рецептор

AR-V7 – андрогеновый рецептор, вариант сплайсинга V7

Ara-C – (arabinofuranosyl cytidine) – цитарабин

BSA – бычий сывороточный альбумин

BafA1 – бафиломицин A1

Caba – кабазитаксель

CHAPS – 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат

CQ – хлорокин

CI – (combinational index) индекс комбинирования

D-люциферин – (4S)-2-(6-гидрокси-1,3-бензотиазол-2-ил)-4,5-дигидротиазол -4-карбоновая кислота

DAPI – (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол, флуоресцентный краситель, связывающийся с А-Т-богатыми регионами ДНК

DEPC-H₂O – деионизированная вода, обработанная диэтилпиروкарбонатом

dH₂O – деионизированная вода

Diaz – диазоксид

dNTP – дезоксинуклеотид трифосфат

DOC – доцетаксель

Doh-eIF5A – интермедиатная форма белка, содержащая деоксигипузинированный лизин⁵⁰

EGF – эпидермальный фактор роста

eIF5A – эукариотический фактор инициации трансляции 5A-1

Enz – энзалутамид

ERKs – киназы, регулируемые внешклеточными сигналами

Fa – (fraction affected) – количество клеток в долях от единицы, подвергшееся изучаемому эффекту препарата (например, убитое препаратом в случае изучения его цитотоксической активности)

FBS – сыворотка крови эмбрионов крупного рогатого скота

FITC – изотиоцианат флюоресцеина

H&E – окрашивание гематоксилином и эозином

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

Нур-eIF5A – активная форма белка, содержащая гипузинированный лизин⁵⁰

IC₅₀ – (inhibition concentration 50), концентрация исследуемого вещества, ингибирующая жизнеспособность клеток на 50%

INCC₅₀ – (inhibition of the number of the colonies C₅₀) концентрация вещества, при которой происходит ингибирование колониеобразования клеток в мягком агаре на 50%

IEF – изоэлектрическое фокусирование

ИНС – иммуногистохимия

IPG – иммобилизованный pH-градиент

LC3B – (microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B) – микротрубочка-ассоциированные белки 1A/1B легкая цепь 3B

Lys-eIF5A – негипузинированная (неактивная) модификация eIF5A, содержащая свободный лизин⁵⁰

MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа

Minox – миноксидил

MTS – 5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4,5-диметилтиазолил)-3-(4-сульфо-фенил)тетразолий, внутренняя соль

Mw – молекулярная масса

NAD⁺ – никотинамидадениндинуклеотид

NFκB – ядерный фактор κB, транскрипционный фактор

NP-40 – нонилфеноксиполиэтоксилэтанол

PBS – фосфатно-солевой буфер

PE – фикоэритрин

PFA – параформальдегид

pI – изоэлектрическая точка

PI – пропидиум йодид

PSA – простатический специфический антиген

PVDF – поливинилиден фторид

RT – (room temperature), комнатная температура

SDS – додецилсульфат натрия

TBS – трис-солевой буфер

TEMED – *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин

Tris – трис(гидроксиметил)аминометан

Tris/HCl – раствор трис(гидроксиметил)аминометана, титрованный HCl до соответствующего значения pH

Tween-20 – полиоксиэтилен (20) сорбитан монолаурат

z-VAD-fmk – (N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone; zVAD)
– N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp(O-Me)-фторметилкетон, ингибитор активности каспаз

АТФ – аденозинтрифосфат

Глицин/NaOH – раствор глицина, титрованный NaOH до соответствующего значения pH

ДТТ – дитиотреитол

ИФА – иммуноферментный анализ

н.д. – статистически недостоверное отличие значений друг от друга

Противоопухолевая активность – в данной работе – активность вещества по отношению к опухолевым клеткам (*in vitro* и/или *in vivo*), так или иначе приводящая к их гибели или замедлению пролиферации

ПЦР – полимеразно-цепная реакция

ТХУ – трихлоруксусная кислота

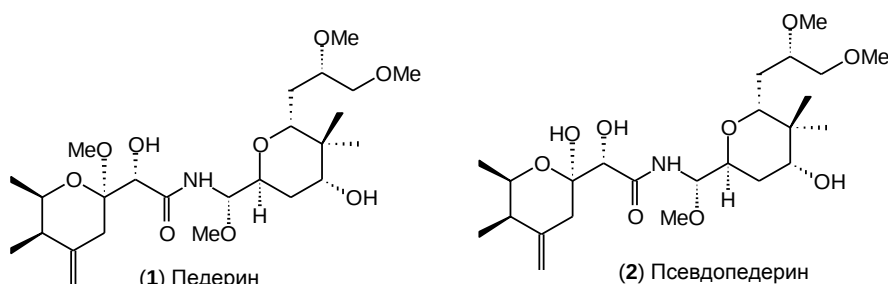
Цисплатин – цис-диаминдихлорплатина (II)

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

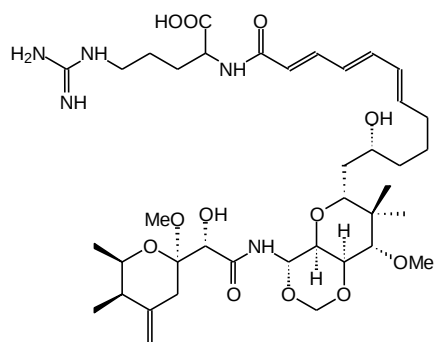
2.1. Педерины, оннамиды и микаламиды

В 1949 году Утеа и соавторы сообщили о выделении токсичного начала из жука *Paederis fuscipes* [1]. Намного позже, в 1965 году, была установлена структура этого соединения, получившего название педерин (1) [2], которая затем была пересмотрена в 1968 году [3]. Одновременно было выделено другое соединение, получившее название псевдопедерин (2) [2]. Было показано, что педерин является высокоцитотоксичным по отношению к нескольким клеточным линиям [4]. Эти соединения являются содержащими тетрагидропирановые циклы амидами.

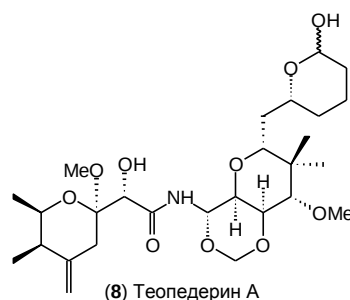


В течение следующих 20 лет подобных соединений не было выделено из каких-либо природных объектов. Однако в 1988 году группы ученых из Японии и Новой Зеландии опубликовали сообщения о выделении новых соединений этого типа: оннамида А (3) [5] и микаламида А (4) [6] из морских губок *Theonella* sp. и *Mycale* sp. соответственно. Чуть позже из губки *Mycale* sp. было выделено ещё одно подобное соединение, относящееся к группе микаламидов – микаламид В (5) [7]. Два последних известных микаламидов – микаламиды С (6) и D (7) – были получены в 2000 году из экстрактов губки *Stylinos sponges* [8]. При этом микаламид D был одновременно выделен и из губки *Mycale* sp.

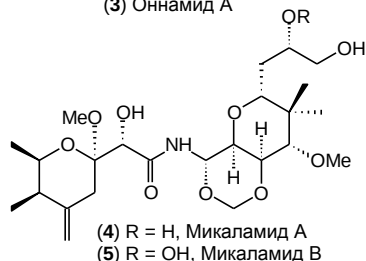
Позднее были найдены и другие представители семейства оннамидов (описано в [1]). Так, в губках *Theonella* sp. и *Discodermia* sp. было обнаружено семейство структурно похожих на микаламиды теопедеринов, в том числе первый представитель этой группы – теопедерин А (8) (обзорная статья [1]). В 2004 году из губки *Ircinia ramosa* были выделены инсиниастатины А (9) и В (10) [9]. Примечательно, что одновременно инсиниастатин А был выделен из губки *Psammocinia* sp. и получил другое название – псимберин [10], которые закрепилось за этим веществом в последующих работах.



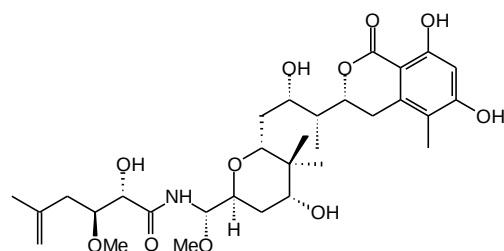
(3) Оннамид А



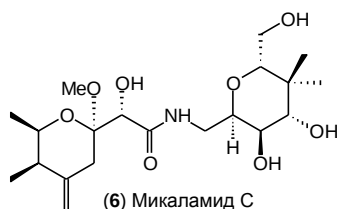
(8) Теопедерин А



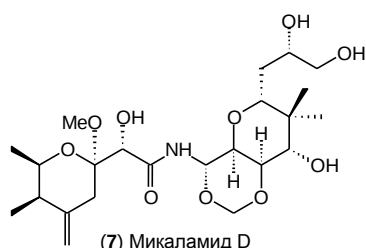
(4) R = H, Микаламид А
(5) R = OH, Микаламид В



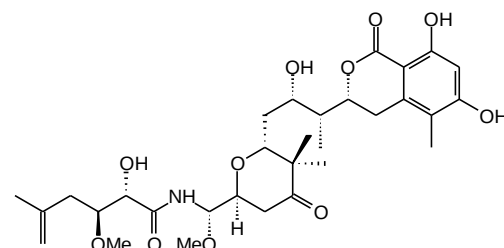
(9) Псимберин / Ирсиниастатин А



(6) Микаламид С



(7) Микаламид D



(10) Ирсиниастатин В

Противоопухолевая активность педерин-подобных соединений была исследована в нескольких работах. Так, было показано, что микаламиды А и В, а также оннамид А проявляют противоопухолевую активность *in vivo* и способны увеличивать выживаемость мышей с асцитной лимфомой (привитые клетки линии Р388) [11]. При этом оннамид А обладал меньшей активностью по сравнению с микаламидами. Авторы объяснили противоопухолевую активность изученных соединений их способностью ингибировать белковый синтез, а также синтез РНК и ДНК. Однако последующие исследования показали, что основной биологический эффект микаламидов А и В заключается в ингибировании именно белкового синтеза. Полученные результаты хорошо согласовывались с ранее полученными данными о способности педерина ингибировать синтез ДНК и белков [4]. Дальнейшие исследования показали, что активность педерина и аналогичных ему соединений связана с их способностью связываться с Е-сайтом большой 60S субъединицы рибосомы [12, 13].

Было также показано, что некоторые соединения данного семейства способны активировать киназы p38 и JNK1/2, что приводило к фосфорилированию соответствующих субстратов данных киназ – соответственно ATF-2 и c-Jun. Это предположительно и приводило к индуцируемому педерин-подобными соединениями апоптозу [14, 15]. Исследования биологической активности псимберина показали, что в реализации индуцируемого им апоптоза могут быть также задействованы стресс-активируемые киназы, а также митохондрии, генерирующие активные формы кислорода (ROS). Кроме того, было показано, что индуцируемый ими апоптоз, по крайней мере, отчасти реализуется через каспазу-8 [15].

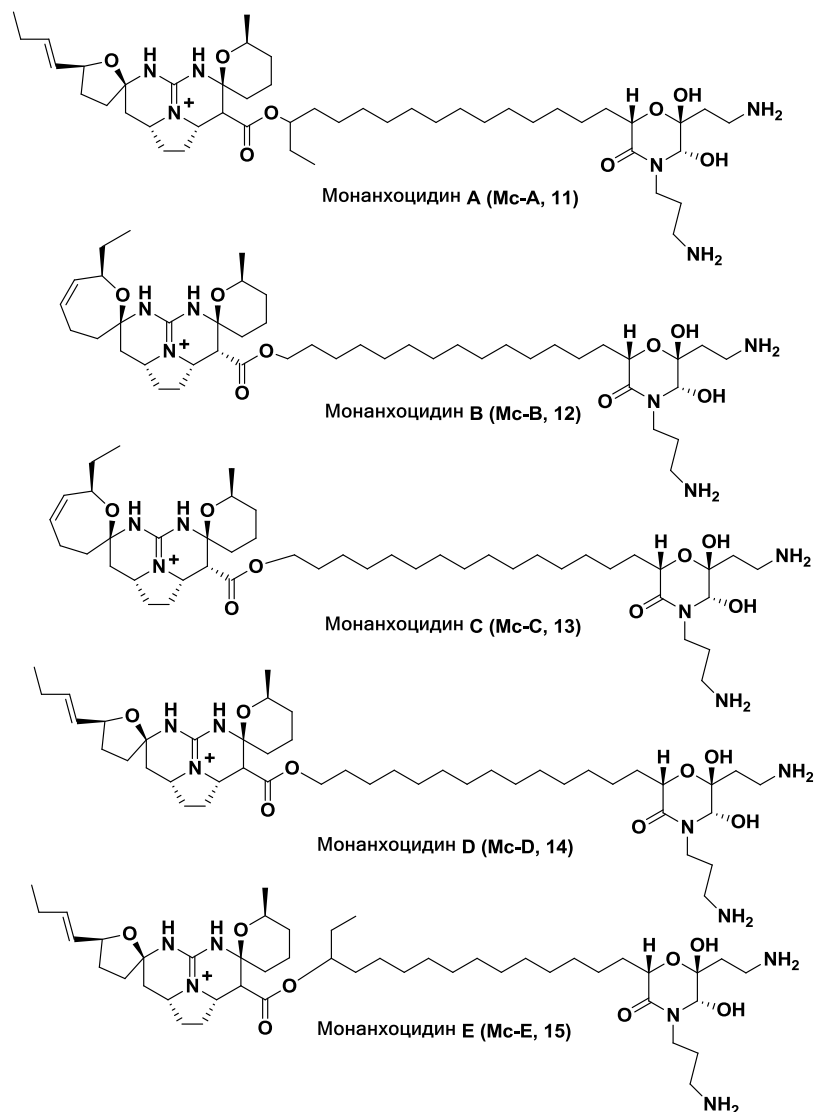
Огавара и коллеги показали, что микаламины А и В способны более специфично, по сравнению с другими белками, ингибировать синтез белка p21^{ras}, который участвует в трансформации и неконтролируемом росте некоторых опухолевых клеток [16]. Эти соединения были способны обращать морфологические изменения клеток, которые были вызваны трансформацией гена *ras*. Более того, клетки с мутированным геном *ras* были более чувствительны к действию микаламинов А и В по сравнению с клетками, экспрессирующими нормальный ген [17].

Наконец, было показано, что сверхэкспрессия Р-гликопротеина – известного фактора множественной лекарственной устойчивости клеток – приводила к снижению чувствительности клеток к микаламину А примерно в 10 раз, в то время как при применении известного лекарственного препарата паклитакселя наблюдалось 1400-кратное снижение такой чувствительности [18]. На основании этого был сделан вывод, что микаламид А и другие педерин-подобные соединения могут быть перспективными для терапии лекарственно-устойчивых типов опухолей.

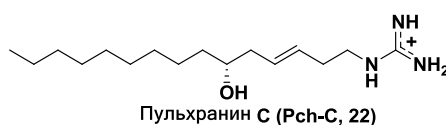
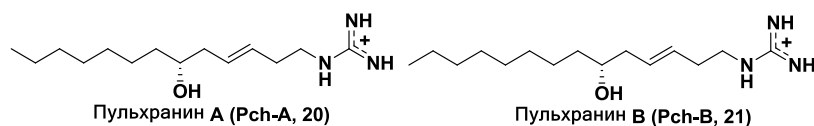
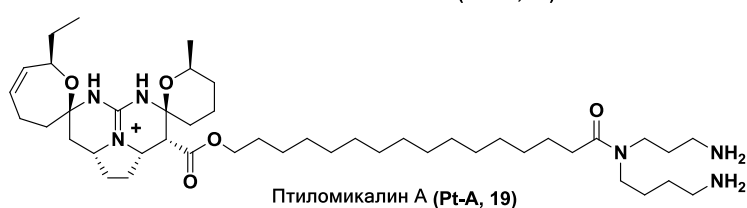
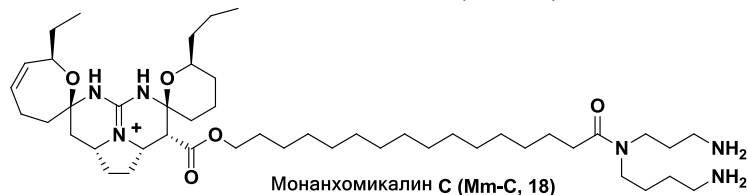
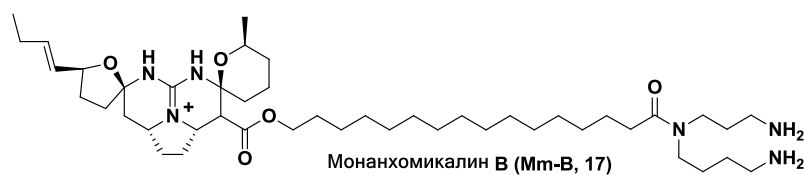
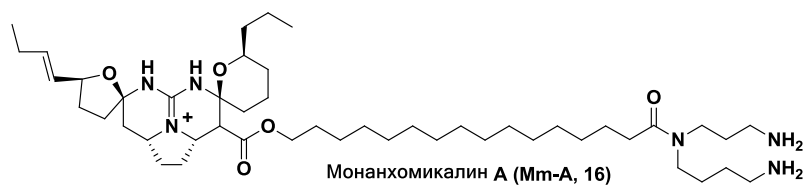
2.2. Гуанидиновые алкалоиды из морской губки *Monanchora pulchra*

Морские губки являются богатым источником различных полициклических гуанидиновых алкалоидов. В данной работе были исследованы гуанидин-содержащие алкалоиды морской губки *Monanchora pulchra*; некоторые из них были ранее найдены также в других губках. Существенный вклад в исследование данных алкалоидов был сделан группой д.х.н. Т.Н. Макарьевой (ТИБОХ ДВО РАН). Так, в 2010 году группой Макарьевой из губки *Monanchora pulchra*, собранной в морях Дальнего Востока России, был выделен новый алкалоид монанхоцидин А (**11**), обладающий беспрецедентной структурой и проявляющий проапоптотические свойства [19]. Годом позже из той же

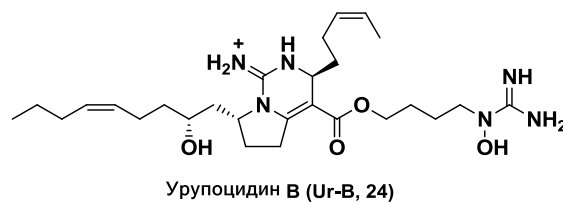
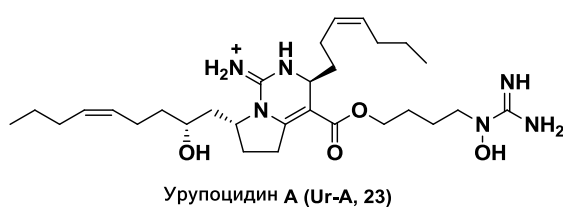
губки были выделены монанхоцидины В (12), С (13), D (14) и Е (15), проявляющие цитотоксическую активность по отношению к клеткам лейкемии человека [20].



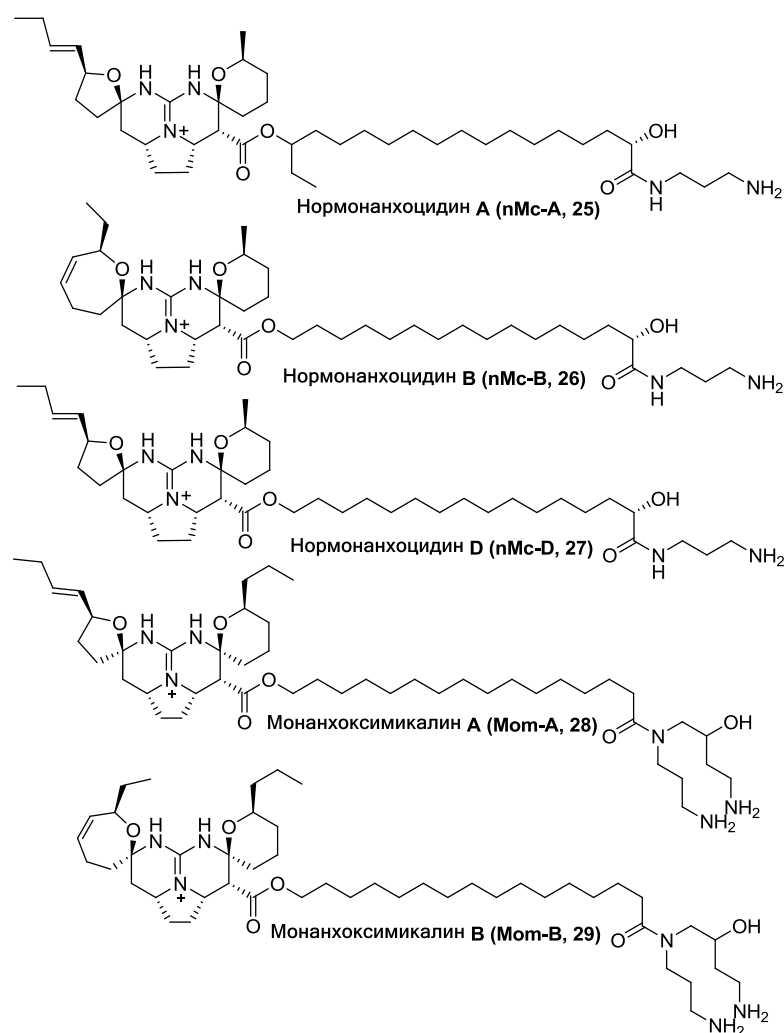
В 2012 году были выделены еще два новых соединения – цитотоксические монанхомикалины А (16) и В (17) [21]. В 2013 году были получены пульхранин А (20) [22], а затем пульхранины В (21) и С (22) [23], способные ингибировать рецептор TRPV1, а также новый цитотоксический алкалоид монанхомикалин С (18) наряду с ранее известным птилиомикалином А (19) [24].



В 2014 году из губки *Monanchora pulchra* были выделены два новых уникальных алкалоида – урупочицины А (23) и В (24), способные увеличивать продукцию NO в мышиных макрофагах [25].



А в 2015 году были найдены 3 новых соединения этой серии – нормонанхоцидины А (25), В (26) и D (27), они также проявляли цитотоксические свойства [26]. Наконец, в 2016 году были выделены аналогичные алкалоиды – монанхоксимикалины А (28) и В (29) [27].



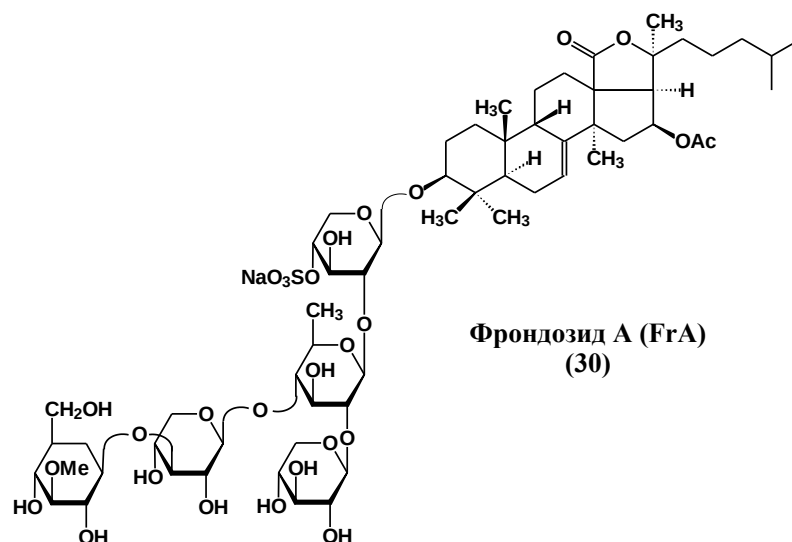
Упомянутые выше соединения, а также подобные им алкалоиды, проявляют различные виды биологической активности, включая цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам человека [19-21, 24, 26-28]. Следует отметить, что о механизмах их цитотоксического действия было известно очень мало. Пожалуй, наиболее хорошо изученными соединениями этой серии являются крамбесцидин-800 и крамбесцидин-816. Было показано, что крамбесцидин-800 способен индуцировать дифференциацию клеток лейкемии K562, приводя к аресту клеточного цикла в S-фазе [29]. Кроме того, это соединение, возможно, ответственно за способность экстракта губки *Crambe crambe* ингибировать пролиферацию и устойчивость клеток рака поджелудочной железы к апоптозу [30]. Механизм цитотоксического действия крамбесцидина-816 был изучен на клетках рака печени человека HepG2 [28]. В результате было установлено, что это вещество ингибирует клеточный цикл в G0/G1-фазе, а также уменьшает количество плотных межклеточных контактов и тормозит миграцию опухолевых клеток [28]. О механизмах цитотоксической противоопухолевой активности других подобных

соединений до проведения описанных в настоящей работе исследований ничего известно не было.

2.3. Тритерпеновые гликозиды голотурий

Голотурии являются морскими беспозвоночными, относящимися к типу Иголокожие (Echinodermata). Голотурий используют в традиционной медицине азиатских стран в течение нескольких столетий [31]. Имеются сообщения, что употребление этих животных в пищу улучшает иммунитет, усиливает сопротивляемость организма к различным заболеваниям, и также помогает при онкологических патологиях [32]. В то же время многие представители голотурий, особенно обитающие в тропических регионах, являются токсичными [33]. Известно, что голотурии содержат гликозиды, большинство из которых является тритерпеновыми [34]. Данные соединения являются основными компонентами, ответственными за биологическую активность экстрактов этих животных [32]. Тритерпеновые гликозиды представляют собой низкомолекулярные соединения природного происхождения, состоящие из агликона тритерпеновой природы и углеводной цепи (как правило, от 2 до 6 моносахаридных остатков) [35]. Агликоны могут отличаться у разных гликозидов за счёт введения в молекулу двойных связей, гидроксильных, ацетатных и других функциональных групп. Углеводная часть молекулы часто содержит сульфатные группы [36]. Для тритерпеновых гликозидов были показаны различные виды биологической активности, среди которых упоминают противоопухолевую активность [32, 37].

В настоящей работе нами была исследована биологическая активность тритерпенового гликозида фрондозид А (FrA, соединение **30**), впервые выделенного Жераром и коллегами из съедобной голотурии *Cucumaria frondosa* [38] и найденного в дальневосточных видах этого рода. *Cucumaria frondosa* является широко распространённым в северной Атлантике и арктических морях и промысловым видом голотурий. Фрондозид А был идентифицирован как основное вещество, ответственное за противоопухолевые свойства экстракта *Cucumaria frondosa* [37]. На настоящий момент FrA не может быть синтезирован с приемлемым выходом в связи со сложностью его химической структуры, однако значительные количества данного соединения могут быть получены при культивировании *Cucumaria frondosa* и других видов голотурий на морских фермах с последующим выделением из них FrA [32]. Недавние исследования выявили перспективную противоопухолевую активность FrA на моделях рака желудка, молочной железы, лёгкого и кишечника [32, 37].



Например, для препарата фронданола 5А – гликолипидного экстракта *Cucumaria frondosa*, содержащего смесь ряда соединений, включающую в том числе и фрондозид А, была показана хемопревентивная активность *in vivo* на модели азоксиметан-индуцируемого рака толстой кишки. Янакирам и коллеги предположили, что данный эффект реализуется за счёт снижения в опухолевых клетках экспрессии циклин-зависимой киназы Cdc25C с увеличением экспрессии белка p21, что приводило к аресту клеточного цикла в S- и G2/M-фазах, а также одновременной индукции апоптоза [39]. Вносит свой вклад в противоопухолевое действие также и стимуляция иммунитета этим веществом [40]. Для фронданола А5Р (осадок полярной фракции фронданола 5А) был показан антипролиферативный эффект на клетках рака поджелудочной железы S2013 и AsPC-1. Данный эффект объясняется способностью индуцировать G2/M-арест клеточного цикла путем снижения экспрессии циклинов А и В, и Cdc5C. Кроме того, при обработке клеток фронданолом А5Р наблюдалась активация киназ JNK1/2 и p38, активация каспазы-3 и увеличение экспрессии гена p21 [41].

Сильченко и коллеги показали, что FrA обладает цитотоксической активностью по отношению к опухолевым клеткам HeLa и ТНР-1 в низких микромолярных концентрациях, способностью снижать транскрипционную активность белка p53 в клетках млекопитающих, а также способностью ингибировать злокачественную трансформацию клеток JB6 P⁺ Cl41 при действии на них EGF [34].

Ли и соавторы исследовали активность FrA *in vitro* и *in vivo* на моделях рака поджелудочной железы AsPC-1. Была показана способность FrA индуцировать апоптоз, предположительно индуцируется через митохондриальный путь. Обработка клеток этим веществом приводила к снижению экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и Mcl-1, активации каспазы-7, -9 и -3, а также повышению экспрессии белков Bax и p21 [42]. В

более поздних экспериментах на этом же типе рака было исследовано совместное действие FrA в комбинации его с гемцитабином. Было показано, что комбинация данных соединений является более эффективной, нежели индивидуальные вещества. Таким образом, авторы сделали вывод о синергическом действии FrA в комбинации с гемцитабином [43]. Однако, следует отметить, что исследований синергического эффекта как такового авторами в данной работе не проводилось, и, скорее всего, в исследовании имел место быть аддитивный эффект. Двумя годами позже та же группа в экспериментах *in vivo* показала, что терапия с применением FrA является эффективной только в том случае, если вещество вводится систематически. Также было показано, что наиболее эффективным способом введения, обеспечивающим наибольшую концентрацию FrA в плазме крови, является внутривенное введение [44].

Джин и коллеги установили способность FrA индуцировать каспаза-независимый апоптоз в клетках лейкемии HL-60, NB4 и THP-1, в отличие от другого тритерпенового гликозида – кукумариозида A₂-2, который индуцировал каспаза-зависимый апоптоз в тех же клетках. На основании полученных данных авторы сделали вывод, что тритерпеновые гликозиды, в зависимости от структуры, могут индуцировать каспаза-зависимый или -независимый апоптоз опухолевых клеток [45].

Аль Марцоуки и коллеги показали, что FrA является более активным по отношению к клеткам рака молочной железы человека MDA-MB-231 в сравнении с нормальными клетками человека MCF10-A. FrA индуцировал апоптоз опухолевых клеток, которому сопутствовала активация каспаз-3, -7 и -9, а также белка p53. FrA также ингибировал миграцию и инвазию опухолевых клеток и усиливал противоопухолевый эффект противоопухолевого лекарства паклитакселя *in vivo* [46]. Позднее было показано, что FrA ингибирует метастазирование опухолевых клеток молочной железы *in vivo* за счёт своей способности антагонизировать EP2 и EP4 – рецепторы простагландина E. Наблюдаемый эффект приводит к последующему ингибированию EP4 и EP2-зависимой активации cAMP, а также EP4-зависимой активации ERK1/2 [47].

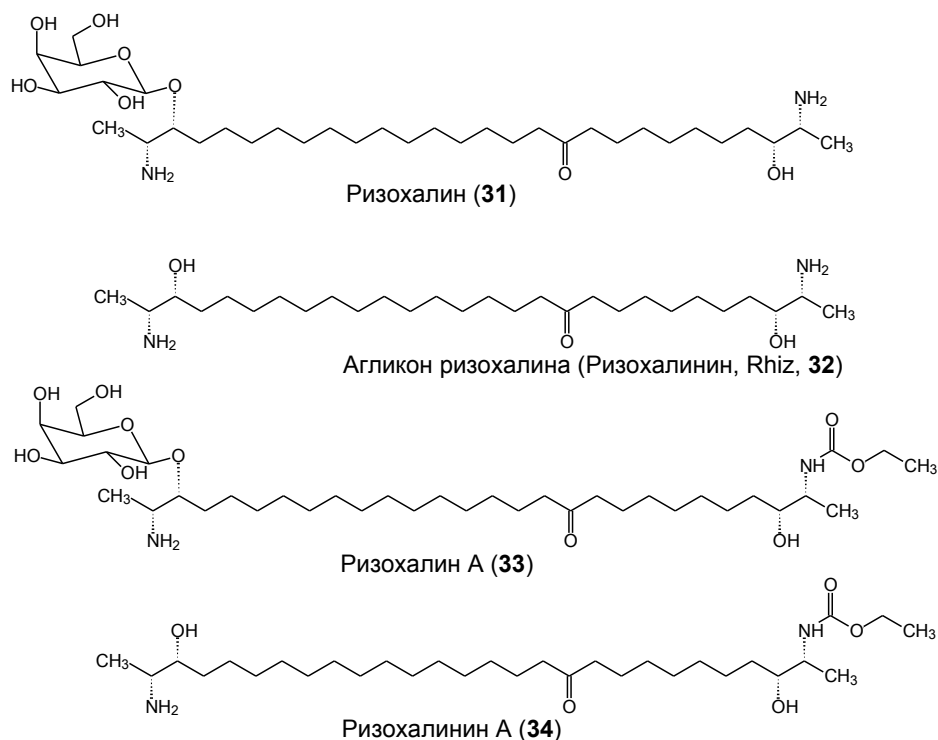
Аттоуб и коллеги исследовали действие FrA на клетки рака лёгкого *in vitro* и *in vivo*, как индивидуально, так и в комбинации с цисплатином. Было показано, что FrA индуцировал апоптоз опухолевых клеток, сопровождаемый активацией каспаз-3 и -7, ингибировал инвазию и миграцию опухолевых клеток *in vitro*. В экспериментах *in vivo* FrA снижал ангиогенез и метастазирование опухолевых клеток, а также усиливал цитотоксическое действие цисплатина [48].

Таким образом, неоднократно была показана способность FrA усиливать противоопухолевое действие известных химиотерапевтических препаратов [43, 46, 48]. Не

так давно Менчинская и коллеги предположили, что данное свойство FrA обусловлено его способностью ингибировать мембранный транспорт, идущий через Р-гликопротеин [49].

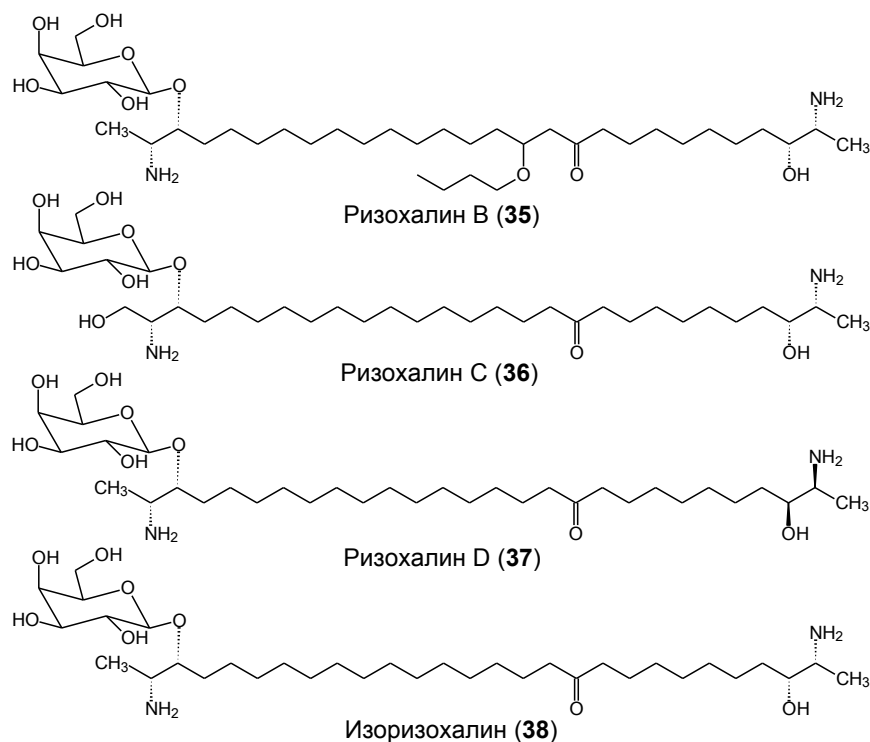
2.4. «Двухголовые» (биполярные) сфинголипиды морских губок

Сфинголипиды представляют собой соединения липидной природы, в структуре которых присутствует сфингоидное основание. Сфингоидные основания – это аминокиспирты с углеводородной цепью, как правило, имеющие длину цепи C18 [50]. В морских губках была найдена особая группа «двухголовых» сфинголипидов, открытых в ТИБОХ ДВО РАН, которая представляет собой серию необычных α,ω -бифункциональных соединений, в которых два сфинголипидоподобных остатка соединены «хвост к хвосту» [50]. Имеющий беспрецедентную структуру первый представитель данной группы соединений – ризохалин (**31**) – был выделен Макарьевой и коллегами в 1989 году из морской губки *Rhizochalina incrustata* [51].



В 2000 году Молинский и соавторы описали получение ризохалинина (агликон ризохалина, Rhiz, **32**) из самого ризохалина [52]. В 2005 году этой же научной группой из той же губки был выделен второй представитель данной группы соединений – ризохалин А (**33**) [53], а двумя годами позднее было сообщено о выделении его агликона – ризохалинина А (**34**) [54], в 2007 году – ризохалинов С (**36**) и D (**37**) [55], в 2008 году –

ризохалина В (35), а также перацетатной формы ризохалинина В [56], а в 2009 – изоризохалина (38) [57]. Наряду с природными производными ризохалина в ТИБОХ ДВО РАН был также получен ряд его полусинтетических производных [55, 58-60].



Помимо ризохалинов и их производных, известны также другие аналогичные природные бифункциональные сфинголипидные соединения, например, каликсинин, выделенный из губки *Calyx* sp. семейства Oceanariidae [61, 62] и океанализид и его агликон океанин, полученные из морской губки *Oceanapia phillipensis* [63, 64]. В 1993 году Канг и коллеги выделили из морской губки *Leucetta microraphis* леуцеттамолы А и В [65]. Ещё одно соединение этого класса – BRS1 – было выделено из губки, принадлежащей к классу Calcarea [66]. Наконец, в 1997 году из губки *Leucetta leptorhaphis* был выделен рапсамин [67].

Противоопухолевая активность двухголовых сфинголипидов была изучена относительно слабо. Ризохалин и многие его производные проявили цитотоксическую активность по отношению к различным опухолевым клеткам человека [53-58, 60, 68]. Для этой группы соединений было показано, что агликоны являются более активными молекулами, чем гликозилированные производные [58, 60]. Было показано, что ризохалин (31), а также агликоны ризохалина (ризохалинин, 32) и ризохалина А (33) при обработке ими клеток лейкемии человека HL-60 вызывают активацию каспаз-3, -9 и -8, а также расщепление PARP [60]. Имеются сообщения, что ризохалин и его производные

проявляют цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам человека THP-1, HeLa и SNU-C4, способны предотвращать злокачественную трансформацию клеток JB6 P⁺Cl41 под действием EGF, а также индуцировать апоптоз предположительно по p53-независимому механизму [58]. Позднее было показано, что обработка клеток рака кишечника HT-29 агликоном ризохалина (32) приводит к активации киназы AMPK, и тем самым ингибирует сигналинг mTOR/p70S6/ERK1/2. Это также приводило к активации транскрипционной активности ядерного фактора AP-1, и индукции апоптоза, сопровождаемого активацией каспазы-3, расщеплением PARP и фрагментацией ДНК. Дополнительно было показано, что ризохалинин ингибирует колониеобразование клеток HT-29 [68]. Ризохалин был испытан *in vivo* на модели асцитной карциномы Эрлиха, результаты экспериментов показали, что вещество способно увеличивать среднюю продолжительность жизни мышей на 70% по сравнению с контрольной группой [69]. Имеются также сообщения о мембранной активности ризохалина [69, 70].

В отношении других двухголовых сфинголипидов известно, что рапсамин проявляет цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам KB [67]. Было показано, что леуцеттамол А способен ингибировать образование комплекса убиквитиновых ферментов Ubc13-Uev1A и сделано предположение, что леуцеттамол А может обладать противоопухолевой активностью, реализующейся посредством активации белка p53 [71].

2.5. Герминальные опухолевые клетки

2.5.1. Аберрантное развитие и опухоли половых клеток

Размножающиеся половым путём организмы состоят из двух типов клеток, которыми являются «смертные» соматические и «бессмертные» половые клетки, которые вовлечены в репродуктивные процессы [72]. Аномалии в развитии половых клеток, особенно в эмбриональный период, могут привести к неправильному функционированию половых желёз, бесплодию или опухолям половых (герминальных) клеток (germ cell tumors, GCT) [73].

На стадии раннего эмбриогенеза образующиеся из первичных половых клеток сперматогонии затем мигрируют в семенники. После полового созревания сперматогонии быстро пролиферируют и претерпевают мейоз, становясь при этом сперматоцитами. Первичные сперматоциты продолжают пролиферировать посредством мейоза и далее становятся вторичными сперматоцитами. Далее, вторичные сперматоциты производят гаплоидные сперматиды, которые затем дифференцируются в зрелые сперматозоиды [74].

Опухоли половых клеток (germ cell tumors, GCT) подростков и взрослых были названы II типом GCT. На основании гистологических и клинических данных их классифицируют как семиномы (к которым относится около 50% GCT), несеминомы (~40% GCT) и опухоли, совмещающие семинозные и несеминозные характеристики (~10% GCT) [75]. Семиномы представляют собой однотипные опухоли, состоят из клеток, схожих с первичными половыми клетками (гоноцитами) и обладающих характеристиками эмбриональных половых клеток. Несеминомы же, напротив, высоко гетерогенны и содержат один или несколько гистологических подтипов, таких как тератому, хориокарциному, младенческую эмбриокарциному и эмбриональную карциному. Эти типы опухолей имеют разный маркерный профиль и обладают различными характеристиками [76].

Тестикулярная карцинома является наиболее часто встречающимся типом солидных герминальных опухолей подростков и юношей в возрасте от 15 до 35 лет, относящихся к европеоидной расе [77, 78]. За последние десятилетия количество случаев возникновения этого типа опухолей взрослых увеличилось [79]. Факторы, связанные с риском возникновения рака яичка, включают такие патологии как предшествующие случаи тестикулярной карциномы, дисплазия гонад, крипторхизм, а также различные формы нарушения полового развития [80].

До разработки и введения в медицинскую практику в середине 1970-х годов терапии, основанной на применении соединений платины, тестикулярная карцинома на стадии метастазирования в большинстве случаев приводила к летальному исходу [81]. Комбинированная терапия с использованием цисплатина, этопозида и блеомицина стала первоочередной и стандартной для пациентов с диагнозом GCT.

Современное лечение опухолей GCT основано на комбинации хирургического подхода, радиотерапии и химиотерапии. Даже на стадии метастазирования при использовании комбинированной химиотерапии с применением цисплатина (цис-диаминдихлорплатина (II)) процент выздоровления достигает 80 [82]. Такая высокая эффективность объясняется чувствительностью данного типа клеток к ДНК-повреждающим агентам, связанной с особенностями герминальных клеток, а также с их происхождением. Так, эмбриональные стволовые клетки с повреждённой ДНК, похожие по характеристикам на клетки NTERA-2, претерпевают репарацию или апоптоз, защищая и сохраняя таким образом правильную генетическую информацию, что особенно важно на ранних этапах развития организма [75].

Несмотря на высокий процент излечения у 10–30% пациентов с метастазированными несеминоматическими GCT II типа (к которому относятся клетки

NTERA-2 и NCCIT) развивается устойчивость к основанной на применении цисплатина терапии [83]. Процесс развития устойчивости все еще плохо изучен и, по всей вероятности, является многофакторным [84]. Основанная на цисплатине терапия сопровождается рядом побочных эффектов, к которым относят нефротоксичность, подавление функций костного мозга и проявления нейротоксичности в разных формах, включая нейросенсорную и нейромоторную нейропатию, а также ототоксичность [81]. На данном этапе основные усилия исследователей, работающих в настоящий момент над новыми методиками лечения GCT, направлены на разработку альтернативных терапий с использованием менее токсичных препаратов.

2.5.2. Цисплатин-устойчивые клеточные линии GCT

Линия опухолевых клеток NTERA-2 (далее NT2) широко используется в исследовании лекарственно устойчивых GCT. Данная клеточная линия была получена из образца лёгочного метастаза тератокарциномы Tera-2 (тестикулярная карцинома), относящейся к тератомам (GCT II типа). Было установлено, что эта клеточная линия проявляет свойства эмбриональной карциномы, такие как, например, способность к дифференциации под действием некоторых биологически активных соединений (плюрипотентность), к примеру, ретиноевой кислоты [85]. Кроме того, эти клетки экспрессируют дикий тип белка p53 [86]. Клетки NCCIT являются плюрипотентными экстрагонадными GCT клетками, несущими мутантный белок p53. А клетки 2102EP – неплюрипотентными клетками эмбриональной карциномы, несущими дикий тип p53; эти клетки были получены из первичной тестикулярной тератокарциномы человека [86].

Цисплатин-устойчивые клеточные линии NTERA2-R, NCCIT-R и 2102EP-R были созданы из клеток линий NTERA-2, NCCIT и 2102EP в результате длительной обработки (18 месяцев) этих клеток химиотерапевтическим препаратом цисплатином в субтоксических концентрациях. Обработку начинали с дозы IC₁₀ и продолжали до достижения 50% гибели клеток, после чего её прекращали и давали клеткам возможность восстановиться в течение трёх пассажей. Таким образом, были созданы клеточные линии примерно в 10 раз менее чувствительные к цисплатину, чем клетки соответствующих материнских линий [86].

2.6. Рак простаты

Рак простаты является наиболее частым типом рака среди мужчин и третьим по количеству смертей в странах Европы [87]. Большинство пациентов с локальными рецидивами или метастазами изначально чувствительны к так называемой андроген-депривационной терапии [88]. Для своего роста клетки рака простаты, как правило, нуждаются в мужских половых гормонах, таких как тестостерон и дигидротестостерон. Андрогеновые рецепторы и связанные с ними процессы передачи сигнала (сигналинг) играют ключевые роли в прогрессии опухоли, обеспечивая рост и развитие клеток рака простаты. Именно поэтому при лечении рака простаты в первую очередь применяется гормональная терапия, направленная на подавление данного сигналинга. Андроген-депривационная терапия с применением хирургического или медикаментозного подходов направлена на снижение уровня вырабатываемых организмом мужских половых гормонов (андрогенов), что приводит к остановке роста клеток простаты [89]. Медикаментозный подход включает в себя использование антиандрогенов, а также химическую кастрацию. Применение данного вида терапии на начальных стадиях заболевания, как правило, ведёт к уменьшению опухоли или замедлению её роста, в то же время этот вид терапии должен быть комбинирован с радиотерапией, потому что сама андроген-депривационная терапия обычно уменьшает агрессивность рака простаты, но не ведёт к полному уничтожению опухолевых клеток [90].

Наряду с применением классических химиотерапевтических препаратов, например, доцетакселя и кабазитакселя, в последние годы были разработаны новые более эффективные препараты, такие как абиратерон и энзалутамид. Их действие основано на подавлении сигналинга андрогенового рецептора. Эти препараты эффективны при лечении рака простаты, устойчивого к классической гормональной терапии. Механизм действия абиратерона основан на ингибировании синтеза андрогенов (в том числе синтезируемых самой опухолью), в то время как энзалутамид является ингибитором андрогенового рецептора, предотвращающим связывание с ним андрогенов [91]. Эти лекарственные препараты блокируют димеризацию андрогенового рецептора и, как следствие, делают невозможной его последующую транслокацию (перемещение) в ядро, где он активирует программу транскрипции, обеспечивая пролиферацию и выживание клеток рака простаты, и, в том числе, экспрессию простатического специфического антигена PSA [91] (Рис. 1).

В настоящее время прогноз при лечении рака простаты в большинстве случаев является неблагоприятным из-за развития лекарственной устойчивости к применяемым противоопухолевым препаратам [92]. У большинства пациентов через 18-24 месяцев после начала лечения болезнь вновь начинает прогрессировать вследствие развития

формы рака простаты, устойчивой к гормональной терапии (т.н. castration-resistant prostate cancer, CRPC) [88]. Наиболее частыми причинами развития этой устойчивости являются мутации андрогенового рецептора (AR) [93], экспрессия различных вариантов сплайсинга AR [93], цитопротекторная аутофагия [94], повышенное выведение лекарственного препарата из клетки при участии р-гликопротеина, повышенный метаболизм глутатион-S-трансферазы, экспрессия различных форм тубулина с различной кинетикой формирования микротрубочек [95] и другие [93].

Экспрессия варианта 7 сплайсинга андрогенного рецептора (AR-V7) и подобных ему вариантов сплайсинга (AR-Vs) является одним из новых, недавно открытых механизмов лекарственной устойчивости рака простаты. Такая форма андрогенового рецептора не имеет С-терминального лиганд-связывающего домена (с которым связываются андрогены) [96]. Примечательно, что вместо потери своей функции такие формы AR способны активировать AR-сигналинг в отсутствие андрогенов (Рис. 1) [91]. Позднее было показано, что экспрессия AR-V7 во взятых у пациентов образцах биопсии коррелирует с устойчивостью опухолей к гормональной терапии, включая терапию с применением абиратерона и энзалутамида [97]. Таким образом, вещества, проявляющие противоопухолевую активность по отношению к клеткам рака простаты человека, экспрессирующим AR-V7, или имеющим мутантный AR, представляют собой особый интерес в качестве потенциальных активных субстанций новых противоопухолевых препаратов.

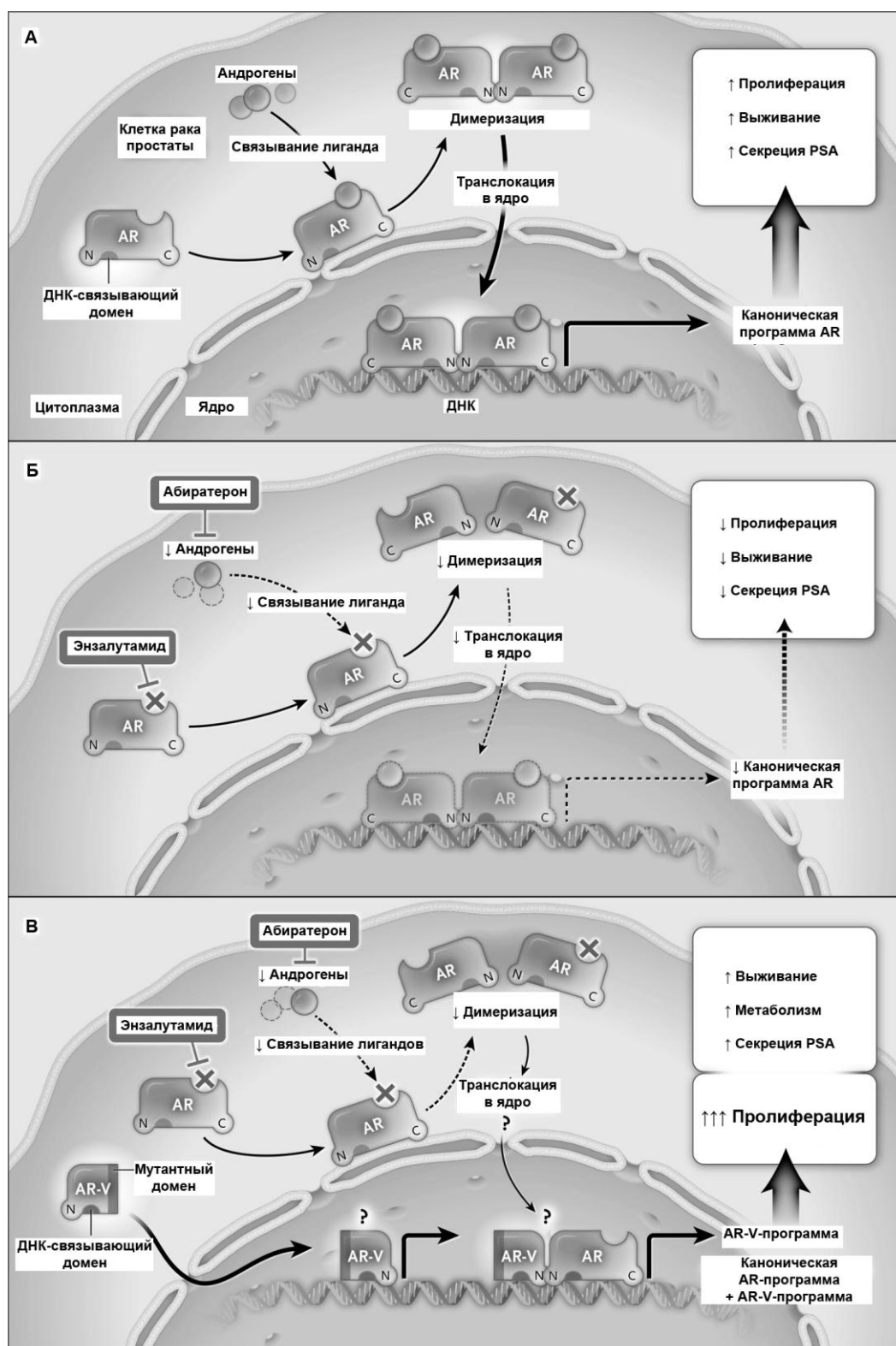


Рисунок 1. AR-сигналинг и механизм лекарственной устойчивости, определяемый экспрессией альтернативных вариантов сплайсинга андрогенового рецептора (AR-Vs). (А) Андрогеновый рецептор активируется за счёт связывания с лигандами (андрогенами), что приводит к его димеризации, транслокации в ядро и активации канонической транскрипционной программы, приводящей к пролиферации и выживанию клеток рака простаты, а также к секреции PSA. (Б) Абиратерон уменьшает продукцию андрогенов, а

энзалутамид ингибирует их связывание с андрогеновым рецептором. Оба процесса ведут к ингибированию AR-сигналинга и, как следствие, к торможению пролиферации, индукции апоптоза клеток рака простаты и уменьшению экспрессии PSA. (В) Экспрессия вариантов сплайсинга андрогенового рецептора (AR-Vs, в частности AR-V7) приводит к отмене эффекта абиратерона и энзалутамида из-за отсутствия в рецепторах С-терминального лиганд-связывающего домена, в отличие от полноразмерного AR (AR-FL, AR-full length). AR-V7 функционирует независимо или совместно с полноразмерным AR-FL, приводя к перманентной активации транскрипционной программы, что в свою очередь приводит к активации AR-сигналинга и повышенной пролиферации клеток рака простаты [91, 98]. Рисунок был адаптирован из работы Нельсона и соавторов [91]

В настоящее время используются несколько моделей рака простаты человека. Примерами таких моделей могут быть клетки PC-3 и DU145, не экспрессирующие ни полноразмерный AR-FL, ни AR-V7; клетки 22Rv1 и VCaP, экспрессирующие одновременно и AR-FL, и AR-V7; а также клетки LNCaP, экспрессирующие AR-FL, но не AR-V7 [99, 100]. Эти модели обеспечивают широкие возможности для поиска веществ, влияющих на AR-сигналинг и ингибирующих лекарственно устойчивые клетки рака простаты человека.

2.7. Лимфома Бёркитта

В 1958 году Денис Бёркитт впервые описал форму лимфомы, позднее названную его именем [101]. В то время лимфома Бёркитта была ответственна за 30–50% всех случаев онкологических заболеваний детей в Африке. Затем случаи этого заболевания были выявлены и в других странах [102]. Лимфома Бёркитта – очень агрессивное заболевание В-лимфоцитов, представляющее собой солидную опухоль лимфоидных органов и ассоциированное в 95% случаев с инфицированием вирусом Эпштейна-Барра. Данный тип опухоли имеет наименьшее время удваивания количества клеток из всех известных опухолей человека [102].

Общая особенность практически всех случаев лимфомы Бёркитта – это транслокация протоонкогена *MYC* в иммуноглобулиновый (Ig) локус. Онкоген *MYC*, один из наиболее часто активируемых онкогенов в опухолевых клетках человека, играет ключевую роль примерно в 20% всех случаев заболевания раком. Фактор транскрипции *c-myc*, кодируемый этим онкогеном, регулирует прогрессию клеточного цикла,

пролиферацию, клеточную дифференциацию и апоптоз [103]. Он непосредственно вовлечён в развитие лимфомы Бёркита [102].

Низкая эффективность лечения лимфомы Бёркитта после использования стандартной химиотерапии часто связана с развитием устойчивости к апоптоз-индуцирующим стимулам [104, 105]. Например, каспаза-зависимый апоптотический путь в клетках лимфомы Бёркитта может не функционировать по причине сверхэкспрессии эндогенных ингибиторов каспаз, мутаций кодирующих гены каспаз или белковых молекул, находящихся выше или ниже по сигнальному каскаду, а также пониженным уровнем экспрессии соответствующих генов [105, 106]. Кроме того, было показано, что в 30–40% образцов биопсий лимфомы Бёркитта был экспрессирован мутантный p53 [107]. Наличие мутантного p53 коррелировало с пониженной чувствительностью к апоптоз-индуцирующим агентам и неблагоприятным прогнозом лечения [105, 108]. Таким образом, соединения, способные индуцировать апоптоз независимо от активности каспаз и статуса белка p53, представляют большой интерес для разработки способов лечения данного заболевания [109].

2.8. Рак мочевого пузыря

Уротелиальная карцинома, и, в частности, рак мочевого пузыря, представляет большую проблему в плане его лечения. Химиотерапия, основанная на использовании соединений платины, приводит к положительному результату в 40–70% случаев при лечении рака мочевого пузыря на поздних стадиях. Однако в большинстве случаев продолжительность положительного ответа на лечение невелика. А при повторном развитии опухоли прогноз лечения, как правило, является неблагоприятным [110]. До настоящего времени результаты использования индивидуальных препаратов, либо их комбинаций на этой стадии лечения не были обнадеживающими [111]. Так, в Европе единственный препарат, одобренный к применению для «второй линии терапии» – это винфлунин [112]. До недавнего времени в США не было ни одного разрешенного к применению на этой стадии заболевания препарата [112]. Однако в мае 2016 года атезолизумаб – ингибитор PD-L1 – был одобрен FDA для лечения пациентов с локализованным или метастатическим раком мочевого пузыря в случаях, не поддающихся лечению препаратами на основе платины. Тем не менее, пациенты, в опухолевых клетках которых белок PD-L1 не экспрессируется, могут быть малочувствительными к атезолизумабу [113].

Основными причинами лекарственной устойчивости данного типа опухолей считают сверхэкспрессию ERCC1, Nrf2, CTR1/2, hENT1 и BRCA1, экспрессию специфических микроРНК, эпителиально-мезенхимальный переход, мутированный белок p53 и цитопротекторную аутофагию [114, 115]. В частности, отсутствие экспрессии белка p53 или экспрессия его мутантной формы были обнаружены более чем в 60% случаев рака мочевого пузыря [116] у пациентов с агрессивным формой заболевания [117, 118]. Кроме того, предполагают, что статус белка p53 может выступать в качестве прогностического маркера эффекта систематического лечения на прогрессию опухоли [117, 118]. Дефективность p53 является хорошо известной причиной лекарственной устойчивости не только клеток рака мочевого пузыря, но и многих других опухолевых клеток [109, 114, 119].

2.9. Клетки JB6 P⁺Cl41 - модель для изучения канцеропреventивных веществ

Процесс канцерогенеза представляет собой ускоренные изменения клеток, при котором гены, контролирующие пролиферацию, дифференциацию и апоптоз, трансформируются под действием каких-либо внешних факторов [120].

Принято выделять три фазы развития раковой опухоли, а именно инициацию, стимулирование и прогрессию. **Фаза инициации** представляет собой возникающее под действием какого-либо канцерогена, например, 7,12-диметилбенз[а]антрацена (DMBA), необратимое повреждение ДНК в ранее нормальной клетке. В течение **фазы стимулирования** повреждение ДНК закрепляется за счёт его воспроизведения при делении клетки с получением клеточного клона, при этом это повреждение становится мутагенным. На этой стадии необходимо дополнительное действие промотора развития опухоли, например эпидермального фактора роста (EGF) или 12-О-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетата (TPA). В **фазе прогрессии** происходит возникновение новых клонов поврежденных клеток, обладающих повышенной способностью к пролиферации, инвазии и метастазированию [121].

В последнее время большое внимание учёных и медиков привлекают канцеропреventивные соединения. К этим веществам относят природные метаболиты или их синтетические аналоги, которые ингибируют одну из фаз развития опухоли, например, трансформацию нормальных клеток в прораковые или прогрессию прораковых клеток в опухолевые [122]. Существует ряд методик оценки канцеропреventивной активности веществ *in vitro* [123]; одним из наиболее широко применяемых методов является тест с использованием мышинных эпителиальных клеток JB6 P⁺ Cl41. Данный метод основан на

способности клеток JB6 P⁺ Cl41 претерпевать злокачественную трансформацию в мягком агаре под действием EGF или других канцерогенных факторов в качестве промоторов этой трансформации и в итоге образовывать колонии [124]. Изначально линия JB6 была получена из эпителиальных клеток новорождённой мыши BALB/c, которые были способны спонтанно образовывать бессмертные клетки. Данные клетки позднее приобрели чувствительность (P⁺), либо устойчивость (P⁻) к TPA- или EGF-индуцируемому колониообразованию в мягком агаре (а также к канцерогенезу в мышцах) [125, 126]. Во многих экспериментах по поиску и изучению канцеропреventивных веществ используют промотор-чувствительный клон JB6 P⁺ Cl41. Известно, что в процесс EGF-индуцируемой трансформации вовлечена киназа ERK1/2. Данная киназа затем активирует ядерные факторы AP-1 [127] и NF-κB [128, 129], регулирующие транскрипцию различных генов, ответственных за процессы воспаления, пролиферации и метастазирования опухолевых клеток. Показано, что ингибирование транскрипционной активности ядерных факторов AP-1 и NF-κB в клетках JB6 P⁺ Cl41 предотвращает их EGF-индуцируемую трансформацию [130]. Поскольку в эксперименте оценивается ингибирование эффекта опухолевым промотором (чаще всего EGF или TPA), то эта методика подходит для изучения хемопреventивной активности препаратов, действующих на стадии стимулирования и прогрессии (но не на стадии инициации) [123].

2.10. Апоптоз

2.10.1. Каспаза-зависимый апоптоз

Апоптоз (программируемая клеточная смерть I типа) – это регулируемый и программируемый процесс клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца. При апоптозе клетка сохраняет целостность вплоть до поздних стадий процесса, а образующиеся апоптотические тельца обладают цитоплазматической мембраной и затем поглощаются посредством фагоцитоза [131, 132]. В результате, в отличие от некротической гибели, в организме не происходит воспалительной реакции на продукты распада. Признаками апоптоза являются утрата межклеточных контактов, разрушение цитоскелета, конденсация хроматина, фрагментация ДНК, экстернализация (перемещение) фосфатидилсерина на внешнюю сторону мембраны, сжатие клеток и блеббинг (образование многочисленных пузырей) клеточной мембраны [133].

Важнейшую роль в реализации классического апоптоза играют сериновые протеазы – каспазы. В нормальном состоянии эти белки существуют в клетке в виде своих

неактивных форм – прокаспаз; активация последних путём их расщепления на определённые фрагменты происходит при апоптозе и, как правило, приводит к клеточной гибели. Различают так называемые иницирующие (каспаза-8 и -9) и эффекторные каспазы (каспаза-3, -6, -7) [134, 135]. Активация иницирующих каспаз приводит к активации эффекторных каспаз, что в свою очередь приводит к последующим апоптотическим событиям [135].

Выделяют два основных пути активации апоптоза: рецептор-зависимый и митохондриальный сигнальные пути. Рецептор-зависимый путь начинается с активации одного из так называемых «рецепторов смерти», например TNF или Fas [136]. Активация этих рецепторов приводит к связыванию их с адаптерами FADD и TRADD, которые, в свою очередь, связываются с прокаспазой-8, что и приводит к её активации. Активная каспаза-8 является протеазой, которая за счёт своей протеолитической активности осуществляет активацию каспазы-3 и других эффекторных каспаз (Рис. 2) [136].

При реализации митохондриального сигнального пути происходит пермеабиллизация (изменение проницаемости) внешней митохондриальной мембраны, что приводит к выходу в цитоплазму цитохрома С, а также других митохондриальных белков [137]. Цитохром С образует комплекс с APAF1 (апоптотический протеаза-активирующий фактор-1) и прокаспазой-9 – так называемую апоптосому, в которой происходит активация каспазы-9 [138]. Далее, активная форма каспазы-9 активирует прокаспазу-3 и другие эффекторные каспазы [135], которые, в свою очередь, приводят к прямому и опосредованному разрушению клеточных структур, таких как ядерные структуры и цитоскелет [135]. Другой проапоптотический эффект каспаз заключается в инактивации белков, блокирующих апоптоз. Так, эффекторные каспазы осуществляют расщепление фактора фрагментации ДНК (DFF), ДНКазы CAD, антиапоптотических белков семейства Bcl-2, а также некоторых факторов, участвующих в репарации ДНК, таких как PARP. Всё это ведёт в итоге к апоптотической клеточной гибели (Рис. 2) [135, 139-141].

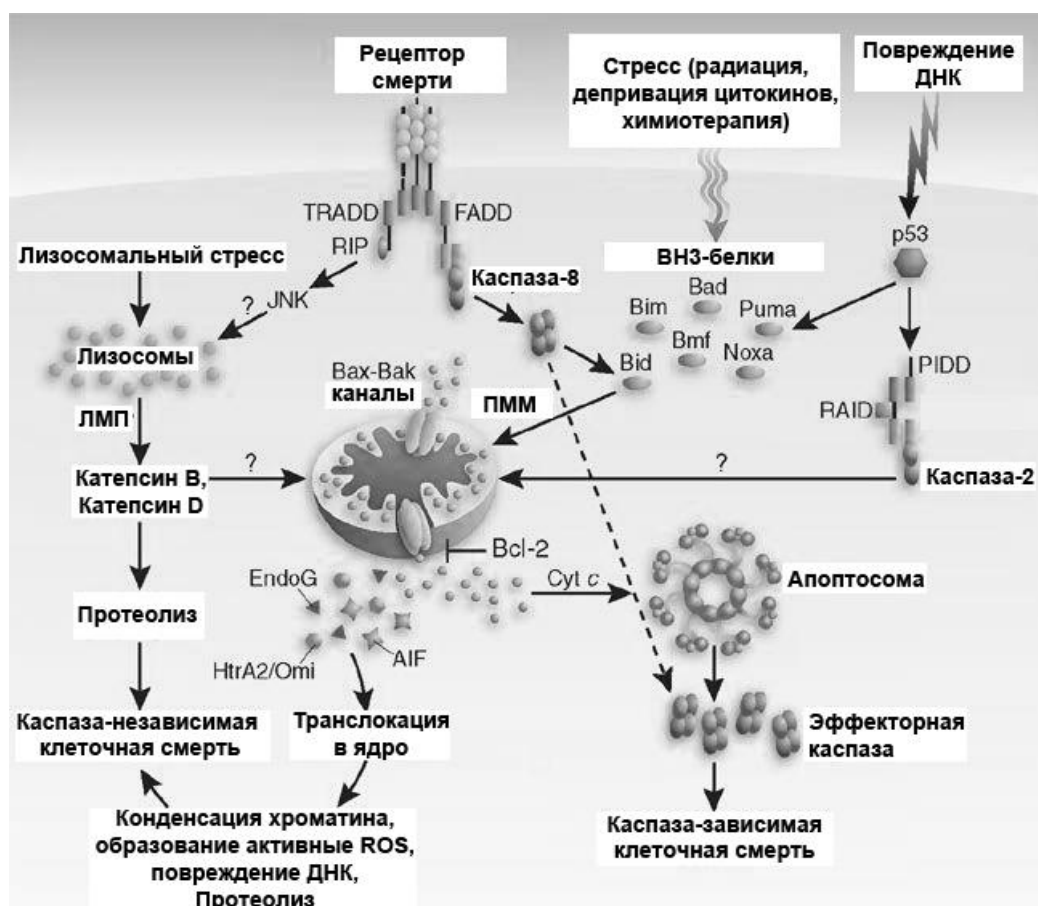


Рисунок 2. Механизмы каспаза-зависимого и каспаза-независимого апоптоза. Рисунок был адаптирован из работы Крёмера и Мартина [142]

2.10.2. Каспаза-независимый апоптоз

Кроме клеточной гибели, осуществляемой посредством аутофагии и некрозоподобных процессов, тремя важнейшими механизмами, которые могут привести к каспаза-независимой клеточной смерти, являются стрессы эндоплазматического ретикулума, митохондрий или лизосом, ведущие к их пермеабилзации с образованием пор в мембранах этих органелл [143]. Эти процессы могут быть также тесно связаны между собой. Наиболее часто встречающийся из них – это пермеабилзация мембран митохондрий (ПММ). Проницаемость митохондриальной мембраны для цитохрома С и других белков регулируется белками семейства Bcl-2, такими как ингибиторы апоптоза Bcl-2 и Bcl-xL и промоторы апоптоза Bax, Bik и Bid. Соотношение уровней экспрессии данных белков определяет, приведёт ли проапоптотический сигнал к клеточной смерти [139, 142] (Рис. 2). Другой механизм – это прямое воздействие на митохондрии с образованием в их мембранах пор, что ведёт к увеличению их проницаемости и позже к нарушению целостности мембраны, в результате чего митохондриальные белки выходят во

внутриклеточное пространство [46]. Помимо упомянутого выше цитохрома С, который вызывает апоптоз через активацию каспазы-9 посредством формирования апоптосомы, заслуживают внимания белок Omi/HtrA2, эндонуклеаза G и апоптоз-индуцирующий фактор AIF (Рис. 2).

Omi/HtrA2 вместе с другим митохондриальным белком Smac/DIABLO являются ингибиторами белка IAP, который, в свою очередь, ингибирует активность цитохрома С. Таким образом, Omi/HtrA2 играет важную роль в каспаза-зависимом индуцируемом цитохромом С апоптозе. В каспаза-независимом апоптозе важна протеазная активность Omi/HtrA2, аналогичная активности каспаз, которая, однако, не может быть подавлена ингибитором каспаз z-VAD-fmk [144].

Эндонуклеаза G – это преобладающая эндонуклеаза митохондриального межмембранного пространства, которая вовлечена в регуляцию митохондриального биогенеза, синтез и репарацию ДНК. В результате пермеабиллизации митохондриальных мембран, эндонуклеаза G попадает во внутриклеточное пространство и далее может транслоцироваться в ядро, где она вызывает деградацию ДНК [145].

Апоптоз-индуцирующий фактор (AIF) является наиболее хорошо изученным медиатором каспаза-независимой клеточной смерти [144]. После выхода из митохондрии в цитоплазму, AIF претерпевает переход из прекурсорной (67 кДа) в апоптогенную (57 кДа) форму [146] и далее транслоцируется (перемещается) в клеточное ядро, где он может вызывать конденсацию хроматина и последующую клеточную смерть. Присутствие активных форм каспаз не является необходимым для осуществления данного процесса, хотя и может его ускорить [147].

Взаимодействие лизосом с лизосомотропными агентами ведёт к пермеабиллизации их мембран (пермеабиллизация лизосомных мембран, ПЛМ) и выходу во внутриклеточное пространство цистеиновых протеаз катепсинов. Высвободившиеся катепсины инициируют клеточную смерть за счёт своей протеолитической активности, вызывая деградацию белков, как в цитоплазме, так и в клеточном ядре [148, 149]. Катепсины вызывают, помимо прочего, также и активацию каспаз, которая, однако, в сценарии ПЛМ не является необходимой для реализации цитотоксического эффекта [142, 143, 150]. Кроме того было показано, что ПЛМ может вести к каспаза-независимой клеточной смерти опосредованно, за счёт взаимодействия катепсинов с митохондриями, ведущего к их пермеабиллизации [151-153], например, за счёт деградации катепсинами антиапоптотического белка Bid [154].

Значительные повреждения эндоплазматического ретикулума также могут приводить к инициации программируемой клеточной смерти в ответ на нарушение

белкового фолдинга (так называемый “unfolded protein response”, UPR) или выхода кальция в цитоплазму [155]. Такие события ведут к активации каспазы-12, которая располагается на цитозольной стороне эндоплазматического ретикулума [156]. Активация каспазы-12 ведёт к дальнейшей активации эффекторных каспаз [157]. Кроме того, стресс эндоплазматического ретикулума может приводить к пермеабилзации митохондриальных мембран и таким образом индуцировать классический апоптоз, а также другие митохондриально-зависимые пути клеточной смерти [158].

Выход в цитоплазму кальция во время стресса эндоплазматического ретикулума приводит к активации нейтральных цитозольных протеаз калпаинов, что также может приводить к клеточной смерти [159]. Активность калпаинов в клетке контролируется их естественным ингибитором кальпастатином, который, однако, может быть инактивирован в присутствии активных форм каспаз или самих калпаинов [159]. Было показано, что активированные калпаины могут приводить к программируемой клеточной смерти и за счёт пермеабилзации лизосомных мембран [143].

2.11. Аутофагия

Макроаутофагия (далее называемая «аутофагией») является базовым клеточным процессом массивной и неселективной деградации повреждённых или долгоживущих белков, органелл и/или цитоплазмы с участием лизосом [160-162]. По сравнению с апоптозом, аутофагия является намного менее изученным биологическим процессом. Однако в последние годы аутофагия привлекла много внимания мирового научного сообщества, особенно в конце 2016 года после вручения Нобелевской премии по физиологии и медицине японскому профессору Ёсинори Осуми “за открытие механизмов аутофагии”.

Аутофагия является базовым биологическим процессом, выявленным в практически всех клетках млекопитающих. В 1980-х годах было показано, что цитотоксическая противоопухолевая химиотерапия, а также радиотерапия провоцируют аутофагию в опухолевых клетках. Это открытие привело к появлению популярной гипотезы о том, что опухолевые клетки используют аутофагию как защитный механизм – механизм устойчивости к стрессовым условиям, в том числе и к химиотерапии [163, 164]. Однако более поздние исследования привели к изменению данной точки зрения и формированию современных представлений о том, что аутофагия может быть фактором, подавляющим рост опухолей на ранних стадиях карциногенеза, в то время как на более поздних стадиях – наоборот – она выступает в качестве промотора развития и роста

опухоли [165]. Одновременно с этим начались исследования противоопухолевого эффекта ингибиторов аутофагии. Было показано, что комбинирование данных ингибиторов с химиотерапевтическими препаратами часто приводит к синергическому увеличению эффективности последних, что улучшает прогноз лечения заболевания [166, 167]. Так, первым ингибитором, успешно применённым в клинической практике при лечении онкологических заболеваний был гидроксихлорохин – разрешенное к применению в клинической практике производное известного противомаларийного препарата хлорохина. К середине 2018 года согласно сайту <https://clinicaltrials.gov> уже проведено либо ещё продолжаются более чем 50 клинических испытаний этого препарата в качестве компонента противоопухолевой терапии.

В то же время необходимо отметить, что в зависимости от типа клеток и стимула (препарата) эффекты аутофагии на опухолевые клетки могут быть разнонаправленными [168]. Были описаны такие типы аутофагии, как цитопротекторная, цитотоксическая, цитостатическая и даже фитофагия, не оказывающая никакого эффекта на жизнеспособность и выживаемость клеток [168-170]. Более того, наряду с противоопухолевым эффектом ингибитора аутофагии хлорохина, известен также противоопухолевый эффект ингибиторов тирозинкиназ или ингибиторов mTOR [161], реализуемый посредством индукции цитотоксической аутофагии, или так называемой клеточной смерти II типа (примечание: апоптоз является клеточной смертью I типа) [94, 168, 171].

Аутофагия запускается в ответ на стрессовые стимулы, например, голодание, радиацию, химиотерапию и т.д. [168], и включает в себя образование обладающих двойной мембраной везикул (аутофагосом) с поглощением ими содержимого цитоплазмы, последующим слиянием аутофагосом и лизосом, приводящим к образованию аутолизосом, деградации их содержимого лизосомальными протеазами с дальнейшей утилизацией продуктов деградации [161]. Процесс аутофагии состоит из нескольких стадий (Рис. 3):

Стадия 1, инициация: как уже отмечалось, аутофагия инициируется определённым стимулом, например, стрессовым стимулом (голодание, облучение радиацией, химиотерапия и т.д.)

Стадия 2, формирование аутофагосом: формирование и рост в цитозоле двумембранных структур, называемых «фагофорами». Фагофор специфически или неспецифически захватывает (поглощает) содержимое цитоплазмы, включая клеточные органеллы, формируя, таким образом, структуры, называемые аутофагосомами.

Стадия 3, стыковка и слияние аутофагосом с лизосомами: внешняя мембрана аутофагосом стыкуется, а затем сливается с лизосомами, формируя таким образом структуры, называемые аутолизосомами.

Стадия 4, деградация содержимого и распад аутолизосом: изолированный в аутолизосомах клеточный материал подвергается деградации с участием лизосомальных протеаз и перерабатывается с целью последующего синтеза АТФ и других макромолекул, в частности, белков[167].

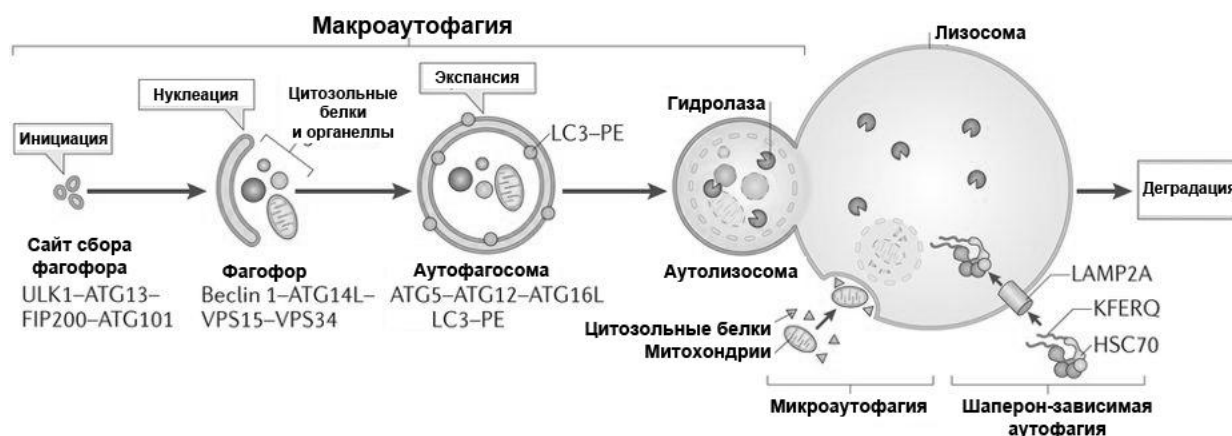


Рисунок 3. Процесс аутофагии. Рисунок был адаптирован из опубликованной ранее работы Каура и соавторов [172]

Известно, что белок LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) вовлечён в процесс индукции аутофагии и играет в нём одну из важнейших ролей [173, 174]. В процессе аутофагии растворимая цитозольная форма LC3-I связывается с фосфатидилэтаноламином и таким образом превращается в нерастворимую изоформу LC3-II, необходимую для формирования фагофора (мембраны аутофагосомы). Еще один белок, играющий важную роль в процессе аутофагии, а именно белок SQSTM1/p62, является молекулой-доставщиком белков в аутофагосомы через селективное связывание с белками-мишенями, подлежащими деградации [175]. Таким образом, белки LC3-II (изоформа В, то есть белок LC3B-II) и SQSTM1/p62 являются ключевыми молекулами, принимающими участие в процессе аутофагии: они часто используются как маркеры для мониторинга данного процесса [175].

2.12. Исследование эффекта комбинирования препаратов

Одновременное применение нескольких препаратов часто используется в клинической практике, особенно при лечении таких заболеваний как рак и ВИЧ.

Основной целью совместного применения является достижение синергического действия препаратов, что делает возможным усиление их эффектов (синергизм), снижение эффективной дозы, уменьшение побочных эффектов, а также торможение развития лекарственной устойчивости [176]. В то же время, понятие синергизма не так тривиально и не так просто для понимания, как может показаться на первый взгляд. Основная сложность заключается в том, что синергизм как таковой не является статистическим явлением, когда эффект комбинирования препаратов является статистически достоверно более выраженным, чем эффект индивидуальных лекарств. Например, если в определённых дозах противоопухолевых препарат А убивает 50% клеток, а препарат Б – 60% клеток, а комбинация тех же доз А + Б убивает 61% клеток ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента), то это не является синергизмом. Другое смежное понятие – аддитивный эффект – нельзя определять как простую «арифметическую сумму» эффектов препаратов. Например, в рассмотренном выше случае, аддитивный эффект не может быть $50\% + 60\% = 110\%$ [176]. Более того, синергизм (так же как аддитивный эффект и антагонизм) являются физико-химическими явлениями, и, согласно закону действующих масс, не зависят линейно от арифметической суммы эффектов индивидуальных препаратов [177].

Долгое время не существовало общепринятого определения явления синергизма [177], что создавало определённые проблемы как в вопросах исследования комбинированного действия препаратов, так и применения их в клинической практике [176]. Проблема была решена в 1984 году когда Тинг-Чау Чоу и профессор Пауль Талалай ввели понятие индекса комбинирования (combinational index, CI) для описания и определения понятий синергизма, антагонизма или аддитивного эффекта [178], а также разработали уравнения для расчёта CI [177, 178]. Позднее были написаны компьютерные программы для расчёта CI, такие как, например, CompuSyn v1.0 (ComboSyn, Inc., США). Согласно теории Чоу-Талалай, синергизм определяется как состояние системы, для которого $CI < 1$; антагонизм – как состояние, для которого $CI > 1$; а аддитивный эффект – состояние для которого $CI = 1$ [176-178]. После этого были введены новые определения, соответствующие определённым значениям CI, например: очень сильный антагонизм ($CI > 10$), сильный антагонизм ($CI = 3.3 - 10$), антагонизм ($CI = 1.45 - 3.3$), умеренный антагонизм ($CI = 1.2 - 1.45$), слабый антагонизм ($CI = 1.1 - 1.2$), аддитивный эффект ($CI = 0.9 - 1.1$), слабый синергизм ($CI = 0.85 - 0.9$), умеренный синергизм ($CI = 0.7 - 0.85$), синергизм ($CI = 0.3 - 0.7$), сильный синергизм ($CI = 0.1 - 0.3$), очень сильный синергизм ($CI < 0.1$) [177].

Для различных комбинаций одних и тех же препаратов CI может также быть различным. Индекс CI зависит не только от соотношения индивидуальных препаратов в

их комбинации, но также и от абсолютной концентрации препаратов (при одном и том же молярном соотношении препаратов в их комбинации), и поэтому является зависимостью от эффекта (например, цитотоксического эффекта) исследуемой комбинации (так называемой «fraction affected» – Fa) [177].

Практически применение метода Чоу-Талалая заключается в определении эффекта (например, цитотоксической активности) различных концентраций индивидуальных препаратов и их комбинаций (в постоянном или различном молярном соотношении). Далее данные заносятся в программу (например, CompuSyn v.1.0), с помощью которой рассчитывается индекс комбинирования (CI).

Таким образом, метод Чоу-Талалая позволяет различить синергический, антагонистический, или аддитивный эффекты веществ при их совместном действии. В настоящей работе было показано, что некоторые морские природные соединения способны активировать киназы, такие как JNK1/2. Для подтверждения цитотоксической роли активации JNK1/2 под действием вещества был использован SP600125 – ингибитор активности JNK1/2. Если активация JNK1/2 под действием вещества на клетки являлась проапоптотическим сигналом, то обработка клеток ингибитором SP600125 должна была бы приводить к уменьшению цитотоксической активности исследуемого морского природного соединения. Однако проблема заключалась в том, что SP600125 сам по себе является умеренно цитотоксическим в своих действующих концентрациях (т.е. способен ингибировать активность фосфорилированной формы JNK1/2). Таким образом, простая комбинация этих двух соединений (SP600125 и исследуемого вещества) в любом случае приводила к более сильному цитотоксическому эффекту комбинации по сравнению с индивидуальными веществами. В таких случаях, для того чтобы выяснить, какой эффект (синергический, аддитивный или антагонистический) оказывает SP600125 на цитотоксическую активность исследуемого морского природного соединения, был использован описанный выше метод Чоу-Талалая.

2.13. Протеомика и методы, применяемые в ней

Понятие протеома было введено Вилкенсом и определено как набор соответствующих белков, экспрессируемых геномом клетки или ткани в данный момент времени [179]. Протеом, в отличие от генома, является высокодинамичным и варибельным. Протеом зависит от текущего физиологического и патологического состояния клетки или организма [180].

Помимо изменения общего количества того или иного белка под действием каких-либо факторов, протеомика позволяет также выявлять посттрансляционные модификации белков. Такими модификациями могут быть деаминирование, убиквитинирование, фосфорилирование, ацетилирование, гликозилирование и т.д. [181]. Классическими методами, применяемыми в протеомных исследованиях, являются двумерный электрофорез в полиакриламидном геле в комбинации с масс-спектрометрией. Двумерный электрофорез позволяет разделить белки, а последующая визуализация белковых пятен и анализ фотографии геля позволяет выявить изменения уровня экспрессии определённых белков (белковых пятен). Масс-спектрометрия в совокупности с анализом полученных данных с использованием специализированных баз данных используется для идентификации белков, уровень экспрессии которых изменился под действием стимула.

Протеомика включает в себя систематический анализ протеома посредством оценки общих изменений в уровне экспрессии клеточных белков. В отличие от классических биохимических исследований, нацеленных, как правило, на детальное изучение одного или нескольких генов или белков, протеомные работы используют более общий систематический и сравнительный подход к пониманию биологических процессов. Таким образом, протеомика, помимо всего прочего, предоставляет новые возможности для идентификации и предсказания молекулярных мишеней будущих или уже существующих лекарств, идентификации молекул, сигнальных путей и механизмов, связанных с конкретными биологическими явлениями и патологиями [180].

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. *In vitro* скрининг низкомолекулярных соединений, выделенных из морских беспозвоночных, на цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток

3.1.1. Определение цитотоксической активности

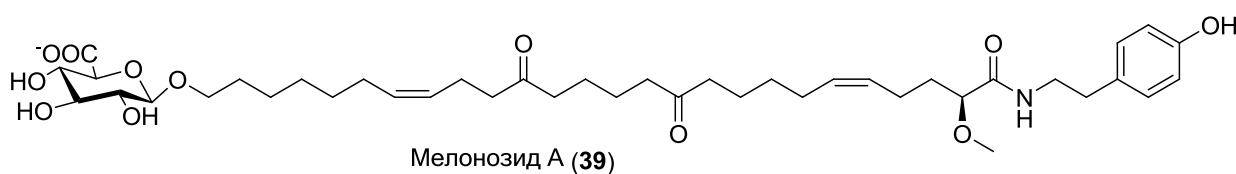
На протяжении многих лет природные соединения используют в качестве активных субстанций при разработке лекарственных препаратов, в особенности антибиотиков, противовоспалительных и противоопухолевых препаратов [182, 183]. Внимание учёных, осуществляющих поиск активных субстанций и разработку на их основе новых противоопухолевых лекарств, направлено в первую очередь на соединения, способные убивать опухолевые клетки *in vitro* и тормозить рост опухолей *in vivo*. Согласно общепринятым представлениям, а также рекомендациям Национального института рака (National Cancer Institute, NCI, Роквиль, США), скрининг соединений на их способность убивать опухолевые клетки *in vitro* является первой стадией исследований на пути к созданию новых противоопухолевых препаратов. При этом главной задачей является идентификация соединений, способных подавлять жизнеспособность и пролиферацию опухолевых клеток человека [184]. На первом этапе выполнения настоящей работы нами был выполнен скрининг 42 новых и ранее известных индивидуальных соединений, выделенных из экстрактов морских беспозвоночных (преимущественно губок и асцидий) в Тихоокеанском институте биоорганической химии им Г.Б. Елякова ДВО РАН (ТИБОХ ДВО РАН). Экстракты, содержащие эти вещества, изучались на борту научно-исследовательского судна «Академик Опарин» сразу после сбора соответствующих образцов морских организмов во время ряда морских экспедиций; в некоторых из них принимал участие и сам соискатель. Экстракты животных, которые обладали цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток, далее были использованы для выделения индивидуальных веществ и установления их химического строения. Эту сложную и трудоёмкую работу выполняли сотрудники Лаборатории химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН, в некоторых случаях с участием соискателя. Далее, в процессе скрининга, была определена цитотоксическая активность полученных соединений с установленной химической структурой на опухолевых клетках человека. В результате скрининга, выполненного соискателем, были выявлены наиболее активные соединения, отобранные для их дальнейшего изучения.

Так, была исследована цитотоксическая активность нового морского алкалоида монанхоцидина А (Мс-А, структура **11**), выделенного из морской губки *Monanchora*

pulchra [19], экстракт которой показал цитотоксическую активность [185]. Было показано, что выделенное соединение проявляет умеренную цитотоксическую активность по отношению к лейкозным клеткам ТНР-1 ($IC_{50} = 5.1$ мкМ), клеткам рака шейки матки HeLa ($IC_{50} = 11.8$ мкМ), и нормальным мышинным клеткам JB6 P⁺ Cl41 ($IC_{50} = 12.3$ мкМ) после 24 ч обработки [19]. В то же время было установлено, что увеличение времени экспозиции до 72 ч ведёт к очень существенному усилению цитотоксического эффекта этого алкалоида по отношению к этим опухолевым клеткам, и соответственно к снижению IC_{50} до субмикромольных значений [186].

Кроме того, было установлено, что выделенные из этой же губки алкалоиды монанхомикалин С (Mm-C, структура **18**) и птиломикалин А (Pt-A, структура **19**) цитотоксичны по отношению к клеткам рака молочной железы MDA-MB-231 в концентрациях $IC_{50} = 8.2$ мкМ и 4.3 мкМ соответственно (48 ч обработки), в то время как известный противоопухолевый агент цисплатин на данной модели был почти на порядок менее активен и имел $IC_{50} = 23$ мкМ [24].

Выполненное нами исследование цитотоксической активности нового морского беспрецедентного по химическому строению ω -гликозилированного жирнокислотного амида (гликолипида) меланозид А (**39**), выделенного из морской губки *Melonanchora kobjakovae*, напротив, выявило отсутствие у данного соединения цитотоксической активности по отношению к опухолевым клеткам NCCIT-R после 48 ч обработки [187]. С другой стороны было показано, что это соединение способно индуцировать процесс аутофагии в этих опухолевых клетках [187].



Нами была также изучена цитотоксическая активность морского тритерпенового гликозида фрндозида А (FrA, структура **30**) [188]. Было показано, что соединение является высокотоксичным по отношению к опухолевым клеткам линий HeLa и HL-60 после 24 ч обработки ($IC_{50} = 1.53$ мкМ и 0.45 мкМ соответственно). В то же время фрндозид А был менее токсичным по отношению к неопухолевым мышинным эпителиальным клеткам JB6 P⁺ Cl41 ($IC_{50} = 4.16$ мкМ) [188].

Исследование цитотоксической активности полусинтетического соединения ризохалинина (агликона первого биполярного сфинголипидоподобного природного соединения ризохалина, Rhiz, структура **32**) на клетках рака простаты выявило его высокую активность. Так, ризохалинин имел IC_{50} в пределах 0.46 мкМ~1.37 мкМ (48 ч обработки) по отношению к клеткам рака простаты (линии PC-3, DU145, 22Rv1, VCaP и LNCaP), включая лекарственно-устойчивые линии [189].

Была исследована цитотоксическая активность восьми тритерпеноидов, выделенных из морской губки *Penares* sp., собранной в Южно-Китайском море. Все эти соединения проявили цитотоксическую активность по отношению к клеткам промиелоцитарной лейкемии человека HL-60 в умеренных дозах, при этом наиболее активным было соединение **45** (Табл. 1). Действие же этих веществ на клетки линий HeLa и JB6 P⁺ Cl41 было существенно более слабым (Табл. 1) [190].

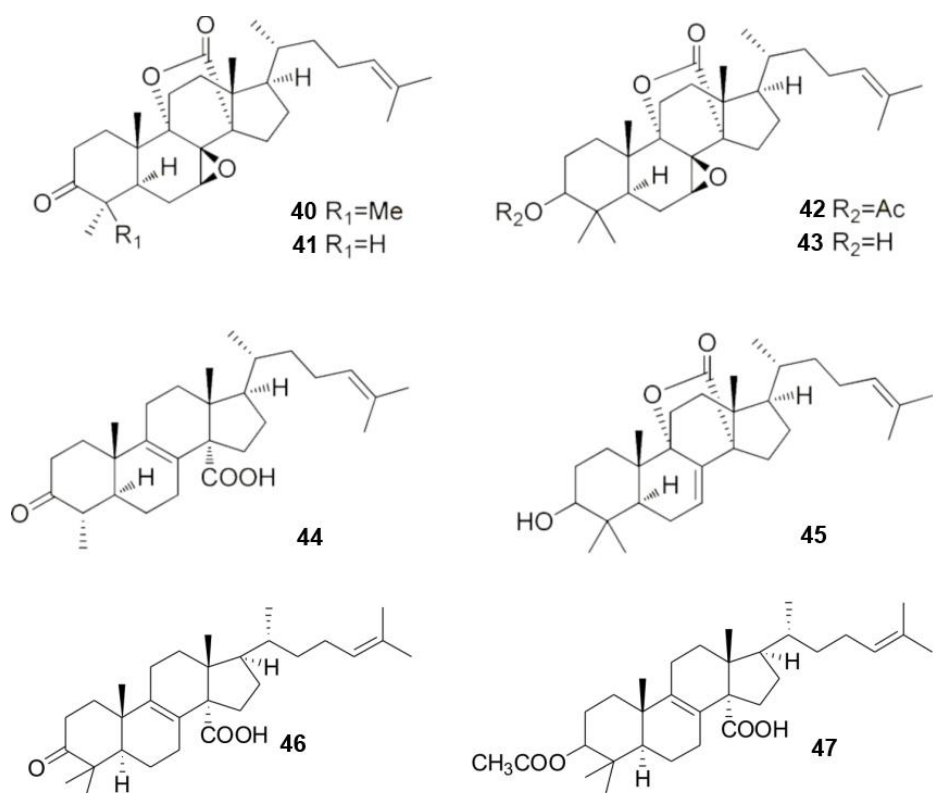
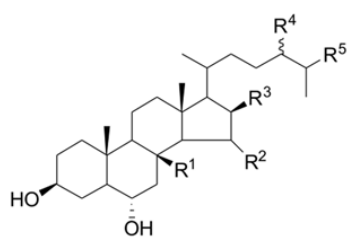


Таблица 1. Исследование цитотоксической активности соединений **40-47** на опухолевых и нормальных клетках. Время обработки клеток веществом составляло 48 ч

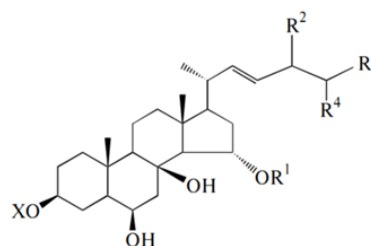
Вещество	IC ₅₀ [мкМ], 48 ч		
	HL-60	HeLa	JB6 Cl41
40	19.5	>100	>100
41	17.4	72	93.1
42	16.4	49.8	84.7
43	18.5	>100	>100
44	18.6	>100	>100
45	9.7	>100	>100
46	19.5	55.9	98.5
47	24	94.2	>100
Цисплатин	0.25	4.1	18.2

Очень высокую цитотоксическую активность проявил микаламид А (МусА, структура **4**), выделенный нами из водно-этанольного экстракта дальневосточной асидии *Polysincraton* sp. Для этого соединения значение IC₅₀ по отношению к опухолевым клеткам HeLa составило 5.5 нМ (24 ч обработки) [191].

Была изучена цитотоксическая активность одиннадцати новых полярных стероидов (**48**)–(**58**), выделенных из морских звёзд *Solaster endeca* и *Evasterias* sp. При этом соединение (**48**) проявило слабую цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам HeLa с IC₅₀ = 53 мкМ после 24 ч обработки, другие же изученные соединения либо проявляли ещё более слабую активность (соединение (**50**) и (**52**) с IC₅₀ = 163.2 мкМ и 173.4 мкМ соответственно), либо были неактивны (все остальные соединения, IC₅₀ > 200 мкМ) [192].



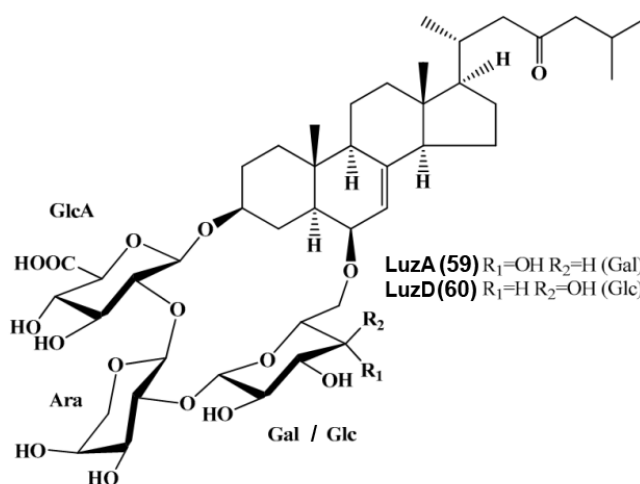
48 - 52



53 - 58

Вещество	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
(48)	OH	βOH	βOH	H	CH ₂ OH
(49)	OH	βOH	H	β-глюкопиранозил	CH ₃
(50)	OH	βOH	H	β-ксилопиранозил	CH ₃
(51)	OH	βOH	H	β-глюкопиранозил 6'-сульфат	CH ₃
(52)	OH	βOH	H	β-ксилопиранозил 4'-O-сульфат	CH ₃
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X
(53)	H	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	β-ксилопиранозил
(54)	H	β-ксилопиранозил	CH ₃	CH ₃	SO ₃ Na
(55)	H	CH ₃	OSO ₃ Na	H	β-ксилопиранозил
(56)	H	β-ксилопиранозил	CH ₃	CH ₃	β-ксилопиранозил, Δ ⁴ 22,23-дигидро
(57)	SO ₃ Na	β-ксилопиранозил	CH ₃	CH ₃	H
(58)	H	β-ксилопиранозил	CH ₃	CH ₃	SO ₃ Na 22,23-дигидро

Противоопухолевую *in vitro* активность необычных стероидных гликозидов с циклическим строением углеводной цепи лузоникизидов А (LuzA, **59**) и D (LuzD, **60**), выделенных из морской звезды *Echinaster luzonicus*, изучали на клетках меланомы человека [193].



Оба соединения показали умеренную цитотоксическую активность (в концентрациях 40 мкМ и более после 48 ч обработки исследуемыми веществами) по отношению к опухолевым клеткам SK-Mel-28. Активность была связана с арестом клеточного цикла в фазе G2/M, индукцией апоптоза и регулированием уровня экспрессии

таких участвующих в регуляции апоптоза белков, как расщепленная каспаза-3, сурвивин, p21, Bcl-2 и циклин D [193]. Полученные данные представлены на рисунке 4.

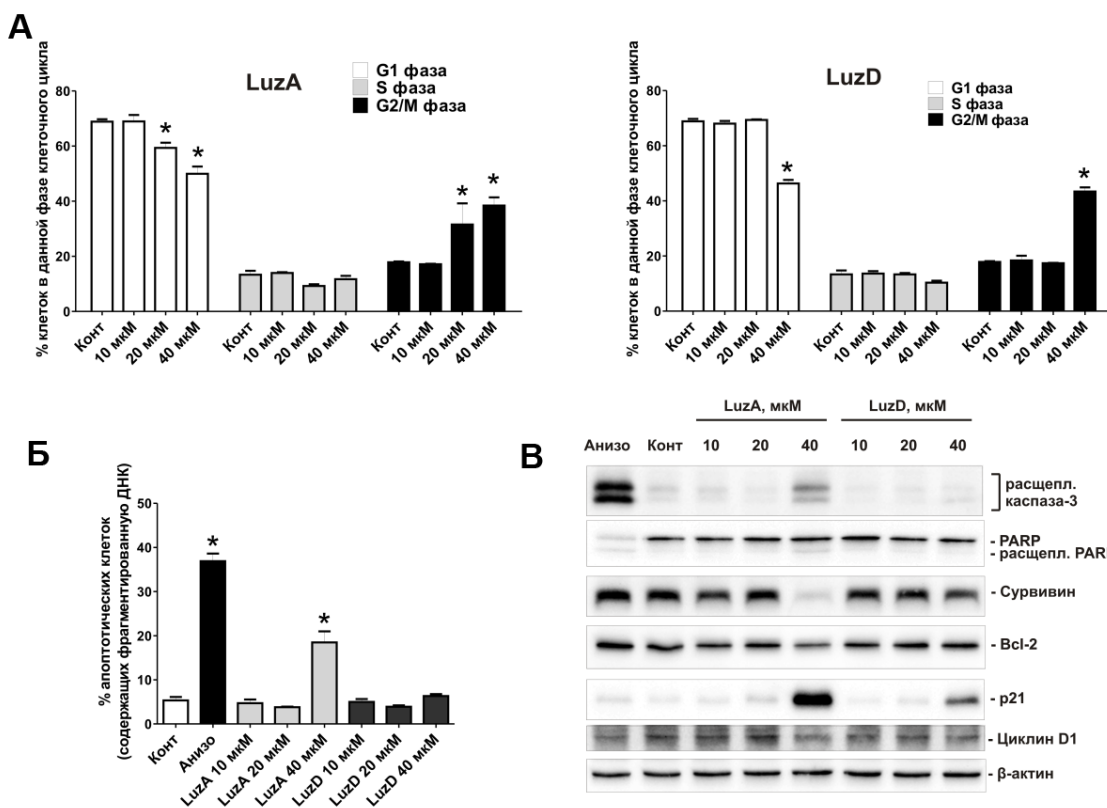
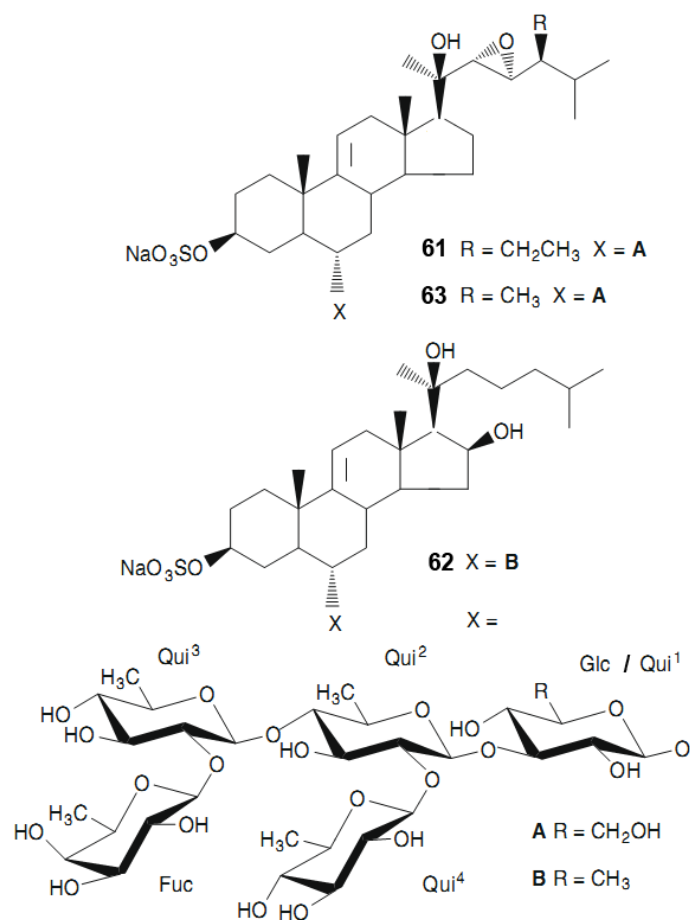
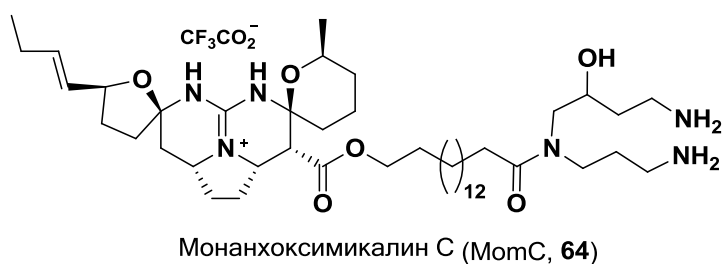


Рисунок 4. Эффект лузоникизидов А (LuzA) и D (LuzD) на клетки SK-Mel-28 после 48 ч обработки. **(А)** Эффект на прогрессию клеточного цикла. **(Б)** Эффект на индукцию апоптоза. Клетки, содержащие фрагментированную ДНК, определяли с помощью FACS как суб-G1 пик. **(В)** Эффект на экспрессию некоторых про- и антиапоптотических белков в клетках SK-Mel-28. Анизо – клетки, обработанные 2 мкМ анизомицина в течение 48 ч и используемые как положительный контроль. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента).

Было показано, что сапонины, выделенные из собранной во Вьетнамских водах морской звезды *Archaster typicus* – астеросапонины архастерозиды А (61) и В (62), а также регуларозид А (63) [194], проявляют умеренную цитотоксическую активность к опухолевым клеткам HeLa ($IC_{50} = 24, 14$ и 110 мкМ соответственно) и нормальным эпителиальным клеткам JB6 P⁺ Cl41 ($IC_{50} = 37, 18$ и > 50 мкМ соответственно) после 24 ч обработки [194]. Для астеросапонины В нами была показана его способность ингибировать такие факторы транскрипции, как AP-1 и NFkB, а также транскрипционную активность p53 в цитотоксических концентрациях [194].



Изучение активности нового алкалоида монанхоксимикалина С (MomC, **64**), недавно выделенного из губки *Monanchora pulchra*, на опухолевых клетках HeLa выявило его довольно высокую цитотоксическую активность (IC₅₀ = 3.5 мкМ, 48 ч обработки) [195].



В обработанных монанхоксимикалином С клетках была обнаружена фрагментация ДНК, а также расщеплённые формы каспаз и PARP, что говорило об апоптотическом характере клеточной смерти (Рис. 5А, Б). Кроме того, была обнаружена способность этого соединения индуцировать арест клеточного цикла в S-фазе (Рис. 5В). Более того, нами был показан синергический эффект монанхоксимикалина С при его

комбинации с цисплатином (Рис. 5Г) и способность ингибировать колониюобразование опухолевых клеток в нецитотоксических концентрациях (Рис. 5Д) [195].

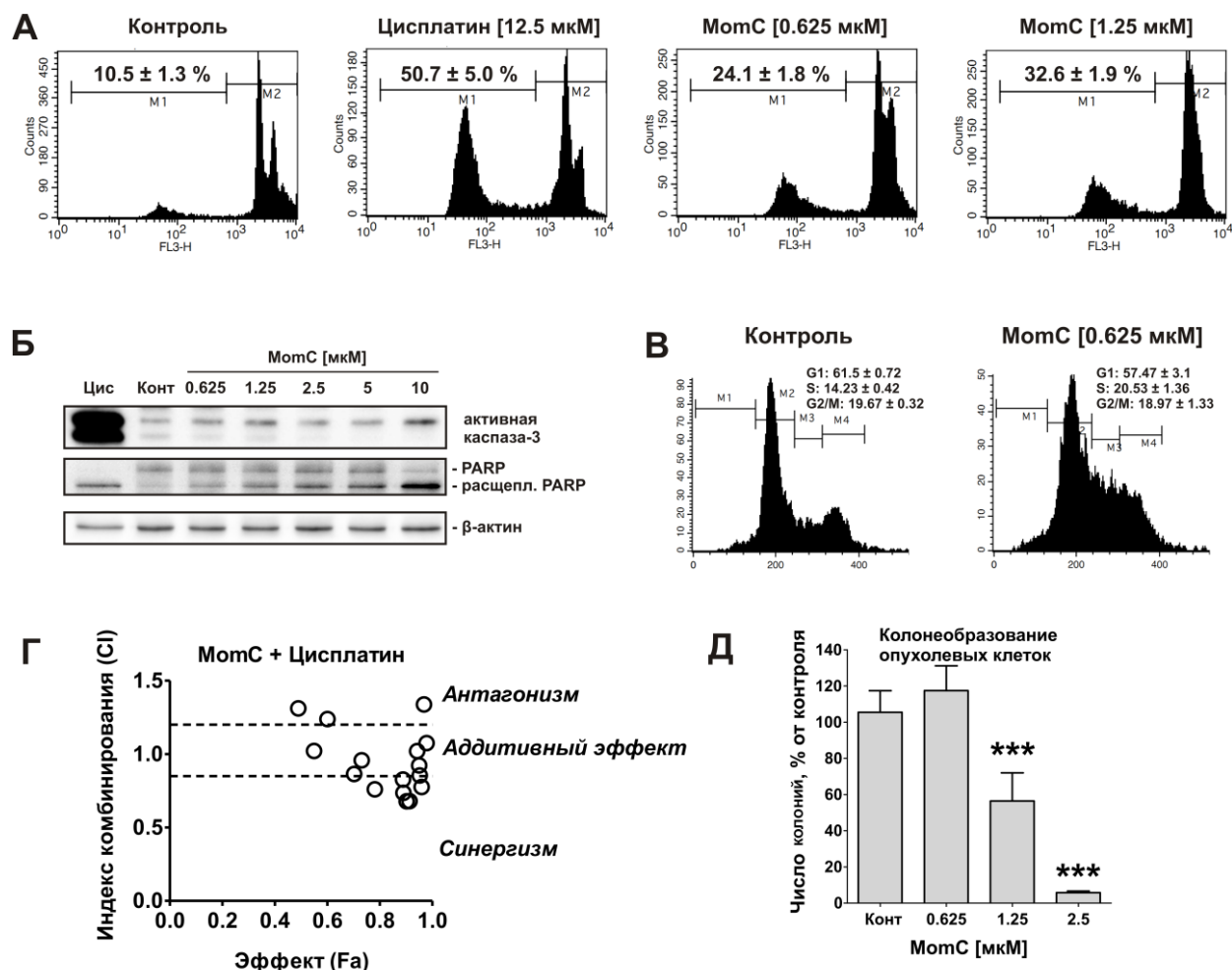
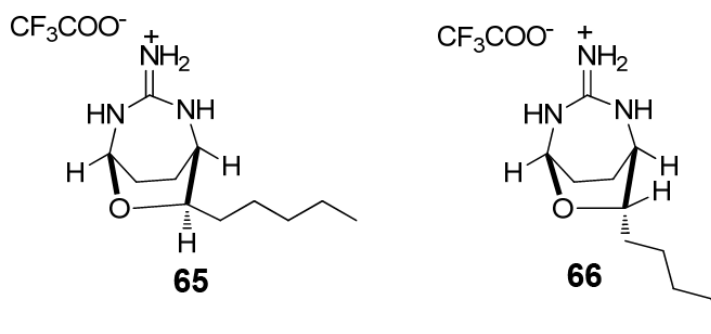


Рисунок 5. Эффект монанхоксимикалина С (MomC, **64**) на опухолевые клетки HeLa. (**А**, **В**) Эффект на индукцию апоптоза. Клетки, содержащие фрагментированную ДНК, были детектированы с помощью FACS как суб-G1 пик. (**А**) Активация каспазы-3 и расщепление PARP в обработанных веществом клетках HeLa. (**Б**) Клетки, обработанные 12.5 мкМ цисплатина (Цис) были использованы как положительный контроль. (**В**) Эффект на прогрессию клеточного цикла. (**Г**) Исследование эффекта комбинации MomC и Цис на клетки HeLa. (**Д**) Ингибирование колониюобразования опухолевых клеток HeLa, обработанных MomC в течение 48 ч. *** – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.001$, t-тест Стьюдента).

Было изучено цитотоксическое действие новых алкалоидов – 6-эпи-монанхорина (**65**) и монанхорина (**66**) – выделенных из полихеты *Chaetopterus variopedatus*.



В результате установлено, что эти соединения не проявляют цитотоксическую активность в концентрациях до 100 мкМ. В то же время оба алкалоида в концентрациях 100 мкМ были способны существенно ингибировать миграцию герминальных опухолевых клеток NCCIT-R (Рис. 6А), устойчивых к действию цисплатина, что было объяснено их способностью индуцировать арест клеточного цикла в S-фазе (Рис. 6Б). Кроме того, для данных соединений была обнаружена слабая способность ингибировать колониобразование опухолевых клеток NCCIR-R (Рис. 6В) [196].

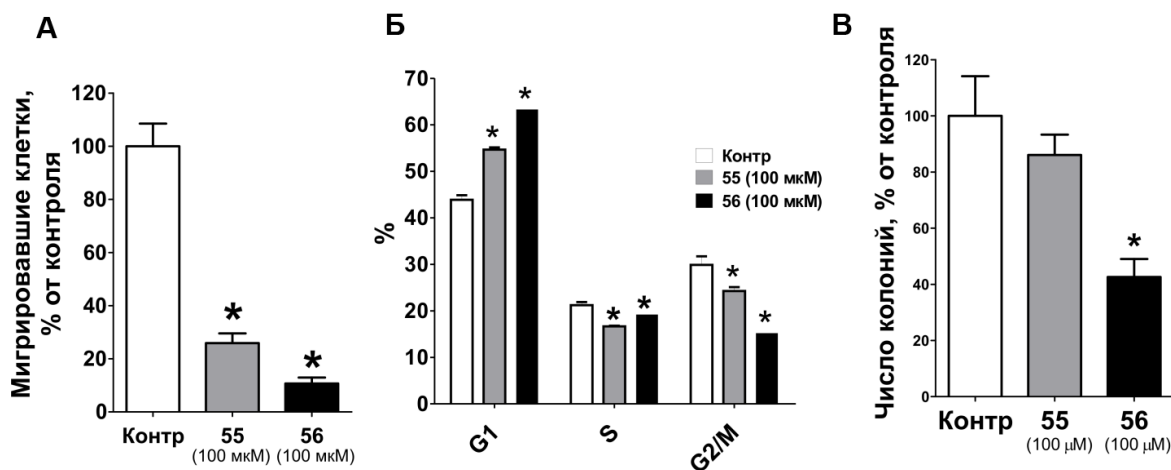
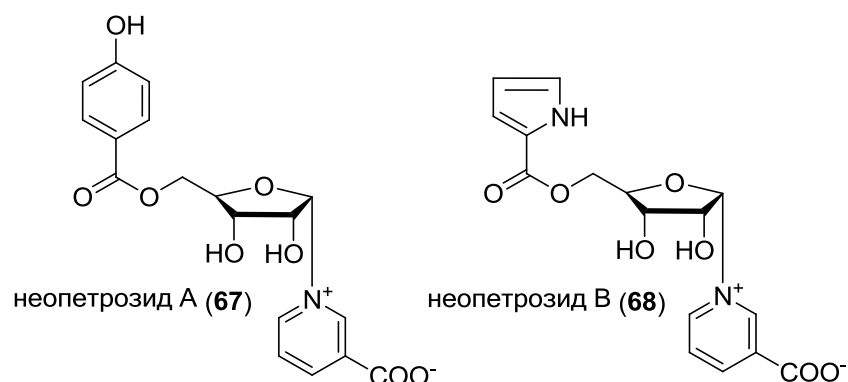
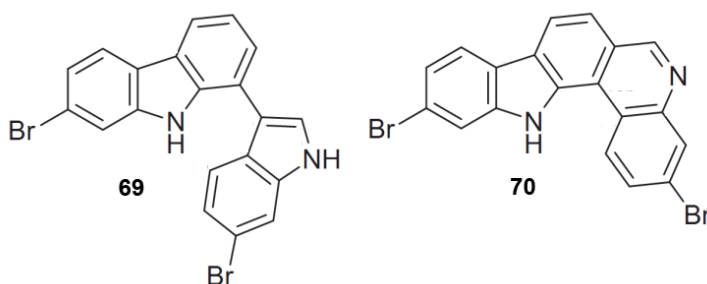


Рисунок 6. Эффект 6-этил-монанхорина и монанхоринана на опухолевые клетки NCCIT-R после 48 ч обработки. (А) Антимиграторный эффект соединений. (Б) Эффект на прогрессию клеточного цикла. (В) Ингибирование колониобразования. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента).

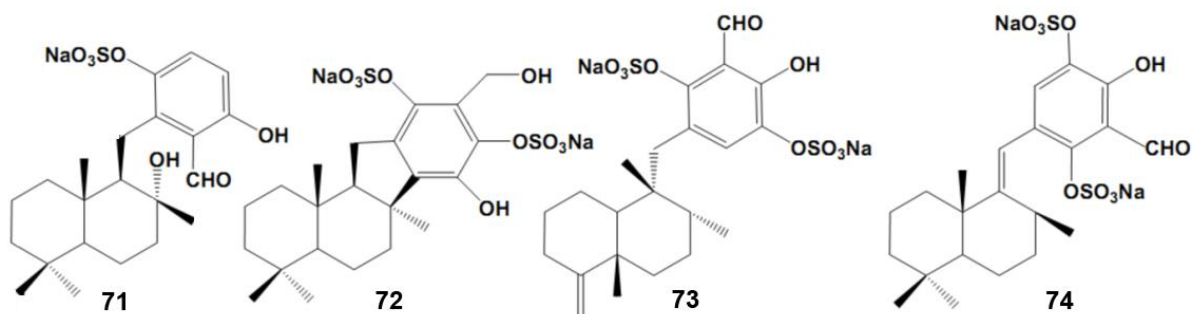
Цитотоксические свойства новых пиридиновых нуклеозидов неопетрозидов А (67) и В (68), выделенных из морской губки *Neopetrosia* sp., были изучены по отношению к опухолевым клеткам NCCIT и NCCIT-R, а также по отношению к нормальным неопухолевым клеткам MRC-9 [197]. Однако такой активности для них найдено не было.



Цитотоксическая активность двух бромсодержащих соединений, выделенных из морской губки *Penares* sp., была исследована на человеческих опухолевых клетках HL-60 и HeLa [198]. В выполненных экспериментах соединение (69) не проявило цитотоксичности, в то время как соединение (70) показало умеренную активность с $IC_{50} = 16.1$ мкМ и 33.2 мкМ соответственно (48 ч обработки) [198].



Наконец, исследование цитотоксических свойств четырёх новых сульфатированных меротерпеноидов (71–74), выделенных из морской губки *Aka coralliphaga*, было проведено с использованием клеток моноцитарной лейкемии человека [199]. Однако ни одно из четырёх соединений не показало цитотоксической активности по отношению к клеткам THP-1 в концентрациях до 100 мкМ после 24 ч обработки [199].



3.1.2. Выбор соединений для дальнейшего исследования противоопухолевой активности

Выбор соединений для дальнейших более детальных исследований противоопухолевой активности и молекулярных механизмов их действия *in vitro* и *in vivo* проводили на основании двух критериев: 1) высокой биологической активности (цитотоксической активности *in vitro*) и 2) доступности соответствующих веществ, в том числе наличия к моменту завершения скрининга количеств веществ, достаточных для проведения последующих экспериментов. С учетом этих обстоятельств для дальнейших работ нами были выбраны микаламид А (4), монанхоцидин А (11), фрондозид А (30) и ризохалинин (агликон ризохалина, 32). Кроме того, для выявления зависимостей активности от строения в изучаемых группах соединений были позже получены и исследованы другие гуанидиновые алкалоиды из губки *Monanchora pulchra*, а также ряд синтетических производных ризохалина. В качестве основных биологических моделей для дальнейших работ были выбраны клетки уrogenитальных опухолей человека, в том числе рака простаты человека, рака мочевого пузыря, герминальные опухолевые клетки, а также клетки рака шейки матки. Кроме того, для изучения некоторых аспектов механизма противоопухолевого действия исследуемых соединений *in vitro* использовались также и некоторые другие модели.

3.2. Исследование микаламида А из асцидии *Polysincraton* sp.

3.2.1. Выделение и установление структуры микаламида А из морской асцидии *Polysincraton* sp.

Исследование водно-этанольного экстракта асцидии *Polysincraton* sp. показало, что данный экстракт обладает сильной цитотоксической активностью по отношению к HeLa клеткам ($IC_{50} < 62.5$ мкг/мл). Хроматографическое разделение экстракта с проверкой биоактивности получаемых фракций на каждой стадии разделения позволило выделить ранее известный микаламид А (4), структура которого была установлена путём сравнения спектральных данных ЯМР ^1H и ^{13}C , а также физических констант с ранее опубликованными данными [6, 7].

Примечательно, что в ходе выполнения настоящего исследования впервые удалось выделить микаламид А (4) из представителя подтипа *Tunicata* (оболочники, семейство *Didemnidae*) [191]. Данный факт свидетельствует в пользу гипотезы о том, что источником микаламида А и других родственных соединений может быть симбионтный

микроорганизм, обитающий на беспозвоночных животных, относящихся не только к различным видам, но и к различным типам [200, 201]. Примечательно, что ранее была описана способность микаламида А ингибировать оседание личинок другой асцидии *Podoclavella moluccensis* [202]. Тот факт, что микаламид А был выделен нами из асцидии *Polysincraton* sp., может свидетельствовать о видоспецифичном характере данного ингибирования.

3.2.2. Исследование противоопухолевой *in vitro* активности микаламида А и механизмов её реализации

3.2.2.1. Исследование способности микаламида А предотвращать EGF-индуцируемую злокачественную трансформацию клеток JB6 P⁺ Cl41 и колониобразование опухолевых клеток HeLa

Для того чтобы проверить, обладает ли микаламид А (4) канцеропреентивными свойствами, был использован метод, основанный на способности мышинных эпителиальных клеток JB6 P⁺ Cl41 претерпевать злокачественную трансформацию (и вследствие этого образовывать колонии) в мягком агаре под действием промоторов опухолевой трансформации, таких как EGF или ТРА [125, 127, 203-206]. Известно, что данная трансформация включает в себя активирование ядерного фактора AP-1, который также ответственен за регуляцию транскрипции генов, связанных с процессами воспаления, пролиферации и метастазирования [127, 207, 208]. Блокирование же транскрипционной активности факторов AP-1 и NF-κB приводит к ингибированию промотор-зависимой неопластической трансформации клеток JB6 P⁺ Cl41 [127-129].

Было установлено, что микаламид А способен ингибировать EGF-индуцируемую неопластическую трансформацию клеток JB6 P⁺ Cl41 в очень низких, фемтомолярных концентрациях. INCC₅₀ микаламида А составляла 0.137 ± 0.035 нМ (Рис. 7А). При этом IC₅₀ микаламида А по отношению к тем же клеткам, определённая методом с использованием окрашивания клеток трипановым синим, составляла 6.32 ± 1.31 нМ (Рис. 8). Таким образом, канцеропреентивный эффект микаламида А наблюдался в концентрациях как минимум в 50 раз меньших, чем цитотоксические [191].

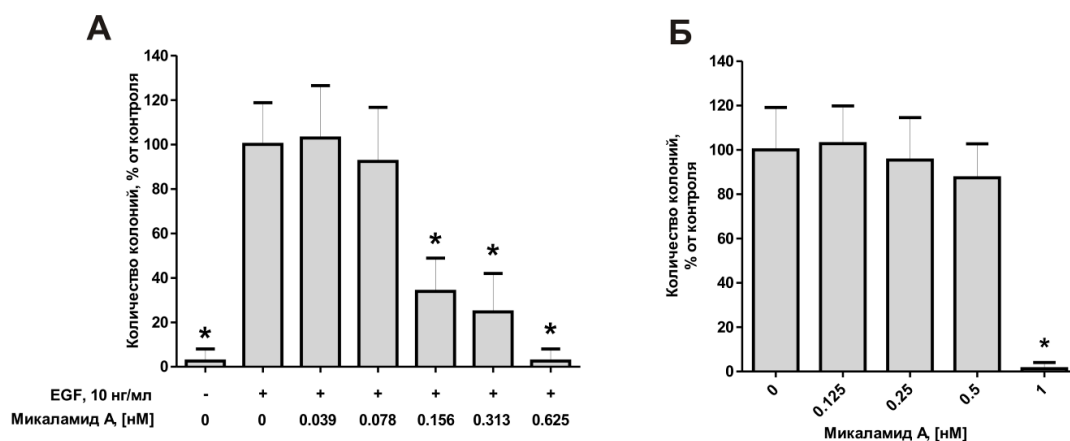


Рисунок 7. (А) Ингибирование EGF-индуцируемой неопластической трансформации клеток JB6 P⁺ Cl41 под действием микаламида А. (Б) Ингибирование колониобразования человеческих опухолевых клеток HeLa в мягком агаре под действием микаламида А. * - статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, микаламид А в нецитотоксических концентрациях ингибировал формирование и рост колоний клеток HeLa в слое мягкого агара. Так ингибирование колониобразования клеток HeLa наблюдалось при $INCC_{50} = 0.67$ нМ (Рис. 7Б), в то время как цитотоксическая активность микаламида А по отношению к клеткам HeLa проявлялась в концентрациях, по крайней мере, в 8 раз больших ($IC_{50} = 5.5 \pm 0.8$ нМ) [191].

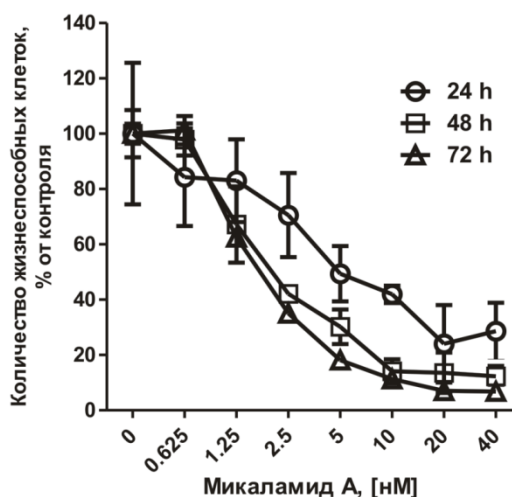


Рисунок 8. Эффект микаламида А на пролиферацию мышинных эпителиальных клеток JB6 P⁺ Cl41. Эффект был исследован методом окрашивания клеток красителем трипановым синим.

3.2.2.2. Апоптоз-индуцирующая активность микаламида А

Апоптоз-индуцирующая активность микаламида А была исследована с помощью клеток JB6 P⁺ Cl41 и метода проточной цитометрии с использованием двойного окрашивания красителями аннексином-V-FLUOS, способным связываться с фосфатидилсерином, и пропидиум йодидом, способным проникать в клетку, целостность мембраны которой нарушена, и связываться с ДНК [209]. Примечательно, что, хотя количество жизнеспособных клеток снижалось при обработке микаламидом А в концентрациях ≥ 1.25 нМ (в течение 48 ч, рис. 8), индукция апоптоза была обнаружена только при обработке клеток веществом в концентрациях ≥ 6.25 нМ (Рис. 9А-В). Таким образом, снижение числа жизнеспособных клеток JB6 P⁺ Cl41, наблюдаемое при обработке малыми концентрациями микаламида А, было обусловлено скорее ингибированием их пролиферации, нежели индукцией программируемой клеточной смерти. Индукция апоптоза в клетках JB6 P⁺ Cl41 происходила при их обработке микаламидом А в концентрациях 12.5–50 нМ (Рис. 9А, Б). Кроме того, факт индукции апоптоза микаламидом А был подтвержден с помощью Вестерн-блоттинга (Рис. 9В). Было показано, что обработка клеток JB6 P⁺ Cl41 микаламидом А в концентрации 12.5 нМ и более в течение 24 ч приводит к активированию каспазы-3 – одного из маркеров апоптоза (Рис. 9В) [191].

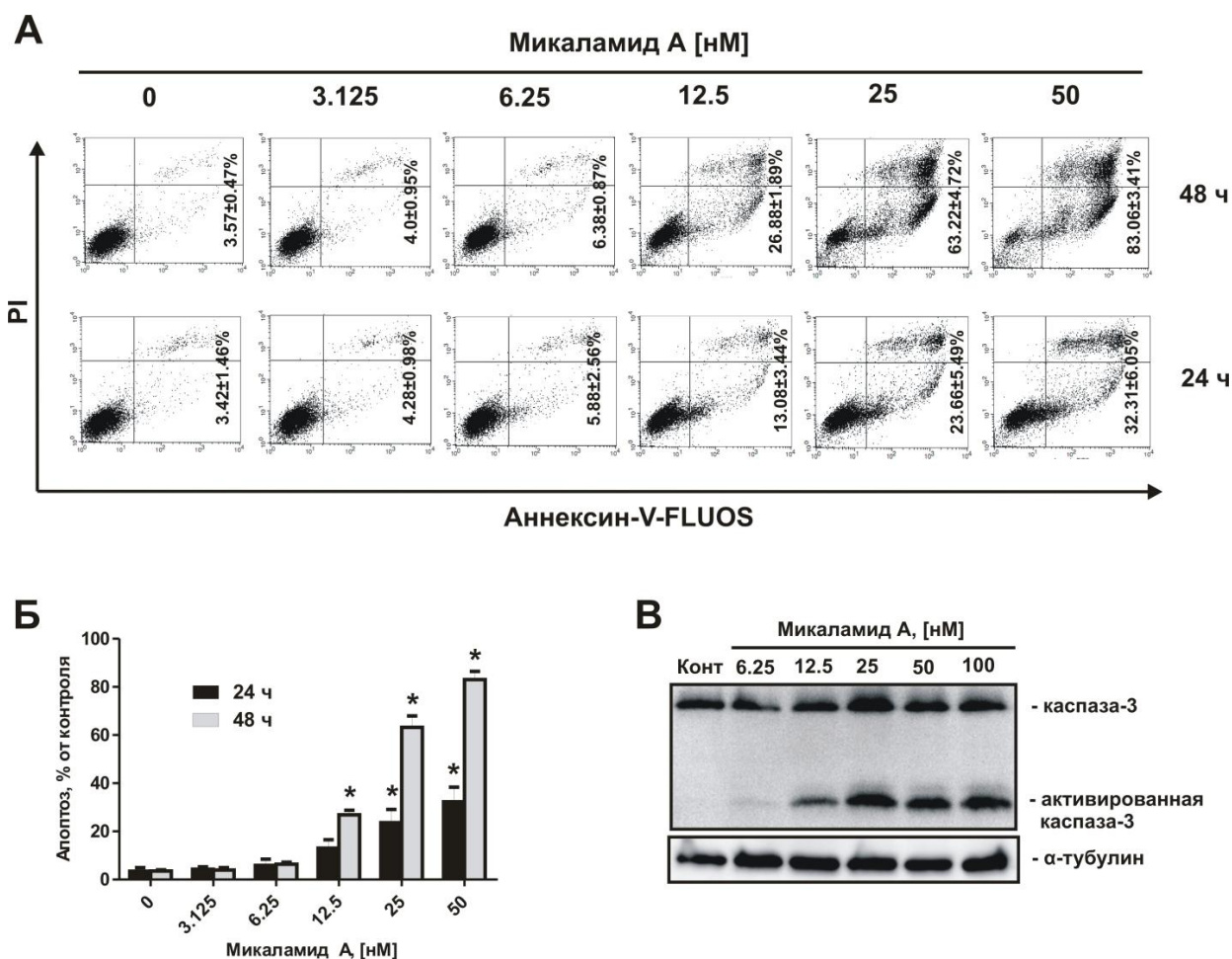


Рисунок 9. Индукция апоптоза в клетках JB6 P⁺ Cl41 под действием микаламида А. (А, Б) Определение процента апоптотических клеток с помощью FACS-анализа с использованием двойного окрашивания аннексином-V-FLUOS и пропидиум йодидом. (В) Вестерн-блоттинг анализ белковых экстрактов клеток JB6 P⁺ Cl41, обработанных микаламидом А в течение 24 ч. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.2.2.3. Эффект микаламида А на транскрипционную активность ядерных факторов AP-1, NF-κB и p53 в клетках JB6 Cl41

Ранее было показано, что ингибирование транскрипционной активности факторов AP-1 и NF-κB приводит к подавлению EGF-индуцируемой неопластической трансформации клеток JB6 P⁺ Cl41 [127, 210, 211]. В то же время известно, что белок p53, являющийся также фактором транскрипции, играет очень важную роль в процессе индукции клеточного апоптоза [212]. Поэтому нами был исследован эффект микаламида А на AP-1-, NFκB-, а также p53-зависимую транскрипционную активность в клетках JB6

Cl41 AP-1, JB6 Cl41 NF-κB и JB6 Cl41 p53 со стабильно экспрессированным люциферазным репортерным геном, контролируемым соответственно AP-1-, NF-κB- или p53-ДНК связывающими последовательностями. После 6 часов обработки клеток микаламидом А в концентрациях 1.95–1000 нМ наблюдалось ингибирование транскрипционной активности всех трёх факторов: AP-1, NF-κB и p53. В то же время в данном интервале концентраций микаламид А практически не оказывал воздействия на жизнеспособность соответствующих клеток после 6 часов обработки (Рис. 10А-В). Микаламид А ингибировал транскрипционную активность фактора AP-1 на 20–90% в интервале концентраций от 15.6 до 1000 нМ, NF-κB – на 25–80% в интервале концентраций от 7.8 до 1000 нМ и p53 – на 35–60% в интервале концентраций от 3.9 до 1000 нМ (Рис. 10А-В). Примечательно, что в отличие от многих других проапоптотических веществ, обработка клеток микаламидом А приводила к ингибированию p53-зависимой транскрипционной активности, хотя при обработке клеток веществом в тех же самых концентрациях наблюдалась индукция апоптоза (Рис. 10В). Данный факт может свидетельствовать о p53-независимом характере индуцируемого микаламидом А апоптоза [191].

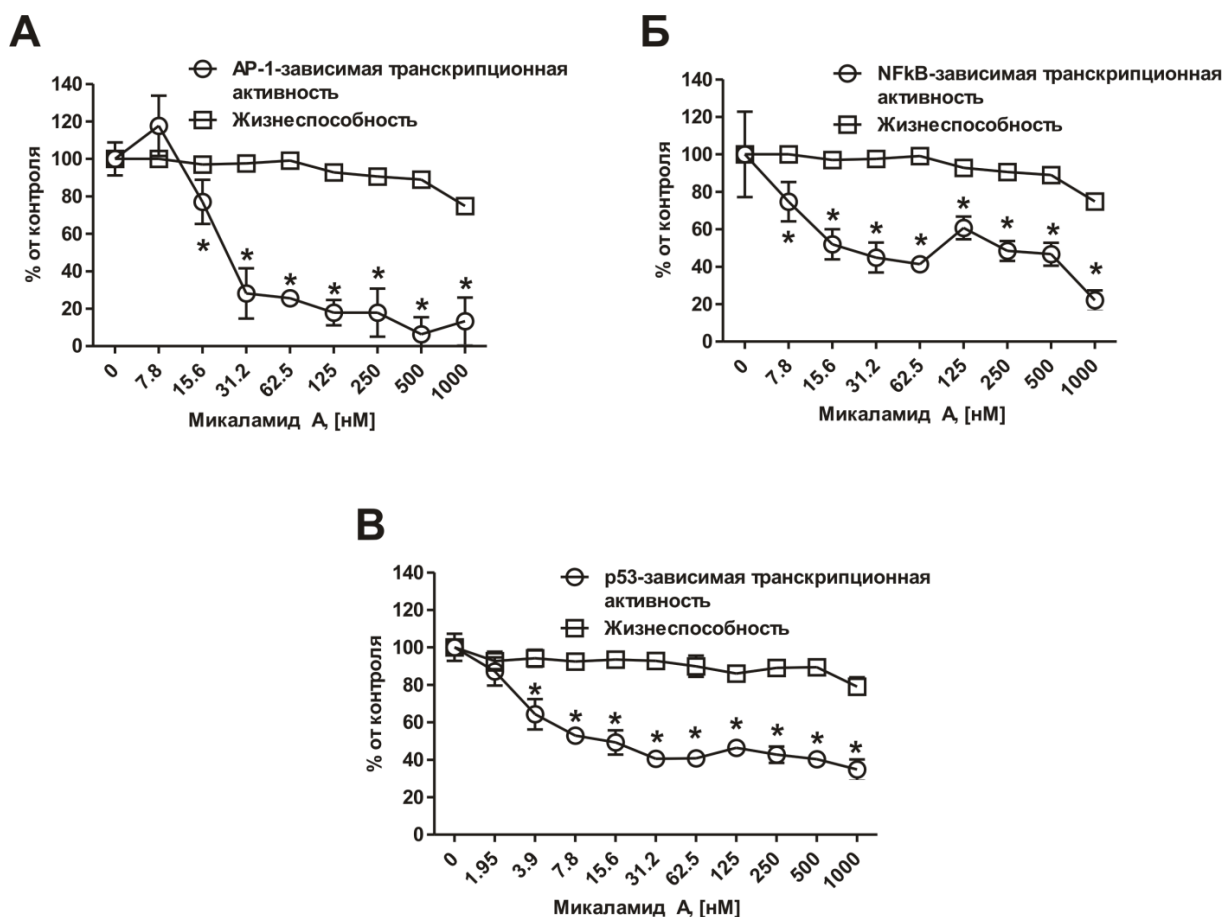


Рисунок 10. Влияние микаламида А на AP-1- (А), NFκB- (Б) и p53- (В) зависимую транскрипционную активность, а также на жизнеспособность клеток JB6 Cl41. Клетки были обработаны веществом в течение 6 ч. Используемые клетки стабильно экспрессировали люциферазный репортерный ген, транскрипция которого контролируется AP-1-, NFκB- или p53-ДНК связывающими последовательностями. * — статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Похожие эффекты наблюдались для других соединений, обладающих канцеропреентивной активностью. Например, для индол-3-карбинола и некоторых флавоноидов была показана их способность индуцировать апоптоз без изменения транскрипционной активности p53, что говорило о возможном p53-независимом характере индуцируемого апоптоза [213, 214]. В то же время следует упомянуть, что p53 способен также индуцировать апоптоз независимо от своей транскрипционной активности [215, 216]. Таким образом, чтобы установить точную роль белка p53 в индуцируемом микаламидом А апоптозе, необходимы дальнейшие эксперименты [191].

3.2.2.4. Исследование влияния микаламида А на MAPK p38, JNK1/2 и ERK1/2

Было исследовано влияние микаламида А на MAPK-зависимые сигнальные пути. Вестерн-блоттинг анализ белкового экстракта клеток JB6 P⁺ Cl41, обработанных микаламидом А в течение 1 ч, выявил дозозависимую индукцию фосфорилирования киназ p38, JNK1/2 и ERK1/2 (Рис. 11). Подобно микаламиду А, другие морские природные соединения, такие как, например, поликарпин и его синтетический аналог, а также сесквитерпеноид дактилон, способны активировать упомянутые выше киназы [217, 218]. Способность активировать киназы p38 и JNK1/2 была ранее описана для структурно схожих с микаламидом А соединений: оннамида А и теопедерина В. Было высказано предположение, что данный эффект является важным для реализации противоопухолевой активности этих соединений [14]. Активирование киназ p38 и JNK1/2 может быть вовлечено в индукцию апоптоза [219, 220] и микаламидом А, поскольку в ходе выполнения настоящего исследования данные свидетельствуют о том, что проведённых экспериментах микаламид А вызывает аналогичные эффекты. Таким образом, было показано, что сигнальные пути, в которых задействованы киназы p38, JNK1/2 и ERK1/2, могут принимать участие в клеточном ответе на воздействие микаламида А [191].

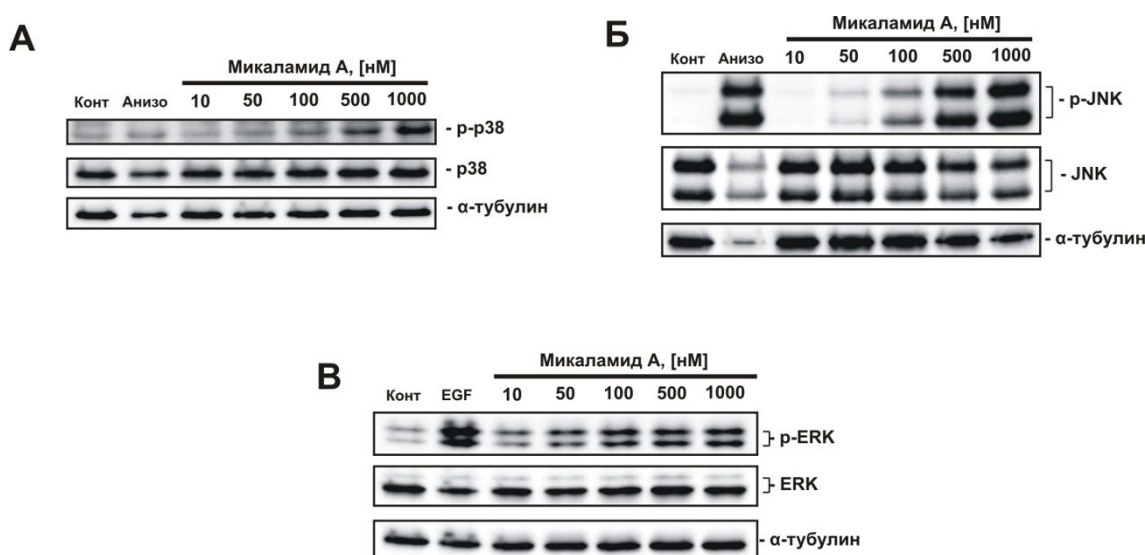


Рисунок 11. Воздействие микаламида А на фосфорилирование киназ p38 (А) JNK1/2 (Б) и ERK1/2 (В) в клетках JB6 P⁺ Cl41. Клетки были обработаны микаламидом А в течение 1 ч. Клетки, обработанные аннизомицином (Анизо, 50 мкМ в течение 1 ч), были использованы в качестве положительного контроля для эксперимента по исследованию фосфорилирования киназ p38 и JNK1/2. Клетки, обработанные EGF (10 нг/мл в течение 15 мин) – в качестве положительного контроля для эксперимента по исследованию фосфорилирования киназы ERK1/2.

3.2.2.5. Обсуждение результатов исследования биологической активности микаламида А

Микаламид А (**4**) является перспективным веществом, обладающим выраженными цитотоксическими и канцеропреентивными свойствами, и должен быть исследован далее, в том числе на моделях *in vivo*. Ингибирование микаламидом А EGF-индуцируемой неопластической трансформации клеток может быть, по крайней мере отчасти, объяснено подавлением транскрипционной активности ядерных факторов AP-1 и NFκB. В более же высоких концентрациях вещество способно индуцировать апоптоз. Более того, было показано, что сигнальные пути, ассоциированные с киназами p38, JNK1/2 и ERK1/2, вовлечены в клеточный ответ на воздействие микаламида А.

3.3. Исследование противоопухолевой *in vitro* активности гуанидиновых алкалоидов морской губки *Monanchora pulchra*

3.3.1. Исследование цитотоксической активности и механизмов действия монанхоцидина А (Мс-А) на моделях лекарственно-устойчивых герминальных опухолевых клеток

3.3.1.1. Исследование цитотоксической активности Мс-А

Цитотоксическую активность монанхоцидина А (Мс-А, **11**) исследовали с помощью МТТ-теста и окрашивания клеток с использованием трипанового синего. Примечательно, что герминальные опухолевые клетки, клетки рака простаты (включая устойчивые к гормональной терапии клетки PC-3 и DU145), а также клетки рака мочевого пузыря имели уровень чувствительности к Мс-А в интервале $IC_{50} = 0.2\text{--}0.5$ мкМ, в то время как нормальные клетки человека были менее подвержены цитотоксическому действию вещества ($IC_{50} = 0.7\text{--}0.8$ мкМ) (Рис. 12, табл. 2) [186].

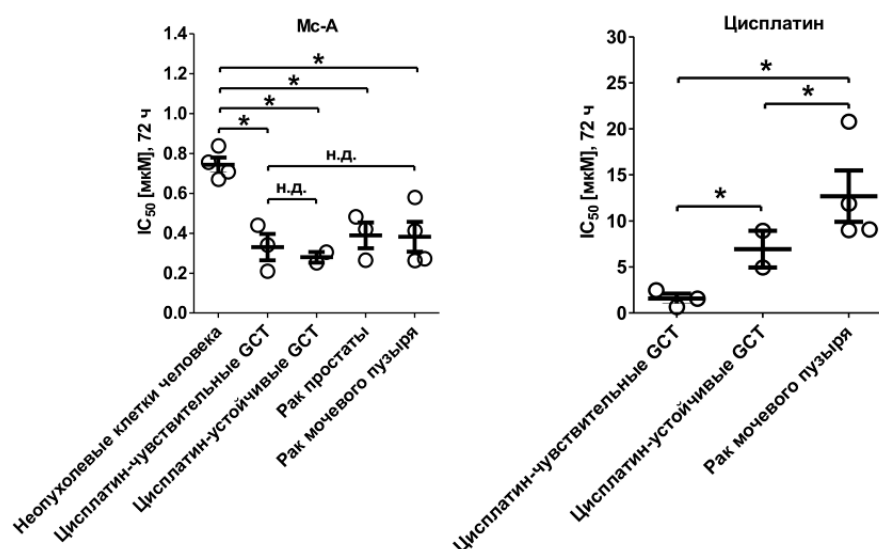


Рисунок 12. IC₅₀ Мс-А и цисплатина по отношению к нескольким линиям нормальных, а также опухолевых клеток человека. Клетки были инкубированы с веществами в течение 72 ч. Представленные значения соответствуют приведённым в таблице 2. * – статистически достоверное отличие значений друг от друга ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента). н.д. – статистически недостоверное отличие значений друг от друга ($p > 0.05$, t-тест Стьюдента)

Цитотоксическая активность Мс-А была дополнительно исследована на линиях герминальных опухолевых клеток, чувствительных и устойчивых к действию цисплатина. Клеточные линии NCCIT-R и 2102EP-R проявили пониженную чувствительность к цитотоксическому действию цисплатина по сравнению с клеточными линиями NCCIT и 2102EP, на основе которых они были получены, как описано ранее (Рис. 12, табл. 2) [86, 221]. Было установлено, что, в отличие от цисплатина, Мс-А показал схожий уровень цитотоксической активности по отношению ко всем исследованным опухолевым клеточным линиям (Рис. 12, табл. 2). Активность Мс-А была время- и дозозависимой и после 48 ч обработки значение IC₅₀ по отношению к клеткам NCCIT-R составило 0.63 мкМ (Рис. 13А-В) [186].

Таблица 2. IC₅₀ Мс-А и цисплатина по отношению к клеткам уrogenитальных опухолей человека, а также нормальным неопухолевым клеткам. Значения определены с помощью МТТ-теста после 72 ч обработки клеток веществами

Монанхоцидин А									
	Нормальные клетки				Герминальные опухолевые клетки, чувствительные к цисплатину			Герминальные опухолевые клетки, устойчивые к цисплатину	
Линия	MRC-5	MRC-9	HEK 293T	HUVEC	NCCIT	2102EP	TCam-2	NCCIT-R	2102EP-R
IC ₅₀ , мкМ	0.756	0.708	0.670	0.838	0.210	0.341	0.440	0.253	0.306

Монанхоцидин А							
	Клетки рака простаты			Клетки рака мочевого пузыря			
Линия	PC3	DU145	LNCaP	RT112	RT4	486p	T24
IC ₅₀ , мкМ	0.420	0.482	0.265	0.263	0.58	0.273	0.413

Цисплатин									
	Герминальные опухолевые клетки, чувствительные к цисплатину			Герминальные опухолевые клетки, устойчивые к цисплатину		Клетки рака мочевого пузыря			
Линия	NCCIT	2102EP	TCam-2	NCCIT-R	2102EP-R	RT112	RT4	486p	T24
IC ₅₀ , мкМ	1.56	0.644	2.48	8.93	4.93	8.99	11.87	20.79	9.07

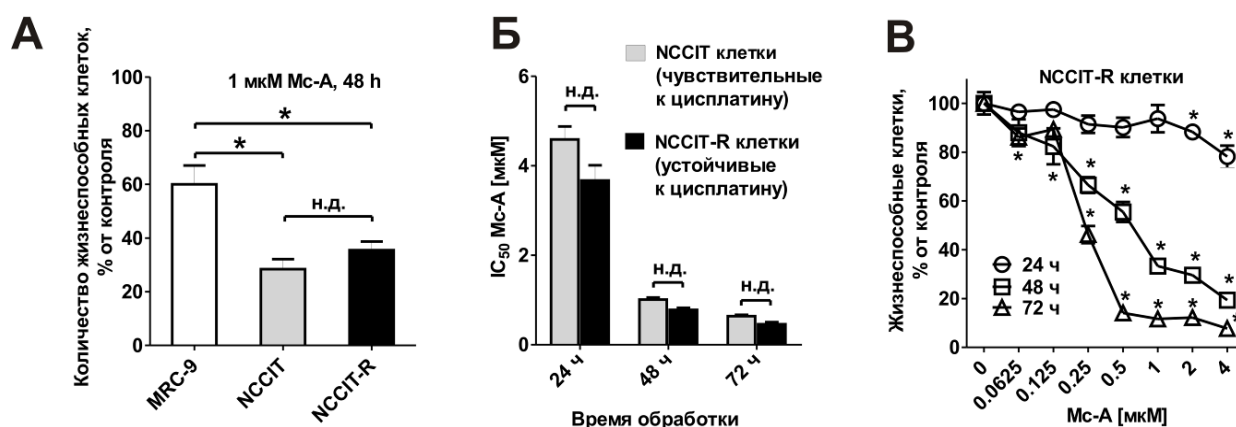


Рисунок 13. Результаты исследования время- и дозозависимой цитотоксической активности Мс-А на нормальных клетках человека (MRC-9), а также для цисплатин-устойчивых (NCCIT-R) и цисплатин-чувствительных (NCCIT) герминальных опухолевых клеток человека после 24–72 ч обработки веществом. Жизнеспособность клеток, обработанных Мс-А, была определена методом с помощью окрашивания клеток трипановым синим (**А, В**) или с помощью МТТ-теста (**Б**). * – статистически достоверное отличие значений от друг от друга или от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента). н.д. – статистически недостоверное отличие значений друг от друга ($p > 0.05$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, было установлено, что цитотоксическая активность цисплатина по отношению к цисплатин-устойчивым клеткам NCCIT-R может быть повышена при его совместном действии с Мс-А. При совместной обработке клеток комбинацией этих двух веществ наблюдается сильный синергический эффект (индекс комбинирования < 0.8 , рис. 14). Было также установлено, что андроген-зависимые клетки LpCAP (рак простаты) были более чувствительны к Мс-А, чем андроген-независимые клетки рака простаты PC-3 и DU145, устойчивые к гормональной терапии (Табл. 2). Более того, было показано, что клетки рака мочевого пузыря, были в 20–80 раз более чувствительны к Мс-А, чем к цисплатину (Табл. 2). Для дальнейшего исследования механизма противоопухолевого действия Мс-А *in vitro* была выбрана линия NCCIT-R, как модель человеческих опухолевых клеток, устойчивых к стандартной терапии [186].

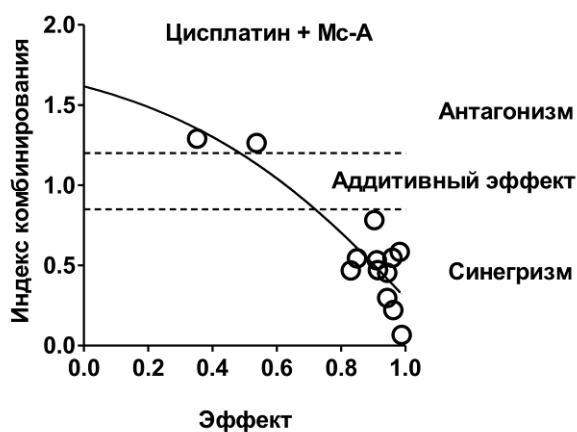


Рисунок 14. Эффект цисплатина в комбинации с Мс-А на цисплатин-устойчивые NCCIT-R клетки, исследованный с использованием МТТ-теста. Клетки были обработаны индивидуальными веществами (при их постоянном молярном соотношении цисплатин : Мс-А = 10 : 1.2). Индекс комбинирования был рассчитан с помощью программы CompuSyn v.1.0

3.3.1.2. Эффект Мс-А на прогрессию клеточного цикла и экспрессию маркеров апоптоза в опухолевых клетках

Эффект Мс-А на прогрессию клеточного цикла клеток NCCIT-R исследовали методом проточной цитометрии после 24 ч обработки клеток веществом. Было показано, что Мс-А ингибирует прогрессию клеточного цикла в S- или G1-фазе при обработке клеток соответственно его нецитотоксическими или цитотоксическими концентрациями (Рис. 15) [186].

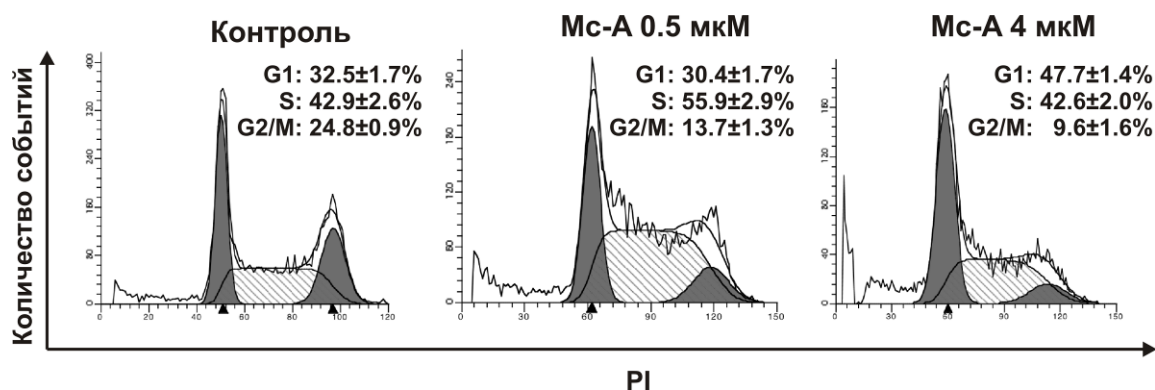


Рисунок 15. Результаты анализа прогрессии клеточного цикла клеток NCCIT-R, обработанных Мс-А в течение 24 ч. Содержание ДНК было измерено с помощью метода проточной цитометрии посредством окрашивания клеток пропидиум йодидом. Анализ данных проводили с помощью программы Cell Quest Pro

С помощью метода Вестерн-блоттинга было показано, что Мс-А вызывает время- и дозозависимое появление таких маркеров классического апоптоза, как расщеплённые PARP и каспаза-3 (Рис. 16А, Б). Активация каспазы-3 была подтверждена методом проточной цитометрии с использованием специфических антител, меченных флуоресцентным красителем фикоэритрином (PE) (Рис. 16В, Г). Эксперимент показал увеличение под действием Мс-А количества клеток, содержащих активную форму каспазы-3 [186].

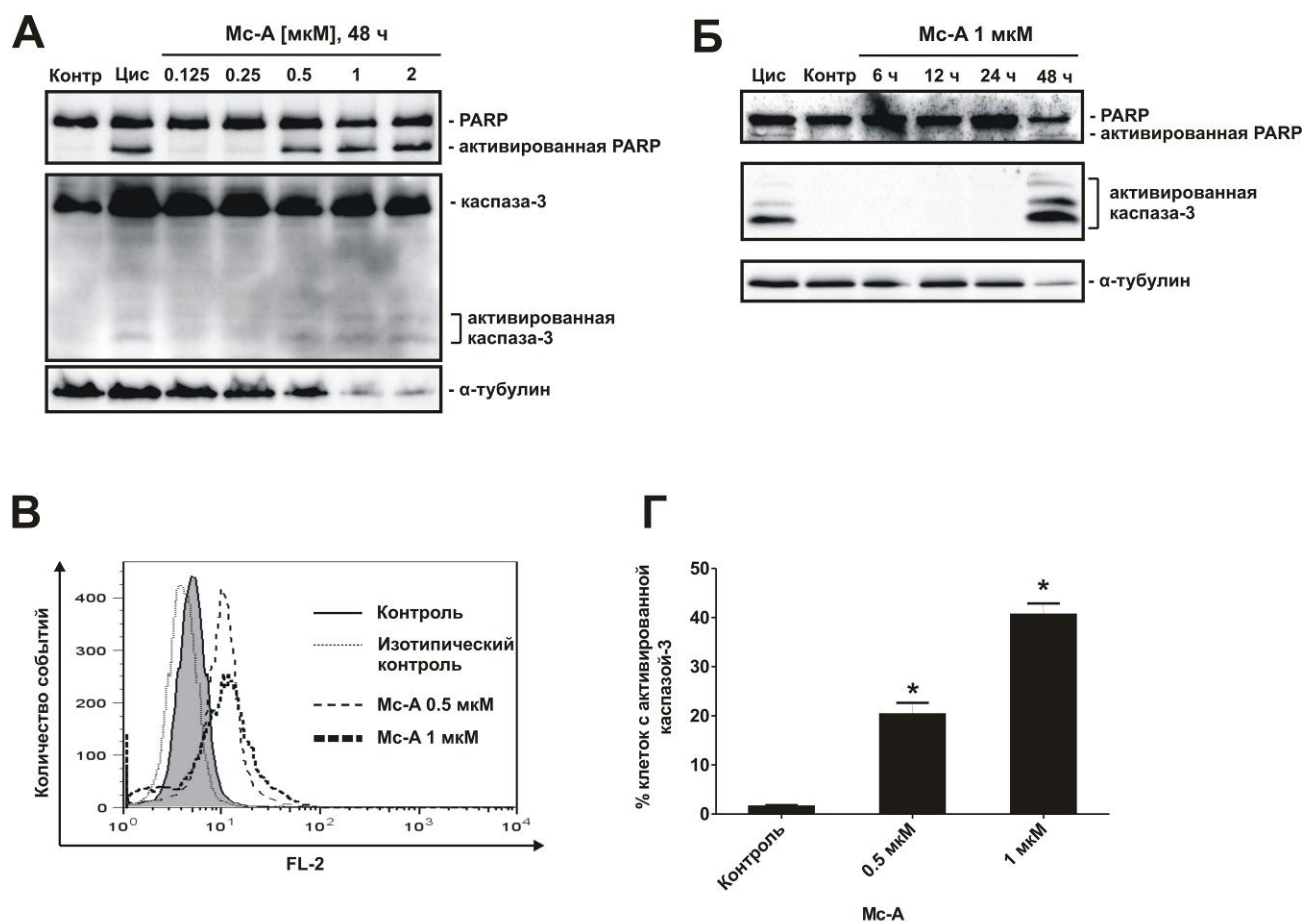


Рисунок 16. Результаты исследования методом Вестерн-блоттинга белкового экстракта клеток NCCIT-R, обработанных Мс-А, на наличие маркеров индукции апоптоза. (А, Б), Дозо- (А) и времязависимые (Б) эффекты Мс-А на каспазу-3 и PARP. (В, Г) Результаты исследования обработанных Мс-А клеток NCCIT-R методом проточной цитометрии с использованием меченых флуоресцентной меткой антител, специфических к активированной каспазе-3: (В) исходные и (Г) количественные данные. NCCIT-R клетки, обработанные 5 мкМ цисплатина в течение 48 ч, использовали в качестве положительного контроля. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента). н.д. – статистически недостоверное отличие значений от контроля ($p > 0.05$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, с помощью метода проточной цитометрии были показаны такие дополнительные признаки индукции классического апоптоза, возникающие под действием на клетки NCCIT-R монанхоцидина А, как время- и дозозависимая экстернализация фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточной мембраны, а также фрагментация ДНК (Рис. 17А, Б) [186].

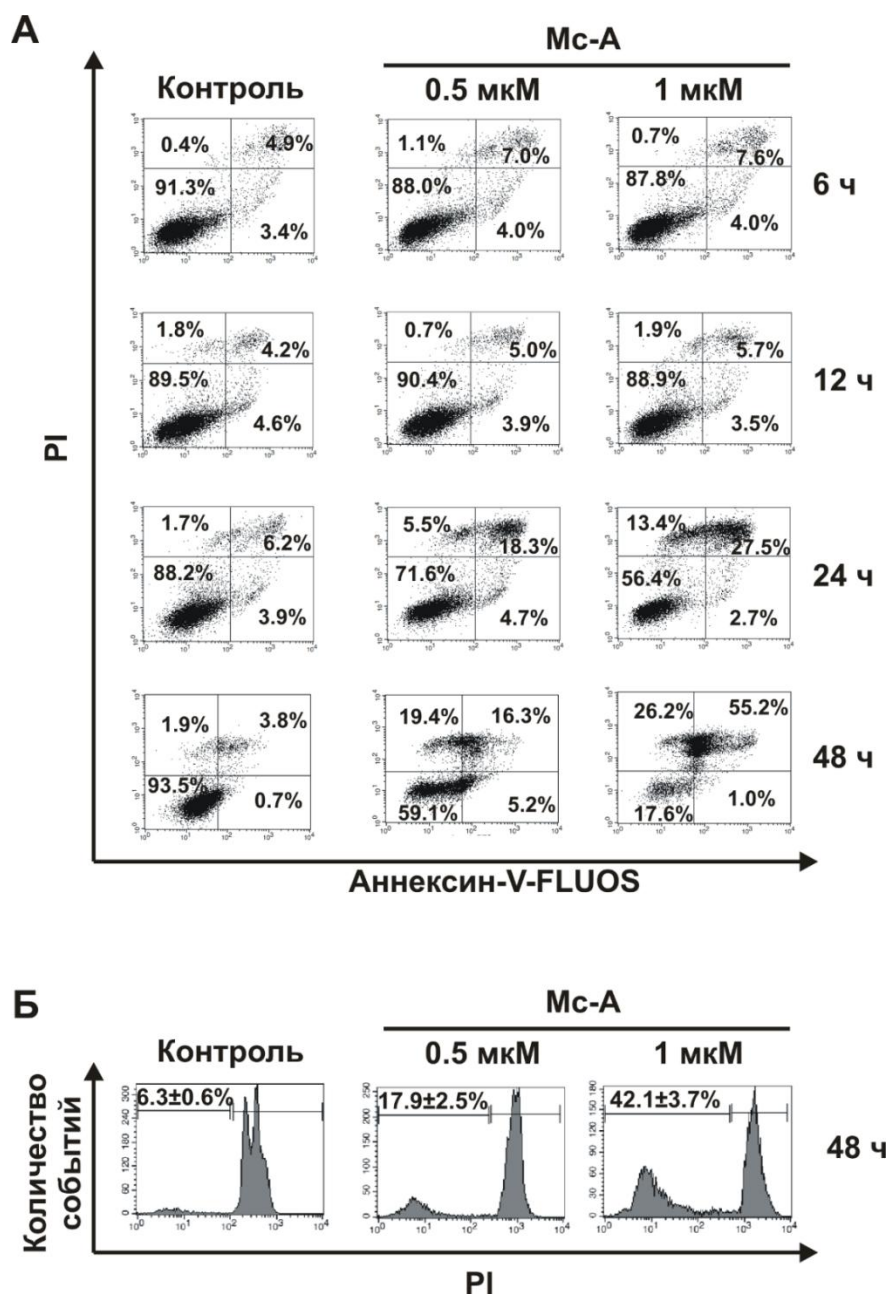


Рисунок 17. Результаты исследования методом проточной цитометрии клеток NCCIT-R, обработанных Мс-А. Для определения апоптотических клеток использовали двойное окрашивание аннексином-V-FLUOS и PI (А) или окрашивание PI (Б)

Следует отметить, что вместе с признаками классического апоптоза, в эксперименте с одновременным окрашиванием клеток аннексином-V-FLUOS и пропидиум йодидом, наблюдался значительный процент некротических клеток. Так, после инкубирования NCCIT-R клеток в течение 48 часов с 0.5–1.0 мкМ Мс-А, 19–26% клеток находились в состоянии некроза (Рис. 17А).

3.3.1.3. Индукция неспецифической белковой деградации под действием Мс-А на опухолевые клетки

Известно, что в процессе индуцируемой цисплатином клеточной гибели важную роль играет активация митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [222]. В связи с этим были проведены исследования эффекта Мс-А на три основные МАРК: р38, JNK1/2 и ERK1/2. Для получения более выраженного эффекта в экспериментах были использованы более высокие концентрации Мс-А (до 50 мкМ) и короткое время обработки (1 ч). Было показано, что обработка клеток Мс-А приводит к увеличению фосфорилирования киназ р38 и ERK1/2, но не JNK1/2 (Рис. 19) [186].

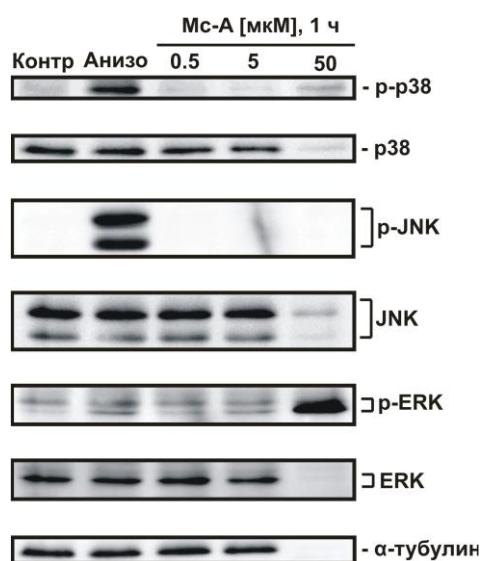


Рисунок 18. Результаты исследования методом Вестерн-блоттинга белкового экстракта клеток NCCIT-R, обработанных Мс-А в течение 1 ч, на наличие активированных МАРК. Клетки, обработанные 50 мкМ анизомицина (Анизо) в течение 1 ч, были использованы в качестве положительного контроля

Весьма неожиданно была обнаружена необычная способность Мс-А вызывать деградацию различных белков, как при обработке клеток высокими концентрациями вещества (20–50 мкМ) в течение короткого времени (1 ч), так и при обработке малыми концентрациями (0.5–2 мкМ) в течение продолжительного времени (48 ч) (Рис. 18, 19А, Б). Деградация была обнаружена не только для белков, относящихся к МАРК (Рис. 18, белки р38, JNK1/2 и ERK1/2), но и для таких долгоживущих белков, как α-тубулин и β-актин (Рис. 18, 19А, Б) [186].

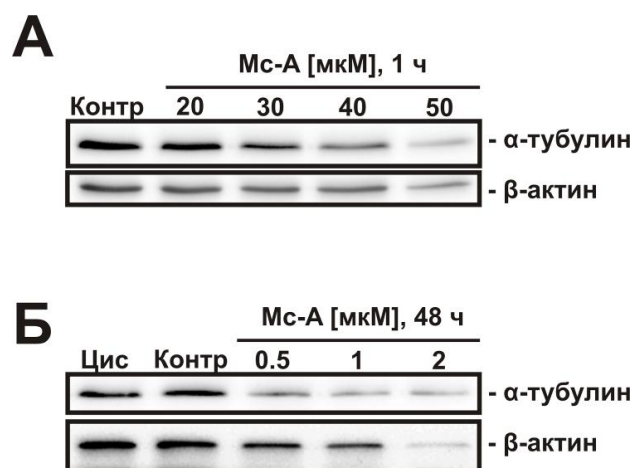


Рисунок 19. Результаты исследования методом Вестерн-блоттинга белкового экстракта клеток NCCIT-R, обработанных Мс-А в течение 1 ч (А) или 48 ч (Б), на способность Мс-А индуцировать деградацию α -тубулина и β -актина. Клетки, обработанные 10 мкМ цисплатина в течение 48 ч (Цис), использовали в качестве примера эффекта других цитотоксических агентов

Значительные изменения в составе белков клеток NCCIT-R под действием на них Мс-А были обнаружены и при разделении этих белков на полиакриламидном геле с последующим окрашиванием геля кумасси бриллиантовым синим (Рис. 20). Кроме того, в данном эксперименте при исследовании белкового экстракта клеток, обработанных Мс-А, в нижней части геля в области низких молекулярных масс было обнаружено интенсивное белковое пятно (Рис. 20).

Было предположено, что наблюдаемые изменения в составе внутриклеточных белков в клетках NCCIT-R связаны с индуцируемой Мс-А неспецифической белковой деградацией. Для того чтобы выяснить состав описанного выше пятна (предположительно белковой природы), из этой области геля были взяты два образца (образцы 1 и 2), которые затем были подвергнуты трипсинолизу и последующему анализу методом tandem mass spectrometry (Табл. 3). Образцы были отобраны в областях масс ~ 1 кДа и ~ 5 кДа из нижней и верхних частей пятна (Рис. 20) [186].

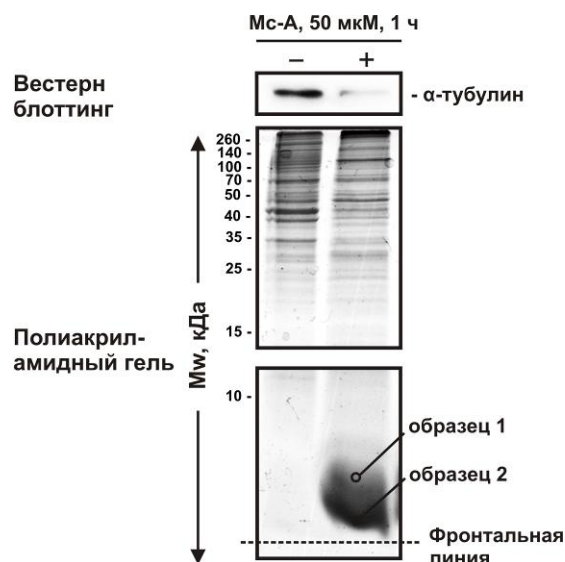


Рисунок 20. Результаты электрофоретического исследования белкового экстракта клеток NCCIT-R, обработанных 50 мкМ Мс-А в течение 1 ч. После обработки клетки были собраны, лизированы, и общий белковый экстракт был разделён с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле. Белки, находящиеся в верхней части геля (область > 15 кДа), подвергли переносу на PVDF мембрану, после чего экспрессия α -тубулина была определена с помощью специфических антител, а сам гель после переноса окрасили с помощью кумасси бриллиантового синего. Нижнюю часть геля окрасили с помощью кумасси бриллиантового синего без предварительного переноса белков

Примечательно, что несколько пептидов, идентифицированных на геле в области масс 1–5 кДа (Рис. 20), после включающей трипсинолиз пробоподготовки (см. 4.2.13.) были определены как принадлежащие исходным белкам, имеющим бóльшую молекулярную массу (11–80 кДа) (Табл. 3) [186].

Таким образом, был сделан вывод о неспецифической белковой деградации, происходящей под действием Мс-А на опухолевые клетки. Важно отметить, что наблюдаемая белковая деградация начинается до момента, когда становятся заметны признаки индукции апоптоза и, следовательно, не является результатом апоптотических процессов (Рис. 21).

Таблица 3. Идентификация белков, в структуру которых входят пептиды, найденные в образцах 1 и 2 (идентификация осуществлена с помощью LTQ-Orbitrap-MS). Номера образцов соответствуют номерам на рисунке 20

Образец	Название гена	Название белка	Номер в базе Swiss-Prot	Теор. Mw (кДа)	Теор. pI
Образец 1	PLAK_HUMAN	Кластер контактного плакоглобина	P14923	82	5.8
	PKP1_HUMAN	Изоформа 1 плакофилина-1	Q13835-2	80	9.3
	ARG1_HUMAN	Изоформа 2 аргиназы-1	P05089-2	36	6.7
	TPIS_HUMAN	Изоформа 2 триефатной изомеразы	P60174-1	27	5.7
	H0YMD0_HUMAN	Кластер аннекрина (фрагмент)	H0YMD0	25	5.7
	SPB3_HUMAN	Изоформа 2 серпина B3	P29508-2	39	6.4
	PRDX1_HUMAN	Пероксиредоксин-1	Q06830	22	8.3
	CYTA_HUMAN	Цистатин-А	P01040	11	5.4
	G3P_HUMAN	Изоформа 2 глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы	P04406-2	32	5.4
	ENOA_HUMAN	Альфа-энолаза	P06733	47	8.6
	SPB12_HUMAN	Серпин B12	Q96P63	46	7.0
	B4DV12_HUMAN	Убиквитин	B4DV12	17	5.4
	K2C72_HUMAN	Изоформа 2 кератина, тип II цитоскелетная 72	Q14CN4-2	56	6.8
Образец 2	CYTA_HUMAN	Цистатин-А	P01040	11	5.4
	TPIS_HUMAN	Изоформа 2 триозофосфатной изомеразы	P60174-1	27	5.7

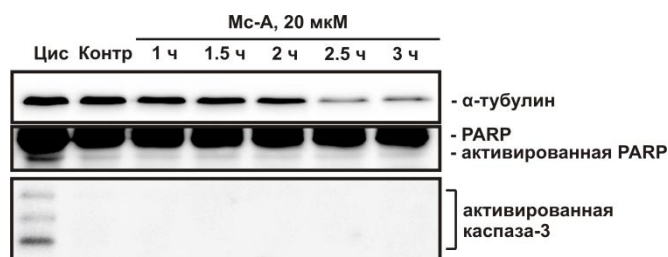


Рисунок 21. Анализ деградации α -тубулина и расщепления PARP и каспазы-3 в клетках NCCIT-R, обработанных Мс-А в течение 1–3 ч методом Вестерн-блоттинга. Клетки, обработанные 10 мкМ цисплатина в течение 48 ч (Цис) использовали в качестве положительного контроля. После 2.5 ч обработки наблюдалась деградация α -тубулина, в то время как появления маркеров апоптоза выявлено не было

3.3.1.4. Индукция цитотоксической аутофагии опухолевых клеток NCCIT-R под действием Мс-А

Неспецифическая массивная деградация клеточных белков является, безусловно, летальным событием. Известно несколько процессов, которые могли бы привести к ней [223]. Данными процессами могут являться аутофагия, активность каспаз, кальпаина, активность лизосом и различных протеаз [223]. В связи с этим была исследована роль данных процессов в реализации цитотоксического действия Мс-А на опухолевые клетки.

Клетки NCCIT-R предварительно обработали специфическими ингибиторами вышеупомянутых процессов, после чего подвергли их действию Мс-А. В этих экспериментах были использованы: ингибитор активности каспаз **z-VAD-fmk**, ингибитор ранних стадий аутофагии 3-метиладенин (**3-МА**); ингибитор активности лизосом **NH₄Cl**; ингибитор кальпаина **кальпептин**; ингибитор активности цистеиновых, сериновых и треониновых протеаз **леупептин**; а также коктейль ингибиторов протеаз «**cOmplete Mini EDTA-free**» от компании Roche. Поскольку некоторые из данных ингибиторов в индивидуальном виде были цитотоксичными, то их ингибирующий эффект на цитотоксические свойства Мс-А исследовали с помощью метода Чоу-Талалая [176, 178]. Данный метод позволяет различить синергический, аддитивный или антагонистический эффект препаратов однонаправленного действия при их совместном применении. В случае исследования таких препаратов, например, обладающих цитотоксическими/антипролиферативными свойствами, тип эффекта (синергический, аддитивный или антагонистический) невозможно определить простым сравнением эффектов индивидуальных веществ и их комбинации.

Как уже упомянуто в литературном обзоре, в методе Чоу-Талалая используется расчет индекса комбинирования (CI). Синергизм, согласно данной методике, определяется как состояние, при котором $CI < 0.85$; антагонизм – как состояние, при котором $CI > 1.2$; аддитивный эффект – как состояние, при котором $CI = 0.85 \sim 1.2$. В данном эксперименте индексы комбинирования были рассчитаны для условий, в которых цитотоксический эффект комбинации Мс-А с соответствующим ингибитором реализовывался на 50% (то есть половина опухолевых клеток, обработанных исследуемой комбинацией веществ, мертва). Комбинации Мс-А с ингибиторами были составлены в пропорциях из расчета $[2 \times IC_{50} \text{ (Мс-А)}] : [IC_{50} \text{ (ингибитора)}]$, где $[2 \times IC_{50} \text{ (Мс-А)}]$ – это концентрация Мс-А, равная удвоенной $IC_{50} \text{ (Мс-А)}$ по отношению к клеткам NCCIT-R; а $IC_{50} \text{ (ингибитора)}$ – это описанная ранее в литературе концентрация ингибитора, при которой реализуется его ингибирующий эффект на соответствующий процесс (например, ингибирующий эффект на аутофагию, активность протеаз и т.д.). В результате было установлено, что ингибитор аутофагии – 3-метиладенин (3-МА) – проявляет наиболее сильный антагонистический эффект на цитотоксическую активность Мс-А (Рис. 22). На основании этого было выдвинуто предположение о том, что индукция аутофагии играет важную роль в реализации цитотоксического эффекта исследуемого нами алкалоида [186].

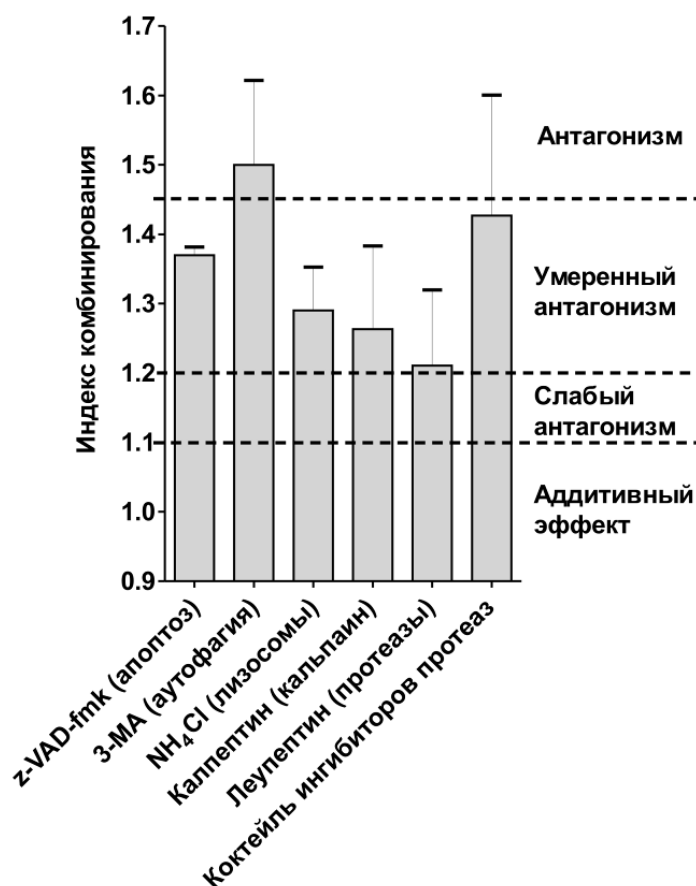


Рисунок 22. Результаты исследования эффекта специфических ингибиторов активности каспаз, протеаз, лизосом, кальпаина и ранних стадий аутофагии на жизнеспособность клеток NCCIT-R, обработанных Мс-А в течение 48 ч. Индекс комбинирования был рассчитан с помощью программы CompuSym v.1.0 при 50% реализации цитотоксического эффекта комбинации препаратов. Вещества комбинировали при их постоянном молярном соотношении (Мс-А : z-VAD-fmk = 1.2 мкМ : 100 мкМ; Мс-А : 3-МА = 1.2 мкМ : 5000 мкМ; Мс-А : NH₄Cl = 1.2 мкМ : 10000 мкМ; Мс-А : кальпептин = 1.2 мкМ : 50 мкМ; Мс-А : леупептин = 1.2 мкМ : 100 мкМ; Мс-А : коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete Mini EDTA-free) = 1.2 мкМ : 0.02 таблетки/мл)

Затем были проанализированы уровни экспрессии белков-маркеров аутофагии LC3В-I/II [173, 174]. Было обнаружено, что уровни экспрессии обеих изоформ данного белка повышаются после воздействия Мс-А – как краткосрочного (1 ч) воздействия в высоких концентрациях (20–50 мкМ), так и долгосрочного (48 ч) воздействия в малых концентрациях (0.25–2 мкМ) (Рис. 23) [186].

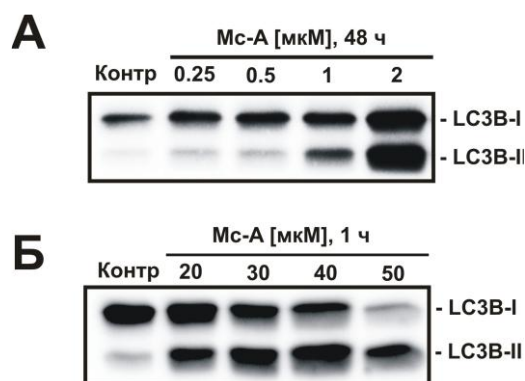


Рисунок 23. Результаты Вестерн-блоттинг анализа экспрессии белков-маркеров аутофагии LC3B-I/II в клетках NCCIT-R, обработанных Мс-А в течение 48 ч (А) или 1 ч (Б)

Кроме того, формирование аутофагосомальных вакуолей (структур, содержащих двойную мембрану) было обнаружено в обработанных Мс-А клетках NCCIT-R при исследовании их методом электронной микроскопии (Рис. 24).

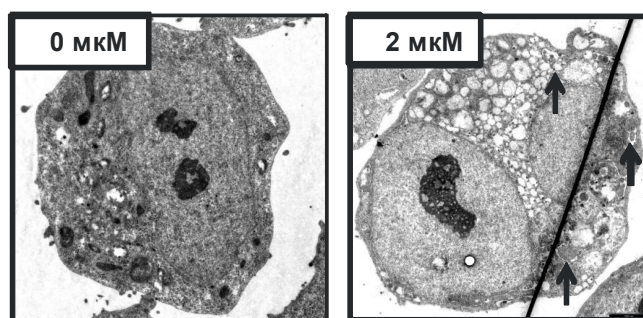


Рисунок 24. Результаты исследования клеток NCCIT-R, необработанных (0 мкМ) или обработанных Мс-А (2 мкМ, 48 ч), методом электронной микроскопии. Обработка клеток веществом приводила к появлению в цитоплазме аутофагосом. Микрофотографии были сделаны при увеличении $\times 5000$

Известно, что повышение экспрессии белков LC3B-I/II и формирование аутофагосомальных вакуолей может являться свидетельством, как активации так и ингибирования аутофагии, которая в свою очередь может быть как цитопротекторной, так и цитотоксической [168, 169, 175]. В связи с этим было проведено исследование влияния ингибитора аутофагии 3-МА на способность Мс-А индуцировать белковую деградацию. Предварительная обработка клеток ингибитором 3-МА приводила к частичной отмене белковой деградации, что было подтверждено с помощью Вестерн-блоттинга, а также при

помощи окрашивания полиакриламидного геля кумасси бриллиантовым синим (Рис. 25) [186].

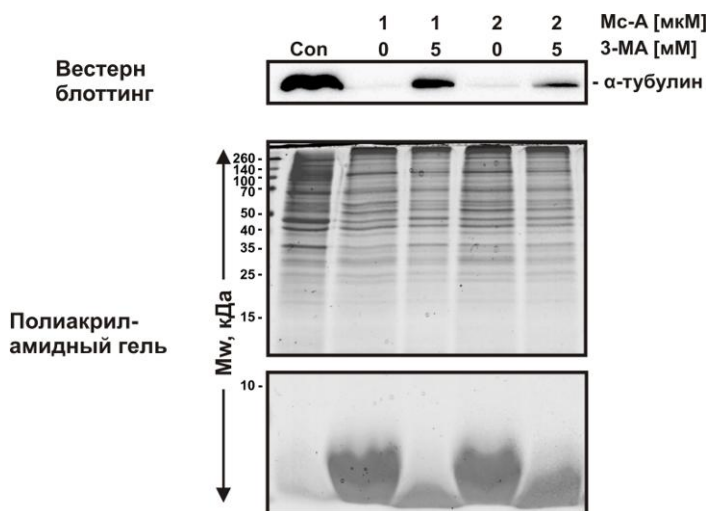


Рисунок 25. Анализ белкового экстракта клеток NCCIT-R обработанных Мс-А в течение 48 ч совместно с ингибитором 3-МА или в его отсутствие. После обработки клетки были собраны, белки экстрагированы и разделены при помощи электрофореза в 15% полиакриламидном геле. Белки, находящиеся в верхней части геля (область > 10 кДа), подвергли переносу на PVDF мембрану, а сам гель после переноса окрасили с помощью кумасси бриллиантового синего. Нижнюю часть геля окрасили с помощью кумасси бриллиантового синего без предварительного переноса белков

Таким образом, ингибитор аутофагии был способен отменять цитотоксический эффект Мс-А, а также индуцируемую белковую деградацию. На основании этого был сделан вывод, что Мс-А индуцирует цитотоксическую аутофагию опухолевых клеток NCCIT-R, а неспецифическая белковая деградация, индуцируемая монанхоцидином А, является аутофагия-зависимой. В то же время следует отметить, что как предварительная, так и одновременная обработка клеток 3-МА не вызывала отмену белковой деградации, вызванной Мс-А, в концентрациях > 2 мкМ (данные не показаны). Таким образом, было сделано предположение, что в концентрациях > 2 мкМ реализуется иной механизм цитотоксического действия Мс-А, отличный от цитотоксической аутофагии [186].

3.3.1.5. Индукция пермеабилзации лизосомных мембран (ПЛМ) опухолевых клеток под действием Мс-А

Как было отмечено выше, ингибитор аутофагии 3-МА не был способен ингибировать неспецифическую белковую деградацию, вызванную обработкой клеток Мс-А в концентрации > 2 мкМ. Более того, белковая деградация, вызванная Мс-А при обработке клеток его более высокими концентрациями (20 мкМ), происходила за очень короткое время (Рис. 21). Поэтому было сделано предположение, что этот процесс может быть вызван пермеабиллизацией (увеличением проницаемости) лизосомных мембран (ПЛМ). Известно, что в отличие от других метаболических процессов, ПЛМ может начинаться очень быстро после воздействия стимула и приводить к быстрой белковой деградации за счет выхода во внутриклеточное пространство лизосомных протеаз [224]. Для того чтобы проверить это предположение, была предпринята попытка исследования целостности лизосом с использованием лизосомотропного метакроматического флуоресцентного красителя акридинового оранжевого (АО). При облучении синим светом концентрированный (например, при его локализации в интактных лизосомах) АО испускает красную флуоресценцию, в низкой же концентрации – зелёную (при его локализации в цитозоле и ядре, например, в случае ПЛМ) [152, 225]. Было обнаружено исчезновение красной флуоресценции и одновременное увеличение зелёной флуоресценции при обработке клеток NCCIT-R 50 мкМ Мс-А в течение короткого времени 1 ч. Данное наблюдение свидетельствовало об индукции ПЛМ исследуемым веществом (Рис. 26А, Б). Аналогичный эффект был обнаружен в клетках, обработанных хлорохином – веществом, способным индуцировать ПЛМ в высоких концентрациях (порядка 300 мкМ) и поэтому использовали в качестве положительного контроля [152, 226] (Рис. 26).

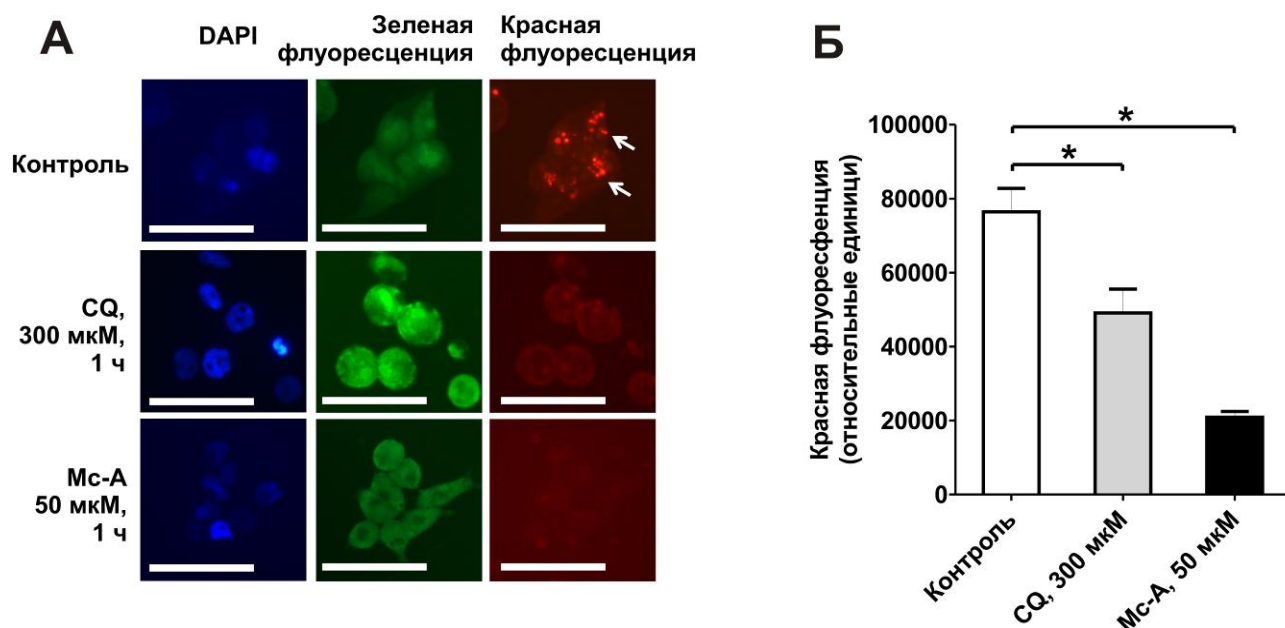


Рисунок 26. Индукция Ms-A пермеабилзации лизосомных мембран клеток NCCIT-R. Хлорохин (CQ) был использован в качестве положительного контроля. Клетки были обработаны веществами в течение 1 ч, окрашены акридиновым оранжевым и DAPI и немедленно проанализированы методом флуоресцентной микроскопии (**А**). Интактные лизосомы были идентифицированы как органеллы, испускающие интенсивную красную флуоресценцию (показаны стрелками). (**А**) Красная флуоресценция была оценена количественно с помощью программы ImageJ. (**Б**) Микрофотографии были сделаны при увеличении $\times 400$. Масштаб: 1 = 50 мкм

Более того, дополнительным доказательством индукции ПЛМ был выход лизосомной протеазы – катепсина В – в межклеточное пространство. Данное явление наблюдалось в клетках, обработанных Ms-A в концентрациях ≥ 2 мкМ (Рис. 27) [186].

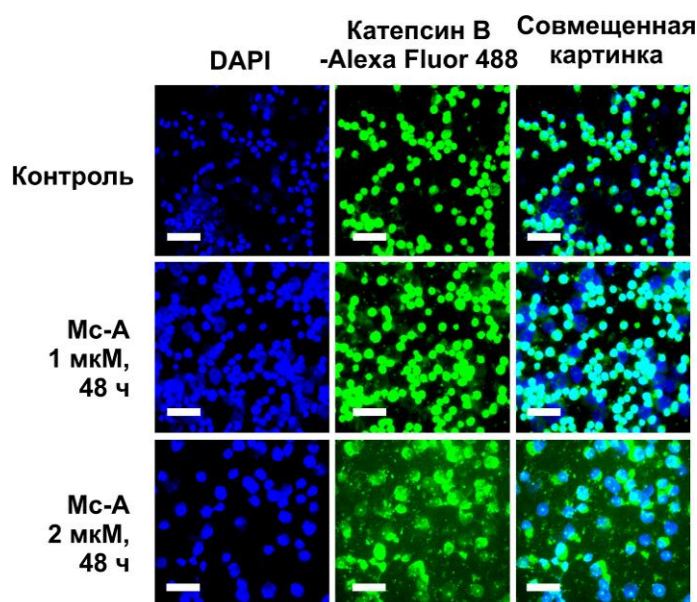


Рисунок 27. Индукция пермеабилзации лизосомных мембран клеток NCCIT-R под воздействием Мс-А. Клетки были обработаны веществом в течение 48 ч, зафиксированы на стеклянной подложке, окрашены последовательно первичными антителами (специфичными к катепсину В) и вторичными антителами (мечеными Alexa Fluor 488) и проанализированы с помощью метода флуоресцентной микроскопии. Микрофотографии были сделаны при увеличении $\times 100$. Масштаб: 1 = 50 мкм

3.3.1.6. Обсуждение результатов исследования *in vitro* цитотоксической активности Мс-А на опухолевые клетки человека

Морской алкалоид Мс-А имеет уникальную химическую структуру. Впервые соединение было выделено в ТИБОХ ДВО РАН в 2010 году из морской губки *Monanchora pulchra*. Ранее была показана цитотоксическая активность соединения по отношению к клеткам лейкемии человека HL-60 и ТНР-1, которая реализовывалась предположительно по апоптотическому механизму [19]. Исследования эффективности и механизма действия данного природного соединения на солидных опухолях человека ранее не проводились. Нами показано, что Мс-А проявляет высокую цитотоксическую активность по отношению к герминальным опухолевым клеткам человека, клеткам рака простаты, а также клеткам рака мочевого пузыря. В то же время нормальные неопухолевые клетки человека были менее чувствительны к цитотоксическому действию Мс-А. Показано, что соединение проявляет одинаковую активность по отношению к клеточным линиям рака простаты человека, как устойчивым, так и чувствительным к гормональной терапии линий, а также к герминальным опухолевым клеткам человека, устойчивым и чувствительным к

цисплатину. Это позволяет предположить, что Мс-А может быть активен по отношению к опухолям, устойчивым к известным химиотерапевтическим препаратам.

Мс-А индуцирует программируемую клеточную гибель, а также ингибирует прогрессию клеточного цикла в G1- и S-фазах. Однако более подробные исследования показали, что доминирующим эффектом, приводящим впоследствии к смерти опухолевых клеток, является индукция цитотоксической аутофагии и ПЛМ, а не классический апоптоз.

Аутофагия – это один из базовых клеточных катаболических процессов, приводящий к специфической или неспецифической деградации повреждённых или ненужных белков (включая долгоживущие белки), органелл и цитоплазмы при помощи лизосом. Индукция аутофагии в опухолевых клетках может играть как цитопротекторную, так и цитотоксическую роль [160-162]. Известно, что противоопухолевый эффект некоторых ингибиторов тирозиновых киназ или ингибиторов mTOR [161] включает индукцию цитотоксической аутофагии, также известную как программируемая клеточная гибель II типа [94].

В наших экспериментах неспецифическая деградация ряда белков была обнаружена в клетках, обработанных Мс-А, как в высоких концентрациях (20–50 мкМ) в течение короткого времени, так и в более низких концентрациях (1–2 мкМ) в течение длительного времени. Примечательно, что специфический ингибитор аутофагии 3-МА [227] был способен ингибировать деградацию белков в клетках, обработанных Мс-А в концентрациях до 2 мкМ в течение длительного времени. Кроме того, в обработанных веществом клетках были обнаружены двухмембранные аутофагосомальные вакуоли, а также увеличение уровня экспрессии белка-маркера аутофагии LC3B-I/II. Было предположено, что появление маркеров апоптоза в обработанных Мс-А клетках является вторичным событием [224], при этом следует отметить, что этот процесс также может вносить вклад в индуцируемую Мс-А гибель клеток NCCIT-R.

В высоких концентрациях > 2 мкМ доминирующим механизмом неспецифической белковой деградации (и, следовательно, клеточной смерти) была пермеабилзация лизосомных мембран (ПЛМ). Во время ПЛМ катепсины и другие протеазы выходят из лизосом в цитозоль, приводя к быстрой и неспецифической деградации клеточных компонентов [152], включая жизненно важные для клетки белки [228, 229]. В то же время, клеточная смерть, являющаяся результатом ПЛМ, может иметь также признаки некротической гибели и быть каспаза-независимой [152, 230]. Мы обнаружили, что потеря целостности лизосом и выход катепсина В в межклеточное пространство происходит при

обработке клеток Мс-А в концентрации ≥ 2 мкМ, что также говорит в пользу индукции ПЛМ исследуемым веществом.

Было показано, что ингибиторы активности лизосом и протеаз способны в определённой степени уменьшать цитотоксический эффект Мс-А. Это также говорит в пользу того, что и аутофагия, и ПЛМ являются релевантными механизмами цитотоксической активности исследуемого алкалоида, так как оба этих процесса требуют наличия функционирующих лизосом и/или активных катепсинов. Умеренный антагонистический эффект ингибитора каспаз z-VAD-fmk указывает на то, что активация каспаз является вторичным, более поздним событием. Активация каспаз может быть как результатом прямого расщепления каспаз катепсинами, так и результатом непрямого эффекта каскадов аутофагии или ПЛМ. Кроме того, известно, что z-VAD-fmk может ингибировать другие цистеиновые протеазы, включая некоторые катепсины [231]. Данное явление по крайней мере отчасти может объяснить умеренный антагонизирующий эффект z-VAD-fmk на цитотоксическую активность Мс-А.

Примечательно, что наше исследование является первым случаем наблюдения аутофагии в герминальных опухолевых клетках человека, в то время как индукция аутофагии в клетках рака простаты и рака мочевого пузыря является хорошо охарактеризованным феноменом. В то же время известно, что некоторые противораковые препараты, такие как рапамицин, эверолимус, метформин и нейрегулин способны индуцировать аутофагию (как цитотоксическую, так и цитопротекторную) [94, 232].

Механизм цитотоксического действия Мс-А в значительной степени отличается от механизма действия стандартных химиотерапевтических препаратов [233]. Вследствие этого данный морской алкалоид может быть перспективным в качестве основы для создания новых химиотерапевтических препаратов, способных преодолевать лекарственную устойчивость клеток к существующей на настоящий момент терапии [94, 224]. Кроме того, Мс-А способен усиливать цитотоксическую активность цисплатина, приводя к синергическому эффекту при комбинированном действии этих двух веществ. Данное наблюдение согласуется с более ранними сообщениями о том, что ПЛМ может приводить к усилению индукции апоптоза [228].

Таким образом, был сделан вывод о том, что Мс-А является высокоактивным цитотоксическим морским природным соединением. Соединение проявляет перспективную активность на моделях опухолей мочеполовой системы *in vitro*, включая лекарственно устойчивые клеточные линии. Эта активность, вероятнее всего, связано с необычным, по сравнению с классическими химиотерапевтическими препаратами,

механизмом действия этого алкалоида, который включает индукцию цитотоксической аутофагии и ПЛМ (Рис. 28) [186].

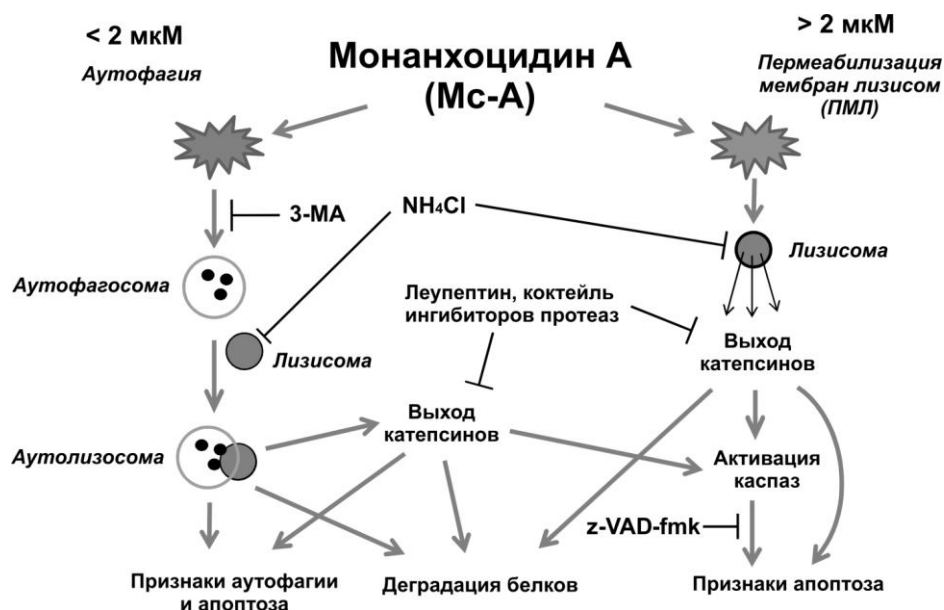


Рисунок 28. Схема предположительного механизма цитотоксического действия Мс-А в герминальных опухолевых клетках человека

3.3.1.7. Исследование эффекта Мс-А на протеом клеток NCCIT-R

3.3.1.7.1. Выявление белков, регулируемых под действием Мс-А в клетках NCCIT-R

Для дальнейшего исследования Мс-А как потенциального противоопухолевого препарата необходима идентификация белковых мишеней, а также исследование эффектов вещества в нецитотоксических концентрациях. Для того чтобы идентифицировать конкретные молекулярные мишени и биологические процессы, которые принимают участие в реализации биологического эффекта Мс-А при его действии на цисплатин-устойчивые опухолевые клетки человека NCCIT-R, мы применили метод глобального протеомного скрининга.

Чтобы исследовать изменения, происходящие в протеоме опухолевых клеток под действием на них вещества, клетки NCCIT-R были обработаны Мс-А в концентрациях 0.5 мкМ и 1 мкМ в течение 48 ч, поскольку именно эти концентрации были ранее определены как активные по отношению к клеткам NCCIT-R [186]. Профили белковой экспрессии клеток, обработанных Мс-А, а также контрольных клеток, были проанализированы с помощью 2D-PAGE и сравнены между собой. Протеомные 2D карты экспрессии белков представлены на рисунке 29. Цифровые картинки 2D-гелей были проанализированы с помощью программы Delta 2D с целью выявления регулируемых белков. В эксперименте

с клетками, обработанными веществом в концентрации 0.5 мкМ, всего было идентифицировано 939 белковых пятен, для 11 из которых изменение уровня интенсивности оптической плотности составило ≥ 2 ($p < 0.05$, t-тест Стьюдента). Было идентифицировано понижение уровня экспрессии 6 белковых пятен (Рис. 29А, табл. 4А) и увеличение уровня экспрессии 5 белковых пятен (Рис. 29Б, табл. 4А) под действием Мс-А на клетки NCCIT-R.

В другом эксперименте с клетками, обработанными Мс-А в концентрации 1 мкМ, всего было идентифицировано 873 белковых пятна, для 73 из которых изменение уровня интенсивности оптической плотности составило ≥ 2 ($p < 0.05$, t-тест Стьюдента). Было идентифицировано понижение уровня экспрессии 39 белковых пятен (Рис. 29В, табл. 4Б) и увеличение уровня экспрессии 34 белковых пятен (Рис. 29Г, табл. 4Б) под действием Мс-А на клетки NCCIT-R. Примечательно, что в ряде случаев несколько белковых пятен представляют один и тот же белок, например, eIF5A (пятна 39 и 46; рис. 29Б, В; табл. 4), SQSTM (пятна 44, 47, 49, 53, 59, 60 и 64; рис. 29Б, В; табл. 4), HSP7C (пятна 1 и 2; рис. 29Б, В; табл. 4) и другие (Рис. 29Б, В; табл. 4). Данный феномен может быть объяснен присутствием нескольких белковых изоформ и/или посттрансляционных модификаций белка.

Все 84 пятна были вручную вырезаны из геля, окрашенного кумасси бриллиантовым синим, и подвергнуты трипсинолизу и идентификации методом tandemной масс-спектрометрии (Табл. 4А, Б) [234].

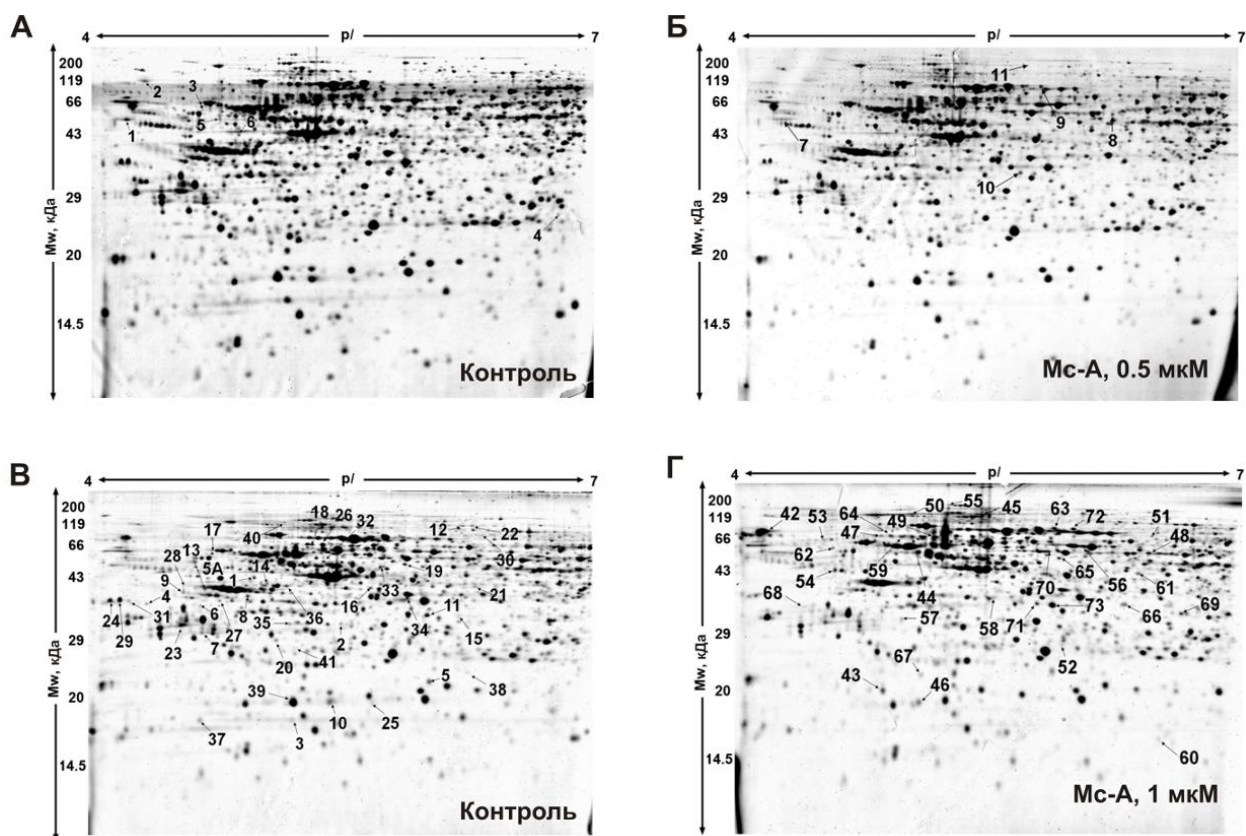


Рисунок 29. Результаты анализа методом 2D-PAGE белкового экстракта клеток NCCIT-R, обработанных 0.5 мкМ (А, Б) или 1 мкМ (В, Г) Мс-А в течение 48 ч. На рисунке представлена фотография 2D-гелей с регулируемые белками (обозначены номерами), соответствующее описание которых представлено в таблице 4. Обозначенные белковые пятна показали статистически достоверное изменение интенсивности окраски в ≥ 2 раза ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Таблица 4. Белки, уровень экспрессии которых изменялся в клетках NCCIT-R при обработке клеток 0.5 мкМ (А) или 1 мкМ (Б) Мс-А. Белки были идентифицированы методом MALDI-ToF-MS. Номера белков соответствуют номерам пятен, представленных на рисунке 29

А)

Номер пятна на геле	Относительное изменение уровня экспрессии белка	Номер в базе Swiss-Prot	Название гена	Название белка	Теор. Mw (Да)	Теор. pI
1	0.299	P67809	YBOX1_HUMAN	Нуклеаза-чувствительный элемент-связывающий белок 1	35903	9.9
2	0.363	Q05519	SFR11_HUMAN	Аргинин/серин-богатый фактор сплайсинга 11	53510	10.5
3	0.38	P14625	ENPL_HUMAN	Эндоплазмин	92411	4.8
4	0.462	P31943	HNRH1_HUMAN	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H	49198	5.9
5	0.48	P08670	VIME_HUMAN	Виментин	53619	5.1
6	0.493	P11142	HSP7C_HUMAN	Белок родственный белку теплового шока 71 кДа	70854	5.4
7	2.303	P67809	YBOX1_HUMAN	Нуклеаза-чувствительный элемент-связывающий белок 1	35903	9.9
8	2.637	P36957	ODO2_HUMAN	Сукцинилтрансферазный компонент 2-оксоглутарат-дегидрогеназного митохондриального комплекса, содержащий дигидролипоиллизиновый остаток	48609	9.0
9	3.085	P10515	ODP2_HUMAN	Ацетилтрансферазный компонент пируват-дегидрогеназного митохондриального комплекса, содержащий дигидролипоиллизиновый остаток	65739	5.8
10	3.181	P02649	APOE_HUMAN	Аполипопротеин E	36132	5.7
11	4.497	P19338	NUCL_HUMAN	Нуклеолин	76568	4.6

Б)

Номер пятна на геле	Относительное изменение уровня экспрессии белка	Номер в базе Swiss-Prot	Название гена	Название белка	Теор. Mw (Да)	Теор. pI
1	0.15	P11142	HSP7C_HUMAN	Белок родственный белку теплового шока 71 кДа	70854	5.4
2	0.2	P11142	HSP7C_HUMAN	Белок родственный белку теплового шока 71 кДа	70854	5.4
3	0.22	Q99879	H2B1M_HUMAN	Гистон H2B тип 1-М	13981	10.3
4	0.25	O00273	DFFA_HUMAN	Альфа-субъединица фактора фрагментации ДНК	36500	4.7
5	0.25	P33316	DUT_HUMAN	Митохондриальная дезоксиуридин 5'-трифосфат нуклеотидогидролаза	26690	9.7
6	0.27	Q9H2J4	PDCL3_HUMAN	Фосдуциноподобный белок 3	27597	4.8
7	0.28	P63104	1433Z_HUMAN	Белок 14-3-3 дзета/дельта	27728	4.7
8	0.29	P29692	EF1D_HUMAN	Фактор элонгации 1-дельта	31103	4.9
9	0.29	P07951	TPM2_HUMAN	Тропомидин бета цепь	32831	4.7
10	0.29	P53999	TCP4_HUMAN	Транскрипционный коактиватор p15 активированной РНК полимеразы II	14386	9.6
11	0.32	P61289	PSME3_HUMAN	Субъединица 3 протеасомного активаторного комплекса	29488	5.7
12	0.33	O75534	CSDE1_HUMAN	Белок E1, содержащий домен белка теплового шока	88829	5.9
13	0.34	Q8N8S7	ENAH_HUMAN	Гомолог вспомогательного белка	66470	6.5
14	0.34	P14625	ENPL_HUMAN	Эндоплазмин	92411	4.8
15	0.35	P04264	K2C1_HUMAN	Цитоскелетный кератин 1, II тип	65978	8.2
16	0.37	Q6FI81	CPIN1_HUMAN	Анаморсин	33561	5.4
17	0.37	P14625	ENPL_HUMAN	Эндоплазмин	92411	4.8

18	0.37	P61978	HNRPK_HUMAN	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин К	50944	5.4
19	0.38	P48637	GSHB_HUMAN	Глуталион синтаза	52352	5.7
20	0.38	O60232	SSA27_HUMAN	аутоантиген 1 скелетодемы / синдрома Шегнера	21461	5.1
21	0.39	P40121	CAPG_HUMAN	Белок макрофагирования	38494	5.9
22	0.41	O75534	CSDE1_HUMAN	Белок E1, содержащий домен белка холодового шока	88829	5.9
23	0.41	P62258	1433E_HUMAN	Белок 14-3-3 эпсолин	29155	4.6
24	0.42	Q13765	NACA_HUMAN	Альфа-субъединица зарождающегося полипептид-ассоциированного комплекса	23370	4.5
25	0.42	Q13765	NACA_HUMAN	Альфа-субъединица зарождающегося полипептид-ассоциированного комплекса	23370	4.5
26	0.42	P61978	HNRPK_HUMAN	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин К	50944	5.4
27	0.42	O43765	SGTA_HUMAN	Малый глутамин-богатый белок альфа, содержащий последовательность тетрапептида	34042	4.8
28	0.43	Q99871	HAUS7_HUMAN	Субъединица 7 HAUS аутиноподобного комплекса	39768	4.7
29	0.44	Q13765	NACA_HUMAN	Альфа-субъединица зарождающегося полипептид-ассоциированного комплекса	23370	4.5
30	0.44	Q9BYT8	NEUL_HUMAN	Митохондриальный нейролизин	80600	6.2
31	0.44	P05787	K2C8_HUMAN	Цитоскелетный кератин 8, тип II	53671	5.5
32	0.45	P10644	KAP0_HUMAN	Регуляторная субъединица cAMP-зависимой протеиновой киназы первого типа	42955	5.3
33	0.45	P15311	EZRI_HUMAN	Эзрин	69370	5.9
34	0.46	P47755	CAZA2_HUMAN	Альфа-субъединица F-актин упаковывающего белка	32929	5.6
35	0.46	P47755	CAZA2_HUMAN	Альфа-2-субъединица F-актин упаковывающего белка	32929	5.6
36	0.49	Q13243	SFRS5_HUMAN	Аргинин/серин-богатый фактор сплайсинга 5	31245	11.6
37	0.49	P04264	K2C1_HUMAN	Цитоскелетный кератин 1, тип II	65978	8.2
38	0.49	Q9NV35	NUD15_HUMAN	Возможная 7,8-дигидро-8-оксогуанин трифосфатаза NUDT15	18597	5.8
39	0.49	P63241	IF5A1_HUMAN	Эукариотический фактор инициации трансляции 5A-1	16821	5.1
40	2.02	Q4V328	GRAP1_HUMAN	GRIP1-ассоциированный белок 1	95931	5.1
41	2.05	P45973	CBX5_HUMAN	Гомолог 5 хромобоксового белка	22211	5.7
42	2.056	P27797	CALR_HUMAN	Калретикулин	48112	4.3
43	2.11	Q9Y2B0	CNPY2_HUMAN	Гомолог 2 белка канопи	20639	4.8
44	2.13	Q13501	SQSTM_HUMAN	Секвестосома-1	47657	5.1
45	2.14	P60709	ACTB_HUMAN	Цитоплазматический актин 1	41710	5.3
46	2.17	P63241	IF5A1_HUMAN	Эукариотический фактор инициации трансляции 5A-1	16821	5.1
47	2.17	Q13501	SQSTM_HUMAN	Секвестосома-1	47657	5.1
48	2.17	P36957	ODO2_HUMAN	Сукцинилтрансферазный компонент 2-оксоглутарат-дегидрогеназного митохондриального комплекса, содержащий дигидролипидлизиновый остаток	48609	9.0
49	2.27	Q13501	SQSTM_HUMAN	Секвестосома-1	47657	5.1
50	2.28	P14625	ENPL_HUMAN	Эндоплазмин	92411	4.8
51	2.3	Q5T0N5	FBP1L_HUMAN	Белок, подобный формин-связывающему белку 1	69933	6.1
52	2.39	P02649	APOE_HUMAN	Аполипопротеин Е	36132	5.7
53	2.42	Q13501	SQSTM_HUMAN	Секвестосома-1	47657	5.1
54	2.67	Q96D15	RCN3_HUMAN	Ретикулокалбин-3	37470	4.7
55	2.69	P49321	NASP_HUMAN	Ядерный аутоантигенный белок спермы	85186	4.3
56	2.72	P30101	PDIA3_HUMAN	Белковая дисульфид-изомераза A3	56747	6.0
57	2.74	P39687	AN32A_HUMAN	Член А семейства кислых лейцин-богатых ядерных фосфопротеинов 32	28568	4.0
58	2.77	P02649	APOE_HUMAN	Аполипопротеин Е	36132	5.7
59	2.78	Q13501	SQSTM_HUMAN	Секвестосома-1	47657	5.1
60	2.82	Q13501	SQSTM_HUMAN	Секвестосома-1	47657	5.1
61	2.86	Q9UBS4	DJB11_HUMAN	Член 11 субсемейства В гомологов DnaJ	40489	5.8
62	2.86	Q9H8Y8	GORS2_HUMAN	Белок сборки Гольджи 2	47116	4.7

63	2.97	P10515	ODP2_HUMAN	Ацетилтрансферазный компонент пируват-дегидрогеназного митохондриального комплекса, содержащий дигидролипоиллизиновый остаток	65739	5.8
64	3.15	Q13501	SQSTM_HUMAN	Секвестосома-1	47657	5.1
65	3.15	P48637	GSHB_HUMAN	Глутатион синтаза	52352	5.7
66	3.22	O75828	CBR3_HUMAN	Карбонил редуктаза [NADPH] 3	30831	5.8
67	3.24	Q9Y287	ITM2B_HUMAN	Интегральный мембранный белок 2B	30318	5.0
68	3.3	P06748	NPM_HUMAN	Нуклеофосмин	32555	4.6
69	3.7	Q13011	ECH1_HUMAN	Митохондриальная дельта(3,5)-дельта(2,4)-диеноил-CoA изомераза	35793	8.2
70	4.45	P05787	K2C8_HUMAN	Цитоскелетный кератин 8, тип II	53671	5.5
71	6.29	Q5T7N2	LITD1_HUMAN	Тип LINE-1 белка содержащего транспозазный домен	98789	4.9
72	6.56	P10515	ODP2_HUMAN	Ацетилтрансферазный компонент пируват-дегидрогеназного митохондриального комплекса, содержащий дигидролипоиллизиновый остаток	65739	5.8
73	18.16	P02649	APOE_HUMAN	Аполипопротеин E	36132	5.7

3.3.1.7.2. Биоинформатический анализ протеомных данных

Функциональный анализ, анализ возможных взаимодействий регулируемых белков, а также белков, предположительно участвующих в клеточном ответе на воздействие исследуемых веществ, был произведён с помощью программы IPA (Рис. 30). Результаты анализа представлены на рисунке 30. С помощью данной методики были предсказаны возможные функции белков, регулируемых под действием Мс-А на клетки и открытых методом протеомики. Кроме того, на основании данного анализа регулируемые белки были помещены в определённые функциональные категории, а также была рассчитана так называемая z-оценка, которая определяет направление возможного эффекта стимула на данный конкретный биологический процесс: негативное значение z-оценки означает подавление данного процесса под действием стимула (обработки клеток веществом), положительное – его активацию. Было предсказано, что такие функциональные категории как «клеточное движение» (9 процессов), а также «рост и пролиферация клеток» (4 процесса) должны быть наиболее сильно подавляемы в клетках NCCIT-R под действием на них Мс-А (Рис. 30). Также было предсказано, что процессы, ассоциированные с «клеточной смертью и выживанием» (6 процессов) были наиболее сильно активированы под действием Мс-А (Рис. 30). Было предсказано, что только один процесс – «миграция клеток» – относящийся к функциональной категории «клеточное движение», имел статистически достоверное изменение значения z-оценки (z-оценка < 2, $p < 0.05$, t-тест Стьюдента, рис. 30, обозначено стрелкой), и, следовательно, был достоверно подавляемым под действием вещества на клетки. Таким образом, биоинформатический

анализ, проведённый с применением программы IPA, предсказал способность Мс-А подавлять миграцию опухолевых клеток NCCIT-R [234].

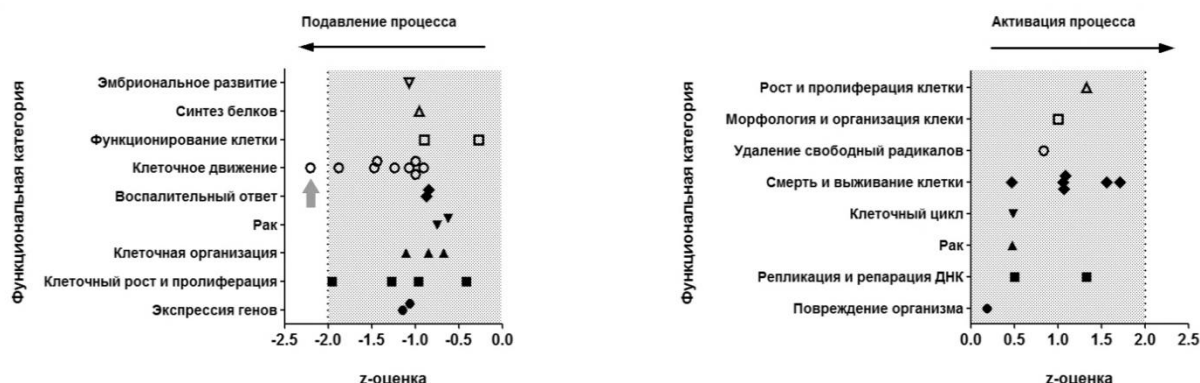


Рисунок 30. Функциональный анализ белков, регулируемых под действием Мс-А на клетки NCCIT-R, проведённый с использованием программы IPA и алгоритма z-оценки. Биологические процессы, для которых была предсказана активация, имеют z-оценку > 0 , для которых было предсказано их ингибирование – имеют z-оценку < 0 . Единственным биологическим процессом, для которого предсказанное регулирование должно быть существенным и достоверным (z-оценка < 2), была «клеточная миграция» (принадлежащая к функциональной категории «движение клеток»). Процессы, для которых значение z-оценки < -2 или > 2 являются достоверно регулируемыми (согласно инструкциям программы IPA, www.ingenuity.com). Область недостоверно регулируемых процессов окрашена в серый цвет. Для всех представленных на рисунке процессов $p < 0.05$ (t-тест Стьюдента), что означает, что связь между набором регулируемых белков и определённой биологической функцией является статистически достоверной

Анализ возможных взаимодействий белков, регулируемых под действием Мс-А на клетки, а также белков, предположительно участвующих в клеточном ответе на воздействие исследуемого вещества, был произведён с помощью программы IPA (Рис. 31). Как следует из представленных данных, в центре построенной гипотетической сети взаимодействий находятся киназа ERK1/2, проапоптотическая протеаза каспаза-3, фактор некроза опухолей (TNF) и белок семейства протеинкиназ В (Akt) (Рис. 31). Таким образом, данные белки, а также процессы, в которых они принимают участие, могут быть потенциальными мишенями или эффекторами, задействованными в реализации биологической активности Мс-А [234].

Figure 1 is a complex network diagram illustrating interactions between various proteins. The nodes are represented by different shapes and colors: green circles (e.g., CAPZA2, GRIN2A, CAPZA1, CASP2, NUPR1, HISTH2BM, DEFA, EEF1D, PSME3), pink diamonds (e.g., ANP32A, ECH1, SAA, ESR1, ESR2, ESR3, ESR4, ESR5, ESR6, ESR7, ESR8, ESR9, ESR10, ESR11, ESR12, ESR13, ESR14, ESR15, ESR16, ESR17, ESR18, ESR19, ESR20, ESR21, ESR22, ESR23, ESR24, ESR25, ESR26, ESR27, ESR28, ESR29, ESR30, ESR31, ESR32, ESR33, ESR34, ESR35, ESR36, ESR37, ESR38, ESR39, ESR40, ESR41, ESR42, ESR43, ESR44, ESR45, ESR46, ESR47, ESR48, ESR49, ESR50, ESR51, ESR52, ESR53, ESR54, ESR55, ESR56, ESR57, ESR58, ESR59, ESR60, ESR61, ESR62, ESR63, ESR64, ESR65, ESR66, ESR67, ESR68, ESR69, ESR70, ESR71, ESR72, ESR73, ESR74, ESR75, ESR76, ESR77, ESR78, ESR79, ESR80, ESR81, ESR82, ESR83, ESR84, ESR85, ESR86, ESR87, ESR88, ESR89, ESR90, ESR91, ESR92, ESR93, ESR94, ESR95, ESR96, ESR97, ESR98, ESR99, ESR100), and grey diamonds (e.g., GRIA2, GRIN2A, CAPZA2, CAPZA1, CASP2, NUPR1, HISTH2BM, DEFA, EEF1D, PSME3). Interactions are shown by solid and dashed lines. The network is highly interconnected, with many nodes having multiple connections. Key nodes include NUPR1, CASP2, HTT, and ESR1.

Схема 4



```

graph TD
    S1[Сеть 1] ---|1| S4[Сеть 4]
    S4 ---|1| S2[Сеть 2]
    S4 ---|2| S3[Сеть 3]
    S2 ---|2| S3
  
```

96

регулируемых под действием Мс-А (закрашенные фигуры: красные – белки, экспрессия которых увеличивается; зелёные – белки, экспрессия которых уменьшается) и предсказанных программой (но не открытых в проведённых нами 2D-PAGE экспериментах – незакрашенные фигуры). Пунктирными линиями обозначены не прямые белок-белковые взаимодействия, сплошными линиями – прямые взаимодействия (согласно базам данных IPA). На рисунке приведены названия соответствующих регулируемым белкам генов. (Б) Перекрывание между схемами 1–4. Количество одновременно входящих в несколько схем белков показано цифрами

3.3.1.7.3. Валидация регуляции белков, открытых методом протеомики

Для подтверждения (валидации) регуляции открытых методом протеомики белков использовали метод одно- и двумерного (2D) Вестерн-блоттинга. Было проанализировано семь белковых пятен, выбранных из таблицы 4. Содержащиеся в них белки были определены как виментин (одно пятно), аполипопротеин Е (apoE, четыре пятна) и eIF5A (два пятна). Известно, что данные белки принимают участие в миграции, инвазии и процессах метастазирования опухолевых клеток [235-241]. Для всех трёх белков с помощью 2D-Вестерн-блоттинга было показано наличие нескольких изоформ со схожей или идентичной M_w , но различными значениями изоэлектрических точек (pI) (Рис. 32) [234].

Примечательно, что одномерный Вестерн-блоттинг не выявил какой-либо регуляции общего уровня экспрессии виментина (Рис. 32А). Поэтому дальнейшее исследование регуляции этого белка проводили с помощью 2D-Вестерн-блоттинга. Было найдено, по меньшей мере, три белковых пятна, представляющих собой три изоформы виментина с разными значениями pI (4.8, 5.0 и 5.1) и схожей M_w . Уменьшение экспрессии одной из этих изоформ, имеющей pI = 5.0, под действием Мс-А на клетки была подтверждена при помощи 2D-Вестерн-блоттинга с использованием антител, специфичных к виментину (Рис. 32Б). Известно, что pI для основной изоформы виментина составляет 5.06 [242]. Скорее всего, именно она была обнаружена в представленных выше экспериментах как изоформа с pI = 5.1. Также известно, что виментин имеет большое число сайтов фосфорилирования – 146 теоретически предсказанных, 14 из которых описаны в литературе [242], к 11 из которых на настоящий момент доступны специфические антитела. Введение фосфатной группы в молекулу вызывает сдвиг pI в область низких значений (в наших экспериментах это были изоформы с pI = 4.8 и 5.0). На основании этого было сделано предположение, что наблюдаемая регуляция изоформы с pI

= 5.0 является результатом фосфорилирования этой изоформы. Однако ответственный за наблюдаемые изменения специфический сайт фосфорилирования (который может быть как фосфорилирован, так и дефосфорилирован, что приводило бы к наблюдаемым изменениям pI) не был определён.

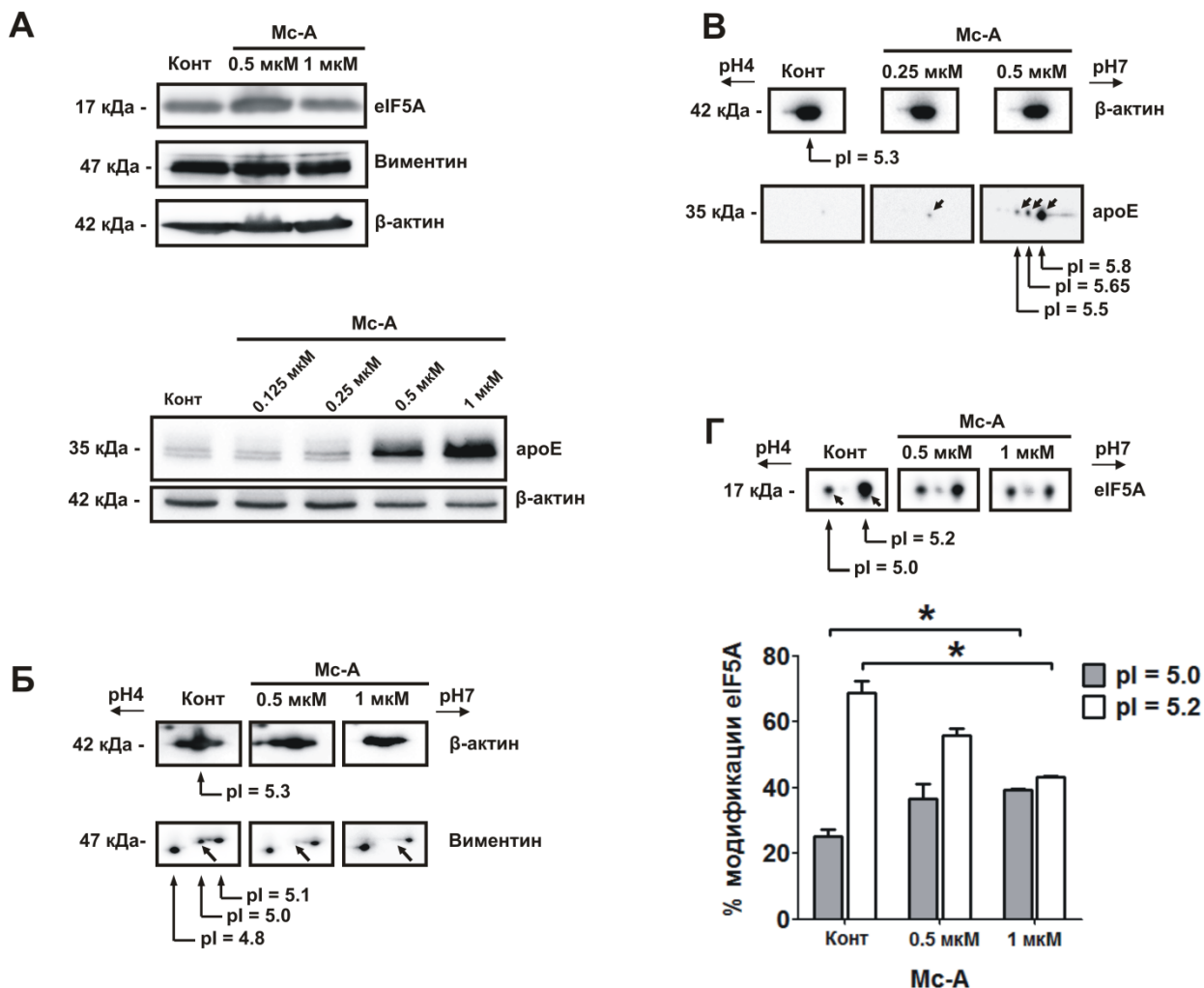


Рисунок 32. Результаты анализа изменений, происходящих с белками eIF5A, виментином и aroE, под действием Мс-А на клетки NCCIT-R. (А) Вестерн-блоттинг выявил увеличение общего уровня экспрессии aroE, в то время как уровни экспрессии eIF5A и виментина оставались неизменными. (Б) 2D-Вестерн-блоттинг выявил уменьшение экспрессии изоформы виментина с pI = 5.0. (В) 2D-Вестерн-блоттинг выявил увеличение экспрессии нескольких изоформ aroE с одинаковой Mw и различными pI. (Г) 2D-Вестерн-блоттинг выявил противоположную регуляцию двух изоформ eIF5A, имеющих одинаковые Mw и различные pI. Происходящие с изоформами eIF5A изменения были оценены количественно с помощью программы Quantity One 4.6 (Bio-Rad), полученные количественные данные представлены на графике. Регулируемые белковые

изоформы, открытые с помощью 2D-PAGE обозначены стрелками. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

2D-PAGE анализ показал, что регуляция соответствующего виментину белкового пятна является статистически достоверной (регуляция интенсивности ≥ 2 , $p < 0.05$, t-тест Стьюдента) в эксперименте с клетками, обработанными 0.5 мкМ Мс-А (пятно No 5, рис. 29А, Б), но не в эксперименте, в котором была использована концентрация 1 мкМ Мс-А. Детальное сравнение 2D-PAGE гелей выявило регуляцию того же самого принадлежащего виментину белкового пятна во втором эксперименте (с клетками, обработанными 1 мкМ Мс-А, данные не показаны); при этом изменение интенсивности составило 0.542, а $p = 0.108$ (т.е. $p > 0.05$, t-тест Стьюдента). Таким образом, данное пятно во втором эксперименте не было определено программой Delta 2D как соответствующее статистическим критериям селекции, и поэтому не было представлено в таблице 4Б. В то же время регуляция данного пятна была подтверждена с помощью 2D-Вестерн-блоттинга, который выявил регуляцию данной изоформы белка в клетках, обработанных как 0.5 мкМ, так и 1 мкМ Мс-А (Рис. 32Б).

Было показано, что ароЕ является белком с наиболее сильно увеличивающимся под действием 1 мкМ Мс-А на клетки NCCIT-R уровнем экспрессии (изменение интенсивности окраски пятен в 2.3, 2.8 и 18.2 раз, таблица 4). С помощью Вестерн-блоттинга было подтверждено увеличение общего количества ароЕ (Рис. 32А). Дальнейший анализ с помощью 2D-Вестерн-блоттинга выявил, по крайней мере, 3 изоформы этого белка, имеющих одинаковое значение M_w , но разное значение pI (Рис. 32В). Регуляция данных изоформ была также выявлена методом 2D-PAGE (Рис. 29, табл. 4).

2D-Вестерн-блоттинг анализ выявил противоположную регуляцию двух белковых пятен, идентифицированных как eIF5A и имеющих $pI = 5.0$ и 5.2 (соответственно, увеличение и уменьшение уровня экспрессии, рис. 32Г), в то время как уровень общей экспрессии этого белка оставался неизменным (Рис. 32А). Данный факт хорошо согласовывался с результатами 2D-PAGE эксперимента. Ранее данные белковые пятна были идентифицированы нами как изоформы Lys^{50} -eIF5A и Hsp^{50} -eIF5A (и имеющие $pI = 5.0$ и $pI = 5.2$, соответственно) [243, 244]. Количественная оценка сигналов, таким образом, выявила сдвиг Hsp^{50} -eIF5A $\rightarrow$ Lys^{50} -eIF5A в NCCIT-R клетках под действием на них Мс-А. Данные этого эксперимента свидетельствуют о том, что Мс-А ингибирует процесс гипузинирования белка eIF5A [234].

3.3.1.7.4. Валидация предсказанного ингибирующего эффекта Мс-А на миграцию и колониобразование клеток NCCIT-R

Биоинформатический анализ протеомных данных предсказал антимиграторную активность Мс-А (Рис. 30). Для того чтобы проверить это предположение, мы провели эксперимент по исследованию ингибирования клеточной миграции с использованием непокрытых вставок (инсёртов) для 12-луночного планшета (Рис. 34). Антимиграторная активность вещества была проверена на нескольких линиях опухолевых клеток человека – NCCIT-R, 2102EP, PC-3 и DU145. На первом этапе были определены концентрации вещества, которые не ингибируют ни жизнеспособность клеток, ни их способность к пролиферации. Концентрации были определены с помощью МТТ-метода с использованием среды, содержащей 0.1% FBS или 10% FBS. Среда с пониженным содержанием FBS (0.1%) была использована для того, чтобы подавить способность клеток к пролиферации, и таким образом оценить исключительно эффект вещества на жизнеспособность клеток (Рис. 33А). Среда с нормальным содержанием FBS (10%) была использована для того, чтобы оценить одновременно способность Мс-А ингибировать как пролиферацию клеток, так и их жизнеспособность (Рис. 33Б). Примечательно, что эффект Мс-А на клетки в среде с нормальным содержанием FBS (10%) был выше, чем в эксперименте с пониженным содержанием FBS (0.1%) (Рис. 33А-Г). Этот факт может быть объяснен дополнительным ингибирующим эффектом Мс-А на пролиферацию клеток. Такой эффект не проявляется в среде с низким содержанием FBS (0.1%), поскольку в этом случае пролиферация клеток (а значит и оценка эффекта вещества на неё) невозможны [234].

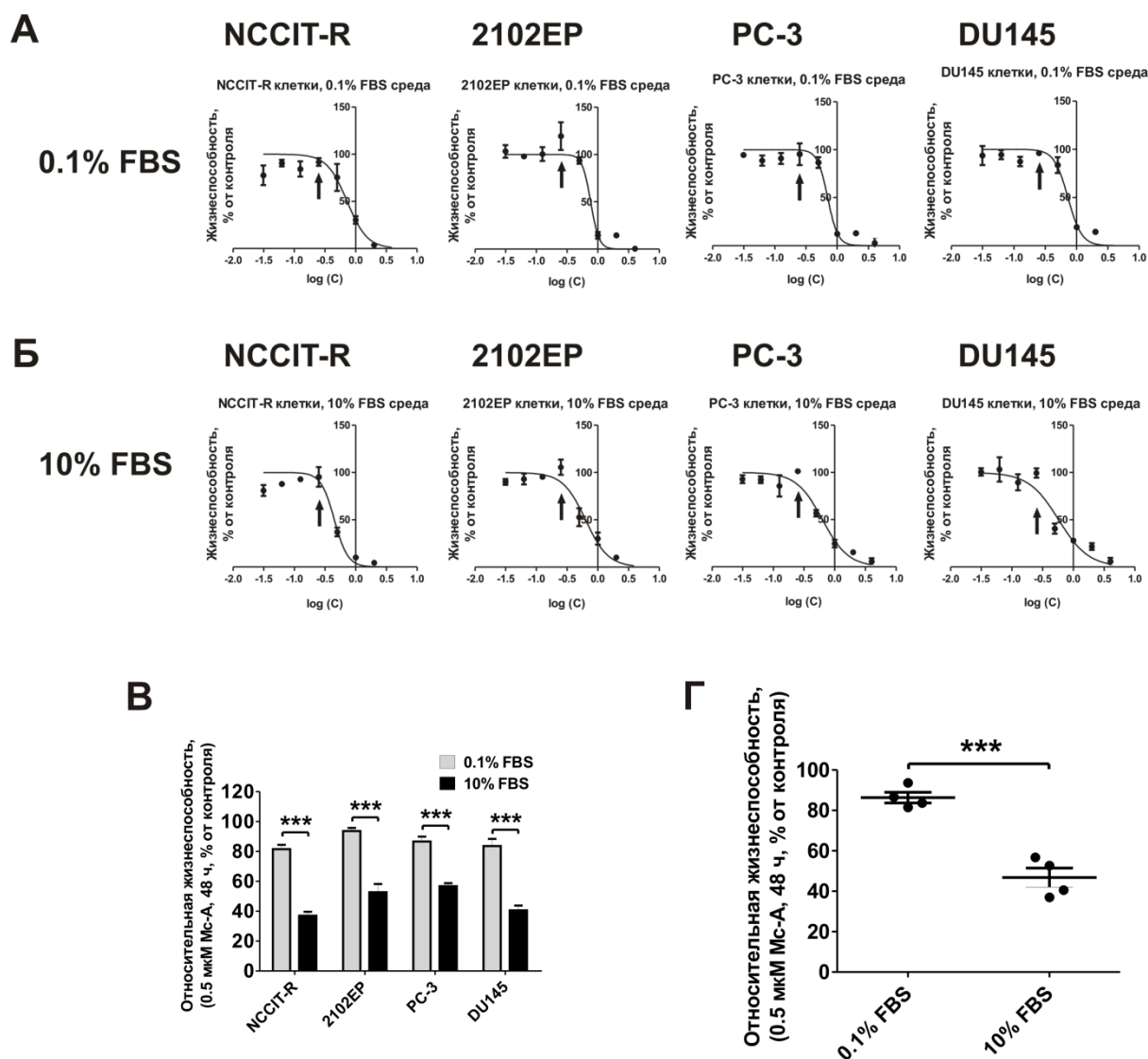


Рисунок 33. Оценка антипролиферативной и цитотоксической активности Мс-А. Оценка проводилась с использованием МТТ-теста. Клетки были обработаны Мс-А в среде с пониженным (0.1%, **А**) или нормальным (10%, **Б**) содержанием FBS в течение 48 ч. Концентрация Мс-А 0.25 мкМ была определена как концентрация, при которой не наблюдается снижения количества жизнеспособных клеток (обозначена стрелкой). (**В**, **Г**) Жизнеспособность клеток, обработанных 0.5 мкМ Мс-А в течение 48 ч. *** – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.001$, t-тест Стьюдента)

Для всех четырёх клеточных линий было показано, что концентрации Мс-А ≤ 0.25 мкМ не вызывают ингибирование ни пролиферации, ни жизнеспособности опухолевых клеток (Рис. 34). В то же время Мс-А в концентрации ≤ 0.25 мкМ был способен существенно ингибировать способность различных опухолевых клеток к миграции (Рис. 34) [234].

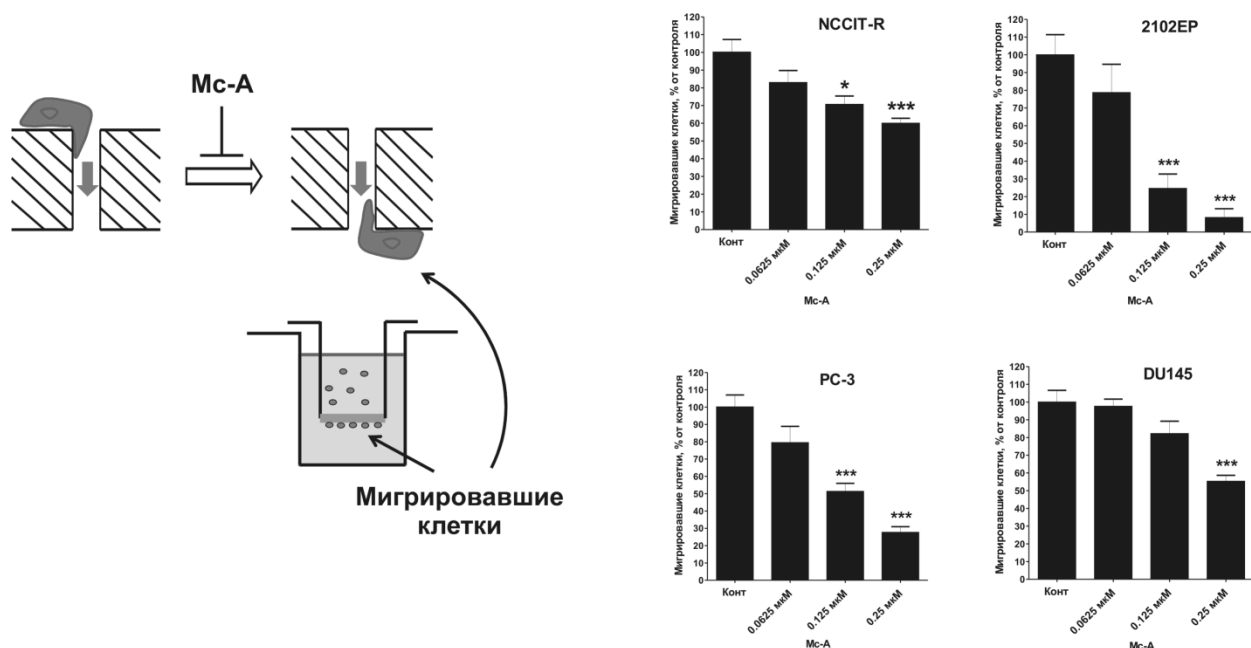


Рисунок 34. Оценка способности Мс-А ингибировать миграцию опухолевых клеток. Клетки были помещены в планшетные вставки в среде, содержащей исследуемое вещество, как показано на рисунке, и проинкубированы в течение 48 ч. После чего клетки были зафиксированы и окрашены. Количество клеток, мигрировавших на внешнюю сторону мембраны, было подсчитано с помощью инвертированного микроскопа

Исследование обработанных Мс-А клеток методом иммунофлуоресцентной микроскопии выявило изменения в морфологии клеток. Было обнаружено округление формы клеток, а также нарушение организации цитоскелета (возможно вследствие влияния на актин или тубулин) (Рис. 35).

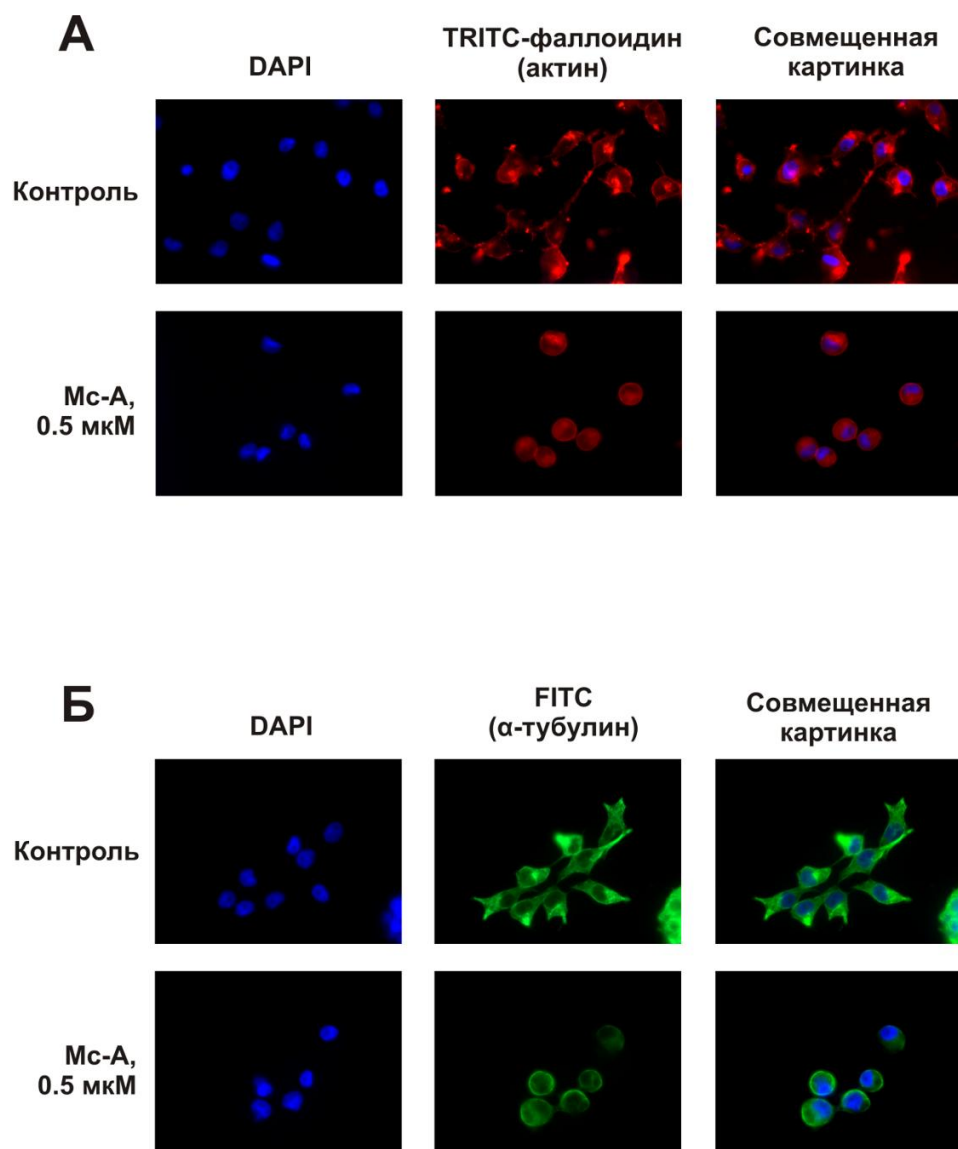


Рисунок 35. Индукция изменений в морфологии клеток и повреждения цитоскелета опухолевых клеток. Клетки NCCIT-R были обработаны Мс-А в течение 48 ч. Для экспериментов по исследованию структуры α -тубулина клетки были зафиксированны и окрашены последовательно первичными антителами, специфичными к α -тубулину, а затем вторичными антителами, меченными Alexa Fluor 488. Для экспериментов по исследованию структуры актина клетки были зафиксированны и окрашены фаллоидином, конъюгированным с TRITC. Окрашенные клетки были исследованы с помощью флуоресцентного микроскопа. Микрофотографии были сделаны при увеличении $\times 400$.

Кроме того, Мс-А был способен ингибировать колониеобразование опухолевых клеток человека из единичных клеток, предварительно обработанных веществом в течение 48 ч (Рис. 36) [234].

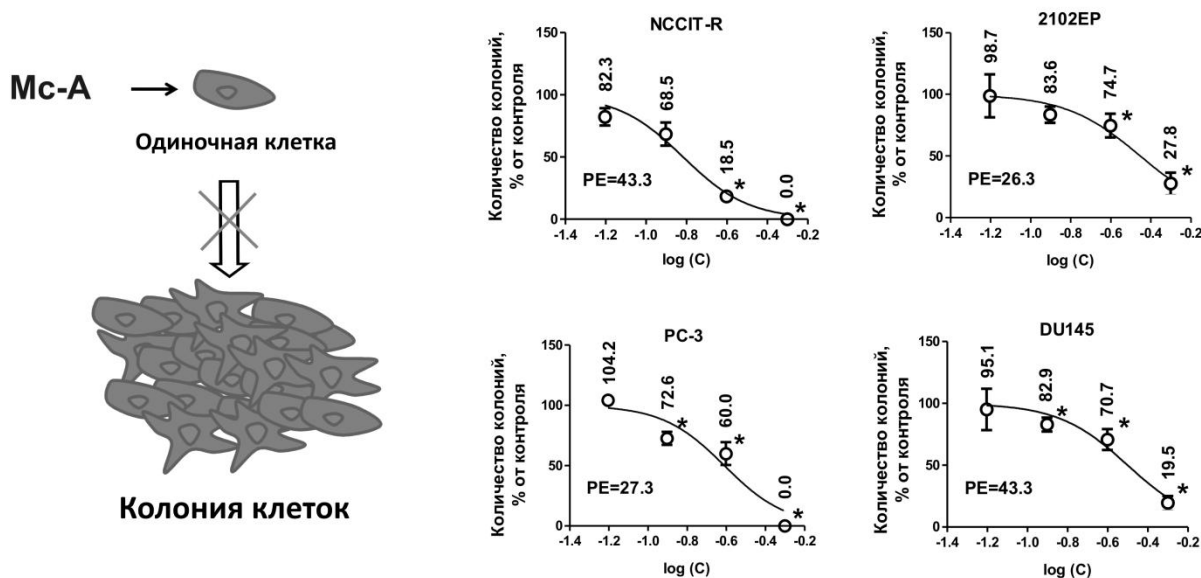


Рисунок 36. Ингибирование колониеобразования опухолевых клеток. Клетки были обработаны Mc-A в течение 48 ч, затем 100 живых клеток были помещены в лунки 6-луночного планшета и инкубированы в течение 10 дней. После чего клеточные колонии были зафиксированы, окрашены и подсчитаны невооруженным глазом. Эффективность посева (plating efficiency, PE) и фактор выживаемости были рассчитаны с использованием стандартных формул. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.3.1.7.5. Обсуждение результатов анализа эффекта Mc-A на протеом клеток NCCIT-R

В описанных выше экспериментах было показано, что Mc-A способен ингибировать жизнеспособность нескольких клеточных линий опухолевых клеток человека посредством индукции цитотоксической аутофагии и пермеабилзации лизосомных мембран [186]. В то же время точные белковые мишени данного морского алкалоида в опухолевых клетках не были установлены. Используя глобальный скрининг протеома, мы установили несколько белков, регулируемых в цисплатин-устойчивых герминальных опухолевых клетках человека NCCIT-R под действием на них Mc-A. Биоинформатический анализ полученных данных, проведённый при помощи программы IPA, предсказал участие данных белков в таких процессах как миграция, рост и пролиферация опухолевых клеток, клеточная смерть и выживание, формирование метастазов и прогрессия клеточного цикла. Примечательно, что ингибирование клеточной миграции было предсказано как основной эффект вещества на опухолевые клетки. Далее,

три белка – виментин, аполипопротеин E (apoE) и eIF5A – играющие роль в процессах миграции и инвазии клеток [235-241], были выбраны для дальнейшей валидации протеомных данных.

Виментин является основным белком промежуточных филаментов. Виментин обеспечивает клеточную целостность и устойчивость к внешним стрессам [235]. Этот белок сверхэкспрессирован во многих типах опухолевых клеток. Установлено, что его сверхэкспрессия коррелирует с ускоренным ростом опухолей, миграцией, инвазией, метастазированием и неблагоприятным прогнозом терапии [235]. В ходе выполнения настоящей работы была выявлена регуляция одной из изоформ виментина под действием на клетки Мс-А, что предположительно может быть связано с контролем сборки и разборки филаментов [245]. Кроме того, виментин является известным маркером эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial-mesenchymal transition, EMT), который характеризуется высокой экспрессией виментина в эпителиальных клетках. EMT играет важную роль в метастатических процессах, позволяя опухолевым клеткам мигрировать, внедряться в окружающую строму, а также распространяться во вторичные органы [235, 245]. В то же время в настоящих экспериментах регуляции общего уровня экспрессии виментина обнаружено не было, поэтому был сделан вывод, что Мс-А не модулирует EMT в клетках NCCIT-R, но оказывает эффект на структуру промежуточных филаментов и таким образом регулирует миграцию и инвазию опухолевых клеток [235, 245].

Аполипопротеин E (apoE) – это полиморфная молекула, играющая важную роль в сердечно-сосудистых и нейродегенеративных патологиях. Однако роль этого белка в онкологических процессах намного менее исследована и, по всей видимости, может быть двоякой [246]. Так, apoE проявляет антиадгезивную активность, ингибирует пролиферацию, миграцию, метастазирование, ангиогенез, а также связь опухолевых клеток с эндотелием *in vitro* и *in vivo* [236, 237]. В проведённых нами экспериментах было показано увеличение экспрессии как минимум трёх изоформ apoE. Для разных изоформ этого белка ранее был показан ингибирующий эффект на пролиферацию и миграцию клеток, проявляемый в различной степени в зависимости от конкретной изоформы [247, 248]. Таким образом, наблюдаемое увеличение экспрессии apoE в обработанных Мс-А клетках NCCIT-R может вносить вклад в антимиграторную активность данного природного соединения. В то же время следует отметить, что некоторые работы описывают возможную роль apoE в развитии и выживании опухолевых клеток [249], поскольку в некоторых типах опухолей была обнаружена повышенная экспрессия белка apoE [250]. Кроме того, антиадгезивная активность apoE может приводить к повышенному

метастатическому распространению опухолевых клеток. Следовательно, точная роль белка *ароЕ* в герминальных опухолевых клетках человека должна быть изучена более детально в будущем.

Белок *eIF5A* (эукариотический фактор инициации трансляции 5А-1) является высококонсервативным во всех эукариотических клетках. Известно, что данный фактор активируется посредством гипузинирования, которое необходимо для его биологической активности [251]. Имеются сообщения, что активный (гипузинированный) *eIF5A* необходим для пролиферации и миграции опухолевых клеток [238, 239]. Таким образом, этот процесс может быть перспективной и привлекательной мишенью новых противораковых препаратов [240]. Ранее было показано, что GC7 (N1-гуанил-1,7-диаминогептан) – будучи одним из наиболее эффективных ингибиторов активности DHS, способен ингибировать рост и жизнеспособность многих типов опухолевых клеток человека. Однако вследствие высокой токсичности GC7 его клинические испытания в качестве противоопухолевого препарата были приостановлены [252, 253].

В настоящей работе было показано, что обработка Мс-А индуцирует накопление изоформы Lys^{50} -*eIF5A* с одновременным снижением активной изоформы Hyp^{50} -*eIF5A* в клетках NCCIT-R (Рис. 32Г). Это свидетельствует о том, что Мс-А ингибирует процесс гипузинирования на первой, катализируемой ферментом DHS стадии. Данный эффект может быть объяснен способностью Мс-А конкурентно ингибировать DHS вследствие сходства его структуры со структурой упомянутого выше ингибитора GC7 (оба соединения имеют в своей структуре гуанидиновый и жирнокислотные фрагменты). Более того, в структуре Мс-А присутствует фрагмент спермидина (оксиспермидина), который является субстратом фермента DHS. Таким образом, Мс-А, возможно, также способен конкурентно взаимодействовать с активным центром DHS. Мы наблюдали 50% уменьшение количества гипузинированной формы *eIF5A* (*Hyp-eIF5A*) в клетках NCCIT-R после воздействия на них Мс-А. Ранее было установлено, что гаплонедостаточность по гипузин-модифицирующим ферментам DHS или DONN была совместима с выживаемостью нормальных клеток, но значительно препятствовала злокачественной трансформации [244, 254]. Это наблюдалось также и для других факторов трансляции и рибосомальных белков [255, 256]. Данный факт может, по крайней мере, отчасти объяснить менее выраженный цитотоксический эффект Мс-А в нормальных клетках [186].

На следующей стадии антимиграторная активность Мс-А, предсказанная посредством биоинформатического анализа, проведённого с помощью программы IPA, была подтверждена при помощи функционального анализа. Было показано, что Мс-А способен ингибировать миграцию человеческих герминальных опухолевых клеток

(NCCIT-R и 2102EP), а также клеток рака простаты (PC-3 и DU145) в экспериментах *in vitro*. Кроме того, Мс-А был способен ингибировать колониеобразование предварительно обработанных им опухолевых клеток. Оба этих эффекта наблюдались в низкой концентрации вещества, которая не оказывала никакого эффекта ни на жизнеспособность клеток, ни на их способность к пролиферации. Известно, что распространение опухолевых клеток по организму и формирование метастазов обуславливают негативный прогноз лечения [257, 258]. Таким образом, Мс-А является новым перспективным природным соединением, которое с одной стороны способно преодолевать лекарственную устойчивость (как это было показано нами ранее [186]), а с другой стороны – подавлять миграцию и колониеобразование опухолевых клеток *in vitro*, что говорит в пользу того, что вещество, скорее всего, будет проявлять антиметастатическую активность *in vivo*.

Таким образом, с использованием метода глобального протеомного скрининга были идентифицированы несколько белков, регулируемых под действием Мс-А на цисплатин-устойчивые человеческие опухолевые клетки NCCIT-R. Установлено, что прямыми или косвенными молекулярными эффектами Мс-А в данных клетках являются модуляция (вероятнее всего фосфорилирование или дефосфорилирование) одной из изоформ виментина, увеличение экспрессии нескольких изоформ ароЕ и ингибирование гипузинирования eIF5A. Изменения в экспрессии белков и их изоформ, происходящие под действием Мс-А, а также последующий биоинформатический анализ полученных данных предсказал наличие антимиграторной активности у данного морского алкалоида, что было подтверждено дальнейшими экспериментами *in vitro*. Таким образом, полученные результаты говорят о том, что Мс-А может обладать способностью предотвращать инвазию и метастатическое распространение опухолевых клеток.

3.3.2. Исследование *in vitro* канцеропреventивной и цитотоксической активности гуанидиновых алкалоидов губки *Monanchora pulchra* на клетках JB6 Cl41 и HeLa

3.3.2.1. Исследование *in vitro* канцеропреventивной активности гуанидиновых алкалоидов губки *Monanchora pulchra*

Не так давно значительный интерес учёных привлекла канцеропреventивная активность морских природных соединений [259, 260]. Поэтому на следующем этапе была исследована способность Мс-А (11), а также некоторых других минорных гуанидин-содержащих алкалоидов морской губки *Monanchora pulchra* (12, 17–20, 23 и 27) предотвращать неопластическую трансформацию клеток. Была изучена канцеропреventивная *in vitro* активность восьми гуанидиновых алкалоидов, недавно

выделенных группой Макарьевой Т.Н. в Лаборатории морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН из морской губки *Monanchora pulchra*, а именно: монанхоцидина А (Мс-А, **11**) [19], монанхоцидина В (Мс-В, **12**) [20], монанхомикалина С (Мм-С, **18**) [24], птиломикалина А (Рт-А, **19**) [261], пульхранина А (Рсh-А, **20**) [22], уруподицина А (Ur-А, **23**) [25], монанхомикалина В (Мм-В, **17**) [21], и нормонанхоцидина D (пМс-D, **27**) [26]. Ранее механизм биологической активности большинства из этих соединений не изучали.

Способность гуанидиновых алкалоидов губки *Monanchora pulchra* **11, 12, 17–20, 23** и **27** предотвращать EGF-индуцируемую неопластическую трансформацию клеток была изучена на модели мышинных эпителиальных клеток JB6 P⁺ Cl41 с использованием метода мягкого агара. Метод основан на способности мышинных эпителиальных клеток JB6 P⁺ Cl41 трансформироваться в опухолевые под действием эпидермального фактора роста (EGF) в качестве промотора и образовывать колонии в мягком агаре [124, 125, 217]. Алкалоиды **11, 12, 17–20, 23** и **27** могли предотвращать трансформацию клеток JB6 P⁺ Cl41 в низких микро- и наномолярных концентрациях (Рис. 37). Примечательно, что концентрации, в которых наблюдался данный канцеропреентивный эффект (INCC₅₀) были в 3–8 раз меньше, чем соответствующие цитотоксические концентрации (Табл. 5). Наиболее высокие значения индекса IC₅₀/INCC₅₀ наблюдались для соединений Мс-А, Мс-В и Ur-А (Рис. 37). Высокое значение индекса IC₅₀/INCC₅₀ говорит о том, что соединение может обладать выраженной канцеропреентивной активностью без существенных побочных эффектов, которые могли бы быть вызваны цитотоксическим действием, производимым в тех же концентрациях, хотя данное предположение должно быть проверено в последующих экспериментах *in vivo* [262].

Таблица 5. IC₅₀ алкалоидов **11, 12, 17–20, 23** и **27** по отношению к нормальным мышинным эпителиальным клеткам JB6 P⁺ Cl41, а также человеческим опухолевым клеткам HeLa. Клетки были обработаны веществами в течение 48 ч. Цисплатин был использован в качестве положительного контроля.

No	Вещество	Цитотоксическая активность, IC ₅₀ [мкМ], 48 ч	
		Клетки HeLa	Клетки JB6 P ⁺ Cl41
11	Монанхоцидин А (Мс-А)	1.39	2.01
12	Монанхоцидин В (Мс-В)	0.58	1.36
18	Монанхомикалин С (Мм-С)	1.84	1.31
19	Птиломикалин А (Рт-А)	1.1	0.5
20	Пульхранин А (Рсh-А)	51	58
23	Уруподицин А (Ur-А)	28.7	27
17	Монанхомикалин В (Мм-В)	1.5	1.72
27	Нормонанхоцидин D (пМс-D)	2.1	5.2
	Цисплатин	4.75	30.2

Примечание: в связи с недоступностью больших количеств исследуемых природных соединений, алкалоиды Мм-В и пМс-Д были исследованы в ограниченном числе экспериментов. Поэтому эти соединения не были исследованы на способность ингибировать злокачественную трансформацию клеток JB6 P⁺ Cl41.

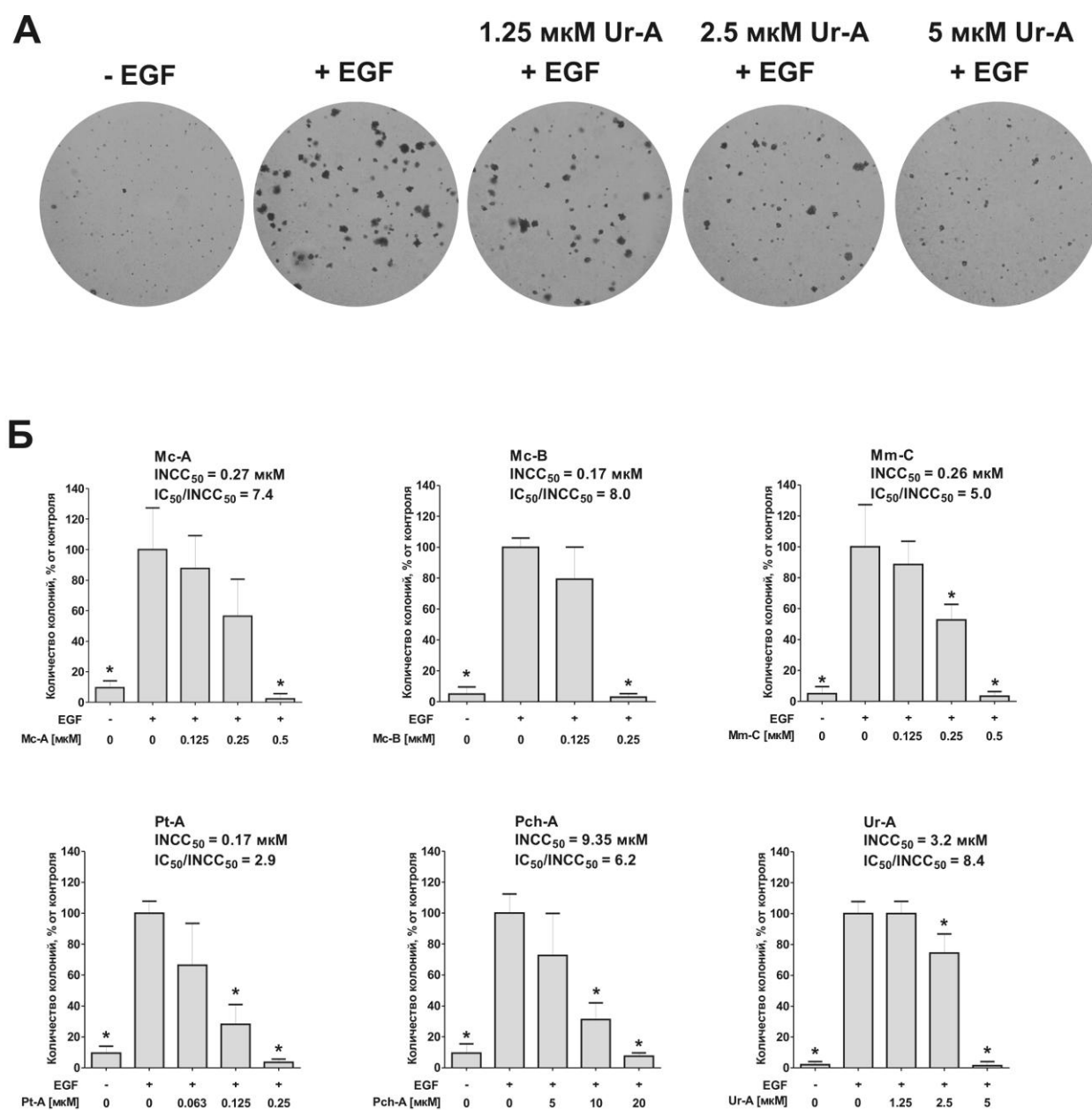


Рисунок 37. Ингибирование гуанидиновыми алкалоидами **11**, **12**, **18–20** и **23** EGF-индуцированной опухолевой трансформации мышинных эпителиальных клеток JB6 P⁺ Cl41. (А) Репрезентативные фотографии колоний клеток JB6 P⁺ Cl41, обработанных EGF или совместно EGF и Ur-A (**23**). Наблюдалось уменьшение числа и размера колоний трансформированных клеток под действием Ur-A. (Б) Ингибирование злокачественной трансформации клеток JB6 P⁺ Cl41 алкалоидами **11**, **12**, **18–20** и **23** в зависимости от

концентрации. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p < 0.05$, t-тест Стьюдента). Индекс $IC_{50}/INCC_{50}$ был рассчитан с использованием значений IC_{50} соответствующих приведённым в таблице 5.

3.3.2.2. Исследование эффекта алкалоидов **11**, **12**, **18-20** и **23** на MAPK/AP-1 сигналинг

Известно, что злокачественная трансформация клеток JB6 P⁺ Cl41 включает в себя активацию фактора AP-1 (activator protein-1) [127, 207, 208], в то время как блокирование транскрипционной активности AP-1 может вызывать ингибирование EGF-индуцируемой неопластической трансформации этих клеток [127-129]. Протеиновые киназы JNK1/2 и ERK1/2 являются хорошо известными регуляторами процесса активации AP-1. JNK1/2 и ERK1/2 располагаются вверху сигнального каскада и стимулируют его посредством активации экспрессии и стабилизации белков Fos и Jun, являющихся частью фактора AP-1 [263-265]. Поэтому на следующем этапе был исследован эффект морских алкалоидов **11**, **12**, **18-20** и **23** на MAPK/AP-1 сигналинг с использованием модели клеток JB6-Luc AP-1, стабильно экспрессирующих люциферазный репортерный ген, контролируемый AP-1 ДНК-связывающей последовательностью [191, 210, 266].

Сначала был исследован эффект алкалоидов **11**, **12**, **18-20** и **23** на транскрипционную активность фактора AP-1 (Рис. 38). Пульхранин А (**20**) ожидаемо показал способность подавлять AP-1-зависимую транскрипционную активность в нецитотоксических концентрациях, по крайней мере в 70 раз меньше, чем IC_{50} (Рис. 38, табл. 5). Примечательно, что в клетках, обработанных уруподином А (**23**) уменьшение AP-1-зависимой транскрипционной активности происходило одновременно с уменьшением жизнеспособности клеток (Рис. 38). На основании этого был сделан вывод о том, что уруподин А (**23**) не оказывает влияния на AP-1-зависимую транскрипционную активность в живых клетках (Рис. 38). Весьма неожиданно, что птиломикалин А-подобные соединения **11**, **12**, **18** и **19** вызывали активацию фактора AP-1 в концентрациях, предшествующих цитотоксическим (через 12 ч обработки клеток веществами). Следовательно, нами был сделан вывод о том, что подавление активности фактора AP-1 не является механизмом ингибирования EGF-индуцируемой злокачественной трансформации клеток для веществ **11**, **12**, **18**, **19** и **23** (хотя оно может играть роль в случае канцеропреентивной активности пульхранина А (**20**)) [262].

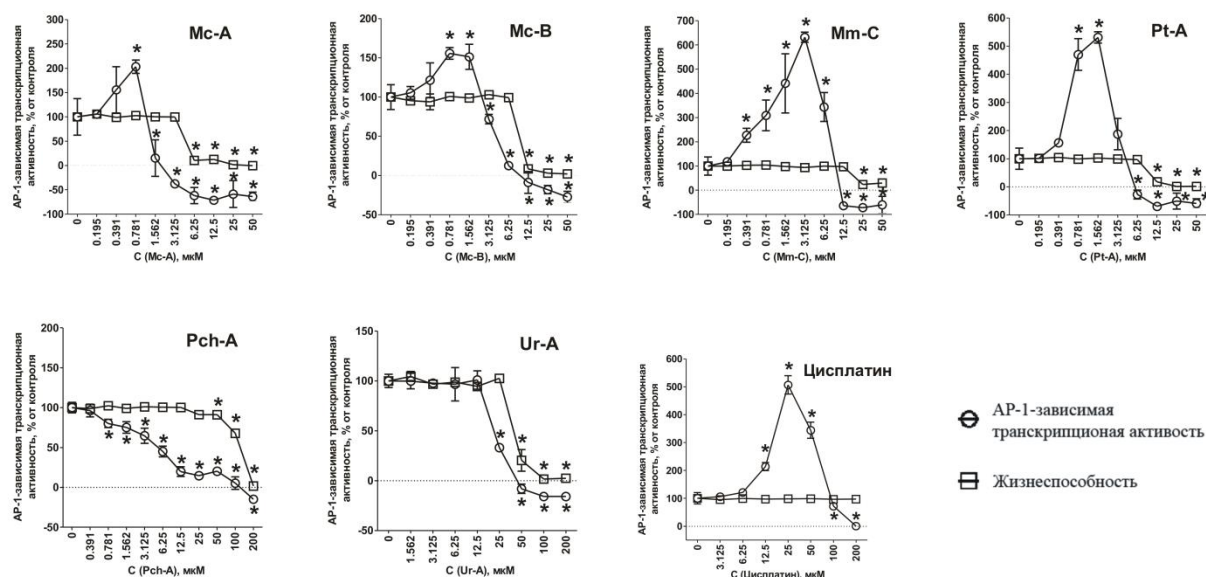


Рисунок 38. Влияние гуанидиновых алкалоидов **11**, **12**, **18-20** и **23** на AP-1-зависимую транскрипционную активность и жизнеспособность клеток JB6-Luc AP-1. Клетки были обработаны веществами в течение 12 ч. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

В то же время фактор транскрипции AP-1, помимо злокачественной трансформации клеток, может быть вовлечен в регулирование других процессов, таких как программируемая клеточная смерть или подавление роста опухолевых клеток как *in vitro* так и *in vivo* [263, 265, 267]. Ранее было показано, что некоторые противоопухолевые цитотоксические и канцеропреентивные природные соединения, выделенные как из наземных (противоопухолевый препарат винбластин [268, 269], канцеропреентивные флавоноиды камферол и генистеин [270], противовоспалительный препарат толфенамовая кислота [271]), так и из морских источников (алкалоиды 3- и 10-бромфаскаплизин [272], 3-деметилубихинон Q2 и его синтетические аналоги [273, 274], обладающий канцеропреентивными свойствами тритерпеноид дактилон [217]), а также вещества, повреждающие ДНК [275], способны активировать транскрипционную активность фактора AP-1. Было сделано предположение о том, что фактор AP-1 может быть вовлечён в реализацию цитотоксического эффекта исследуемых гуанидиновых алкалоидов, по крайней мере соединений **11**, **12**, **18** и **19** (Рис. 38). В подтверждении данного предположения говорил и тот факт, что эффекты алкалоидов **11**, **12**, **18** и **19** на активность фактора AP-1 были сходны с эффектом цисплатина, который также вызывал активацию AP-1 в суб-цитотоксических концентрациях (Рис. 38). Гуанидиновые алкалоиды **20** и **23**, которые не активировали данный фактор (Рис. 38), обладали значительно более слабой

цитотоксической активностью (Табл. 5). Данный факт также говорил в пользу процитотоксической роли активации фактора AP-1 в клеточном ответе на обработку соединениями **11**, **12**, **18** и **19**.

Далее, мы исследовали эффект соединений на киназы JNK1/2 и ERK1/2 – регуляторы активности AP-1 в клетках JB6 Cl41, расположенные вверху сигнального каскада (Рис. 39). Было установлено, что все соединения, за исключением пульхранина А (**20**) в концентрациях близких к IC₅₀, были способны вызывать активацию (фосфорилирование) киназ JNK1/2 и ERK1/2. Пульхранин А не вызывал активирование ERK1/2 (Рис. 39). На основании этих наблюдений мы предположили, что киназы JNK1/2 и ERK1/2 играют роль в клеточном ответе на обработку веществами **11**, **12**, **17–20**, **23** и **27** (за исключением ERK1/2 в случае пульхранина А (**20**)) [262].

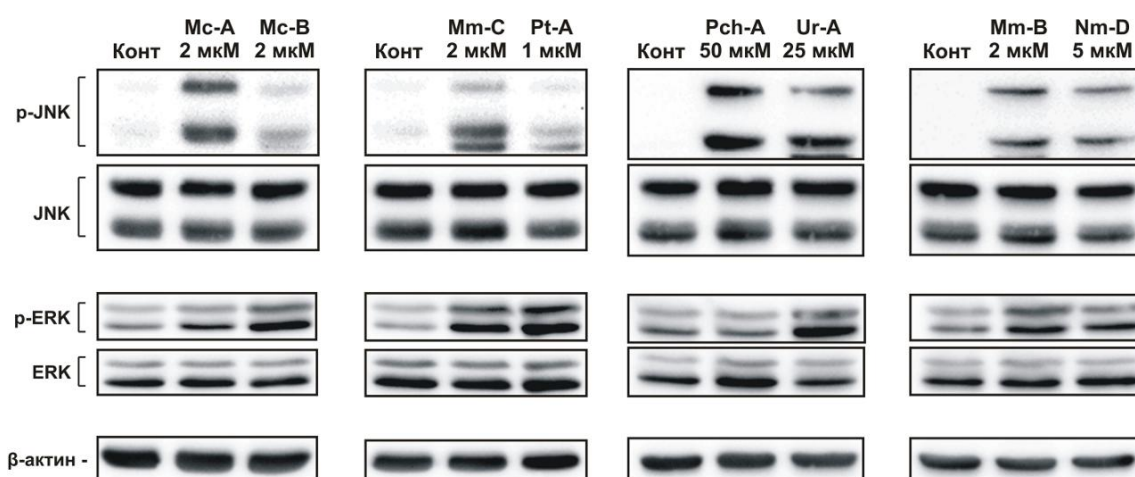


Рисунок 39. Активирование фосфорилирования киназ JNK1/2 и ERK1/2 в клетках JB6 P⁺ Cl41, обработанных алкалоидами **11**, **12**, **17–20**, **23** и **27** в концентрациях близких к IC₅₀ в течение 48 ч

Для того чтобы доказать важность киназы JNK1/2 для реализации цитотоксического ответа исследуемых алкалоидов, был выполнен эксперимент по совместной обработке клеток алкалоидами (**11**, **12**, **17–20**, **23** и **27**) и SP600125 – известным ингибитором JNK1/2 (Рис. 40). Однако ингибитор SP600125 в индивидуальном виде проявляет цитотоксическую активность по отношению к клеткам JB6 P⁺ Cl41. Поэтому способность SP600125 ингибировать (антагонизировать) цитотоксическую активность исследуемых алкалоидов была исследована с помощью метода Чоу-Талалая [178]. Было показано, что данный ингибитор способен антагонизировать цитотоксическую активность соединений **11**, **12**, **17–20** и **27**, но не уруподина А (**23**) (Рис. 40), несмотря на

то, что активация JNK1/2 наблюдалась при обработке клеток урупоцидином А (23) (Рис. 39). Таким образом, киназа JNK1/2 является важным белком, вовлеченным в передачу индуцируемого исследуемыми алкалоидами сигнала, направленного на стимуляцию клеточной смерти [262].

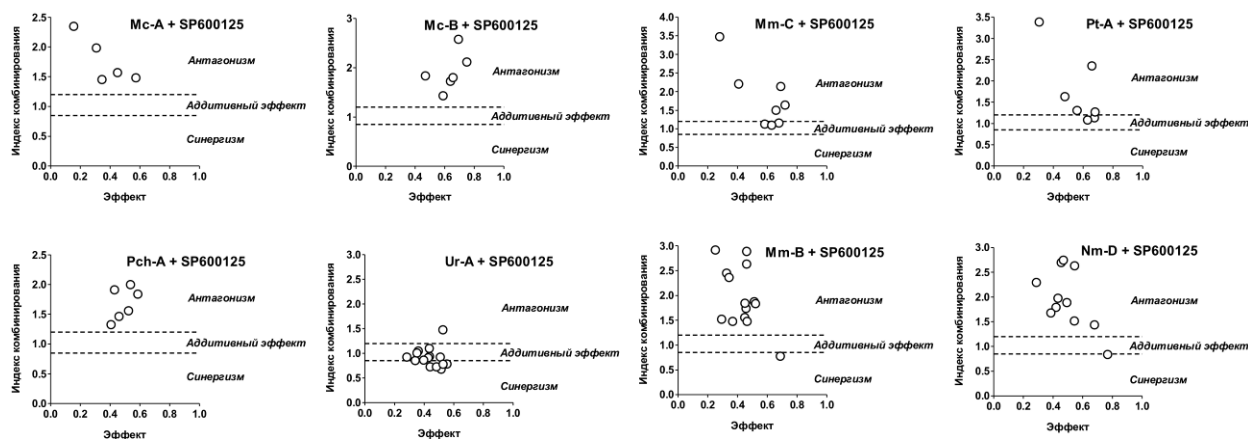


Рисунок 40. Эффект SP600125 (ингибитор активности JNK1/2) на цитотоксическую активность алкалоидов 11, 12, 17–20, 23 и 27 по отношению к клеткам JB6 P⁺ Cl41. Эффект на жизнеспособность был исследован с помощью МТТ-теста и проанализирован по методу Чоу-Талалая. Клетки были обработаны индивидуальными веществами или их комбинациями в различных молярных соотношениях в течение 48 ч. Индекс комбинирования был рассчитан при помощи программы CompuSyn 1.0. Молярное соотношение исследуемых алкалоидов и SP600125 приведено в таблице 6.

Таблица 6. Индекс комбинирования и эффекты комбинаций исследуемых веществ с SP600125. Клетки JB6 P⁺ Cl41 были обработаны индивидуальными веществами или их комбинациями в течение 48 ч и значения их цитотоксичности (эффекты) измерены с помощью МТТ-теста. Индексы комбинирования (CI) были рассчитаны с помощью программы CompuSyn 1.0

С(Мс-А), мкМ	С(SP600125), мкМ	Эффект	CI
0.25	20.0	0.155	2.34884
0.5	20.0	0.345	1.45284
1.0	20.0	0.573	1.48387
0.25	40.0	0.307	1.98479
0.5	40.0	0.45	1.57143
С(Мс-В), мкМ	С(SP600125), мкМ	Эффект	CI
0.75	20.0	0.47	1.83752
1.5	20.0	0.638	1.72573
3.0	20.0	0.693	2.57508
0.75	40.0	0.589	1.4313
1.5	40.0	0.656	1.79942

3.0	40.0	0.749	2.11484
C(Mm-C), мкМ	C(SP600125), мкМ	Эффект	CI
0.75	20.0	0.28	3.4779
1.5	20.0	0.583	1.13072
3.0	20.0	0.678	1.15795
6.0	20.0	0.719	1.64088
0.75	40.0	0.407	2.20717
1.5	40.0	0.629	1.10073
3.0	40.0	0.658	1.49944
6.0	40.0	0.691	2.1381
C(Pt-A), мкМ	C(SP600125), мкМ	Эффект	CI
0.5	20.0	0.304	3.3885
1.0	20.0	0.559	1.30904
2.0	20.0	0.676	1.13367
4.0	20.0	0.658	2.35328
0.5	40.0	0.477	1.63314
1.0	40.0	0.63	1.08641
2.0	40.0	0.681	1.27275
C(Mm-B), мкМ	C(SP600125), мкМ	Эффект	CI
0.375	20.0	0.293	1.52167
0.75	20.0	0.367	1.47834
1.5	20.0	0.448	1.55816
3.0	20.0	0.461	2.63426
0.375	40.0	0.251	2.91645
0.75	40.0	0.326	2.45096
1.5	40.0	0.457	1.73874
3.0	40.0	0.461	2.88906
0.75	20.0	0.343	2.36287
1.5	20.0	0.464	1.48077
3.0	20.0	0.512	1.87456
6.0	20.0	0.687	0.77791
0.75	40.0	0.293	4.5777
1.5	40.0	0.45	1.84516
3.0	40.0	0.521	1.83676
C(nMc-D), мкМ	C(SP600125), мкМ	Эффект	CI
0.625	20.0	0.287	2.29674
1.25	20.0	0.42	1.79187
2.5	20.0	0.454	2.69936
5.0	20.0	0.678	1.43814
0.625	40.0	0.384	1.67978
1.25	40.0	0.433	1.97571
2.5	40.0	0.469	2.74596
5.0	40.0	0.767	0.83689
1.25	20.0	0.492	1.88748
2.5	40.0	0.493	3.74941
1.25	40.0	0.543	1.51716
2.5	40.0	0.545	2.63287
C(Ur-A), мкМ	C(SP600125), мкМ	Эффект	CI
3.125	20.0	0.283	0.92335
6.25	20.0	0.339	0.8535
12.5	20.0	0.397	0.86526
25.0	20.0	0.434	1.09976
3.125	40.0	0.352	1.00969
6.25	40.0	0.441	0.7273
12.5	40.0	0.483	0.72863
25.0	40.0	0.528	0.782
6.25	20.0	0.36	1.0469
12.5	20.0	0.435	0.93691
25.0	20.0	0.509	0.92798

50.0	20.0	0.527	1.47783
6.25	40.0	0.427	0.91371
12.5	40.0	0.515	0.6809
25.0	40.0	0.554	0.78736
C(Pch-A), мкМ	C(SP600125), мкМ	Эффект	CI
12.5	20.0	0.406	1.32739
25.0	20.0	0.429	1.9124
50.0	20.0	0.537	1.99839
12.5	40.0	0.459	1.46527
25.0	40.0	0.524	1.55852
50.0	40.0	0.586	1.83779

3.3.2.3. Исследование эффекта гуанидиновых алкалоидов на транскрипционную активность белка p53

Известно, что около 50% известных опухолей несут мутантный ген P53 и поэтому экспрессируют мутантный белок p53 (либо вообще не экспрессируют p53), не обладающий оригинальной способностью подавлять перерождение нормальных клеток в опухолевые, а также подавлять развитие последних [109]. Поэтому соединения, обладающие способностью индуцировать апоптоз (или иные формы программируемой клеточной смерти) независимо от активности белка p53, могут иметь большой потенциал в терапии p53-дефектных опухолей [109]. Для того чтобы изучить роль белка p53 в вызываемом исследуемыми алкалоидами цитотоксическом эффекте, были использованы клетки JB6-Luc p53 (PG-13), стабильно экспрессирующие люциферазный репортерный ген, контролируемый p53 ДНК-связывающей последовательностью [191, 210, 266]. Было обнаружено, что обработка клеток JB6-Luc p53 соединениями **11**, **12**, **18–20** и **23** не приводит к активации транскрипционной активности p53 (Рис. 41). Поэтому был сделан вывод, что цитотоксический эффект данных алкалоидов реализуется независимо от активности белка p53. При действии цисплатина на клетки точно так же не наблюдалось активации транскрипционной активности p53 (Рис. 41). Это наблюдение хорошо согласовывалось с опубликованными ранее сообщениями о способности цисплатина индуцировать p53-независимый апоптоз в человеческих фибробластах, а также в опухолевых клетках [257, 276-278]. Таким образом, полученные данные говорят о том, что активный белок p53 не является необходимым для успешной реализации цитотоксического эффекта гуанидиновых алкалоидов **11**, **12**, **18–20** и **23**, а также о том, что данные соединения могут быть эффективными как *in vitro*, так и *in vivo* при химиотерапии опухолей, экспрессирующих мутантный белок p53 [262].

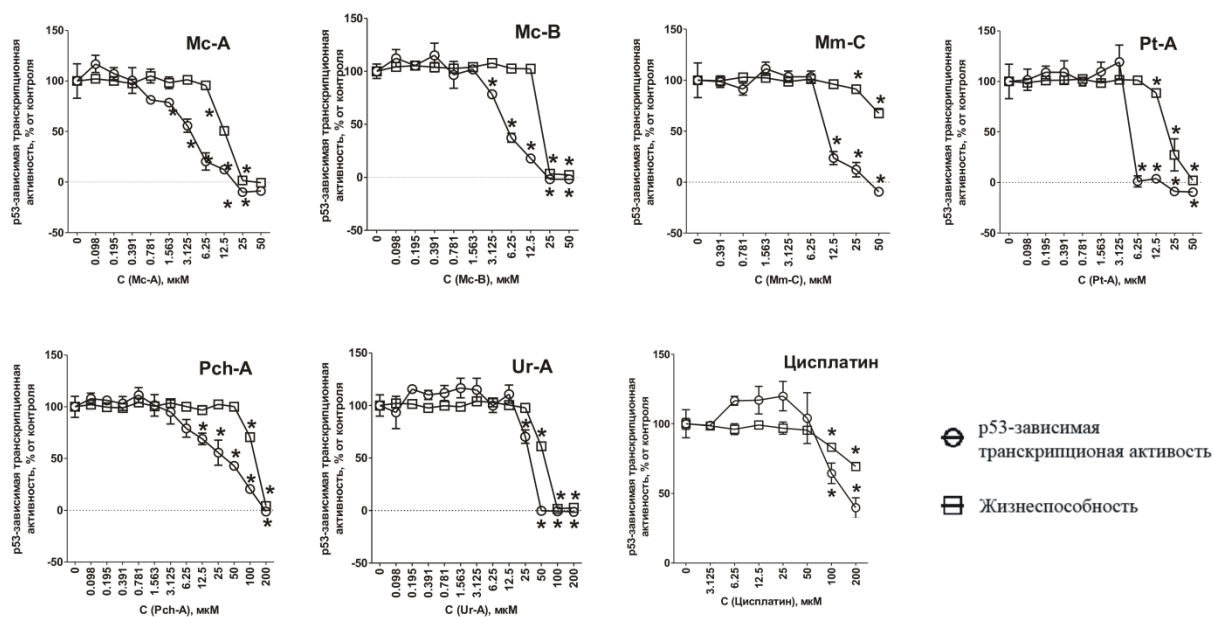


Рисунок 41. Влияние гуанидиновых алкалоидов **11**, **12**, **18–20** и **23** на p53-зависимую транскрипционную активность и жизнеспособность клеток JB6-Luc p53 (PG-13). Клетки были обработаны веществами в течение 12 ч. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.3.2.4. Эффект алкалоидов **11**, **12**, **17–20**, **23** и **27** на индукцию программируемой клеточной смерти, а также ареста клеточного цикла опухолевых клеток HeLa

На следующем этапе цитотоксические эффекты исследуемых гуанидиновых алкалоидов были подтверждены на опухолевых клетках человека HeLa (рак шейки матки). Птиломикалин А-подобные соединения **11**, **12**, **18** и **19** показали схожую цитотоксическую активность, при этом монанхоцидин В (**12**) был наиболее активен по отношению к человеческим опухолевым клеткам (Табл. 5). Все исследуемые соединения индуцировали фрагментацию ДНК опухолевых клеток, свидетельствующую об индукции программируемой клеточной смерти (Рис. 42) [262].

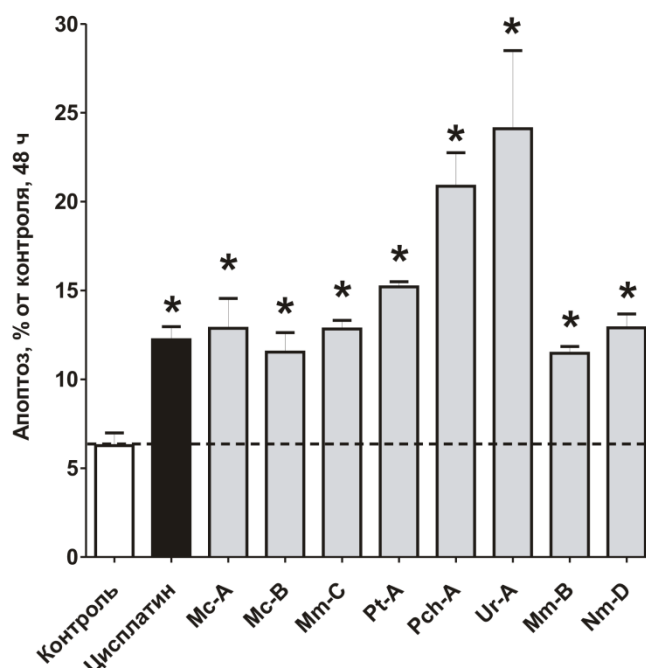


Рисунок 42. Результаты исследования методом проточной цитометрии клеток HeLa, обработанных алкалоидами **11**, **12**, **17–20**, **23** и **27** в концентрациях IC_{50} в течение 48 ч. Окрашивание ДНК с помощью PI было использовано для определения апоптотических (содержащих фрагментированную ДНК) клеток. Клетки, обработанные 20 мкМ цисплатина в течение 48 ч, были использованы в качестве положительного контроля. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Хотя большее количество исследуемых гуанидиновых алкалоидов в концентрациях IC_{50} активировали каспазу-3 и -7 (Рис. 43), их эффекты были значительно слабее эффекта, производимого классическим химиотерапевтическим препаратом цисплатином (Рис. 43). Эти данные согласуются с высказанными ранее предположениями о неапоптотическом характере клеточной смерти, индуцируемой монанхоцидином А в опухолевых клетках NCCIT-R [186], а также свидетельствуют в пользу того, что структурно близкие соединения **11**, **12**, **17-19** и **27**, а также структурно от них отличающиеся пульхранин А (**20**) и уруподицин А (**23**) могут иметь схожие механизмы цитотоксического действия.

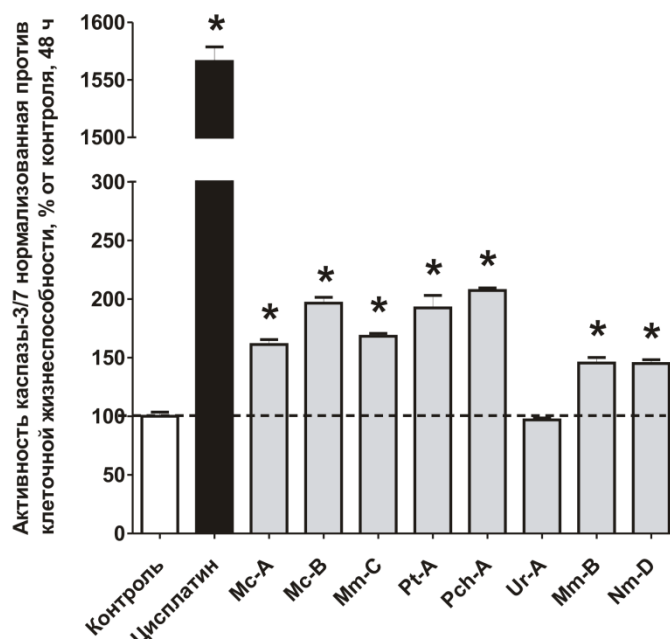


Рисунок 43. Результаты исследования активности каспазы-3/7, в клетках HeLa, обработанных алкалоидами **11**, **12**, **17–20**, **23** и **27** в концентрациях IC₅₀ в течение 48 ч. Измерение проводили с помощью набора Caspase-Glo® 3/7 Assay Kit (Promega). Активность каспазы-3/7 была нормализована к количеству живых клеток, определённого в свою очередь с помощью МТТ-теста. Клетки, обработанные 20 мкМ цисплатина в течение 48 ч, были использованы как положительный контроль. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

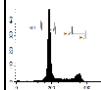
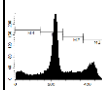
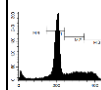
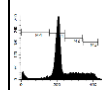
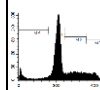
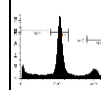
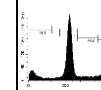
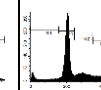
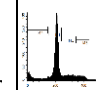
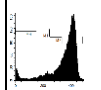
Примечательно, что при обработке клеток HeLa урупочином А (**23**) не наблюдалось какого-либо изменения активации каспаз-3/7 (Рис. 43), хотя доля клеток, содержащих фрагментированную ДНК, была довольно большой (Рис. 42). Данный факт свидетельствует о том, что каспаза-зависимый апоптоз не вовлечен в клеточный ответ на обработку урупочином А (**23**). В то же время в случае монанхоцидина А (**11**) было показано, что каспазный путь играет определённую (но не самую важную) роль [186].

Важно отметить, что нормонанхоцидин D (**27**), в отличие от соединений **11**, **12**, **17–19**, не содержит спермидинового или окиспермидинового фрагмента, однако все же обладает сравнимой с ними цитотоксической активностью (Табл. 5, рис. 42, 43). Кроме того, уровни активности соединений, содержащих спермидиновый или окиспермидиновый фрагменты, также существенно не различаются между собой (Табл. 5, рис. 42, 43). Следовательно, этот фрагмент структуры не является важным или необходимым для реализации цитотоксического эффекта птилиномикалин А-подобных соединений. Ранее было предположено, что наличие спермидинового фрагмента в молекуле таких соединений приводит к ингибированию процесса гипузинирования белка

eIF5A, что в свою очередь приводит к подавлению роста и жизнеспособности опухолевых клеток [234]. Представленные в настоящем разделе диссертации данные свидетельствуют о том, что последнее предположение, скорее всего, было ошибочным.

Кроме того, мы исследовали эффекты соединений **11**, **12**, **17–20**, **23** и **27** на прогрессию клеточного цикла опухолевых клеток HeLa (Табл. 7). Все приломикалин А-подобные соединения **11**, **12**, **17–19** и **27** были способны индуцировать остановку клеточного цикла в S-фазе, в то время как уруподицин А (**23**), будучи структурно-отличным соединением, ингибировал прогрессию клеточного цикла в G2/M-фазе. Пульхранин А (**20**) не оказывал заметного влияния на прогрессию клеточного цикла (Табл. 7) [262].

Таблица 7. Эффект алкалоидов **11**, **12**, **17–20**, **23** и **27** на прогрессию клеточного цикла опухолевых клеток HeLa. Клетки были обработаны веществами в концентрациях IC₅₀ в течение 48 ч. Цисплатин был использован в качестве положительного контроля

	Контроль	11 (Mc-A)	12 (Mc-B)	18 (Mm-C)	19 (Pt-A)	20 (Pch-A)	23 (Ur-A)	17 (Mm-B)	27 (Nm-D)	Цисплатин
G1	69.5±1	62±0.7	63.8±1.5	65.6±1.8	65.4±0.4	73±1.5	65.3±3	66.3±0.9	71.4±0.1	7±0.6
S	13.8±0.4	17±0.7*	21±0.1*	21.5±1.4*	22.6±2*	11.2±1.5	10.6±0.8	23.7±1.2*	17.6±0.2*	15.6±3.5
G2/M	16.3±0.7	21.4±1.3*	14.9±0.8	12.1±2.1	12.2±1.5	15.7±0.8	23.7±0.5*	10.3±1.1	10.5±0.8	77.6±3.7*
Араст клеточного цикла		S, G2/M	S	S	S	Нет эффекта	G2/M	S	S	G2/M
Гисто- грамма										

* – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.3.2.5. Обсуждение результатов исследования *in vitro* канцеропреентивной и цитотоксической активности гуанидиновых алкалоидов губки *Monanchora pulchra*

Было показано, что алкалоиды **11**, **12**, **18–20** и **23** способны ингибировать EGF-индуцируемую неопластическую трансформацию клеток JB6 P⁺ Cl41. Монанхоцидин В (**12**) и уруподицин А (**23**), являясь соответственно наиболее и наименее цитотоксическими, показали наибольшее и наименьшие значение индекса IC₅₀/INCC₅₀, что говорит о перспективных канцеропреентивных свойствах этих алкалоидов. Способность пульхранина А (**20**) подавлять неопластическую трансформацию *in vitro* могла быть связана с его способностью ингибировать активность ядерного фактора AP-1.

В то же время для остальных исследуемых соединений механизм реализации канцеропреентивной активности был отличным и не был связан с ингибированием фактора AP-1.

Все соединения, кроме пульхранина А (20), были способны индуцировать арест клеточного цикла, а также фрагментацию ДНК опухолевых клеток (признак программируемой клеточной смерти, которая, очевидно, не носит апоптотический характер). Птиломикалин А-подобные соединения **11**, **12**, **18** и **19** активировали киназы JNK1/2 и ERK1/2, а также транскрипционную активность ядерного фактора AP-1, индуцируя p53-независимую программируемую клеточную смерть (Табл. 8, рис. 44).

Пульхранин А (20) активировал киназу JNK1/2, что также вело к p53-независимой клеточной смерти. Однако, в отличие от птиломикалин А-подобных соединений, обработка клеток пульхранином А (20) не приводила к активации киназы ERK1/2. Более того, пульхранин А (20) показал мощную ингибирующую активность по отношению к фактору AP-1 (Табл. 8). Эта активность проявлялась в концентрациях, намного меньших IC₅₀ (Табл. 8, рис. 44).

Другой структурно отличающийся алкалоид урупоедин А (23) индуцировал фосфорилирование киназ JNK1/2 и ERK1/2. В то же время, в отличие от других соединений, наблюдаемая активация JNK1/2 не была важна для реализации цитотоксической активности урупоедина А (23). Кроме того, в отличие от других соединений, p53-независимая клеточная смерть, индуцируемая урупоедином А (23), не сопровождалась изменением AP-1-зависимой транскрипционной активности или активности каспаз-3/7. Эти данные говорят о том, что механизм цитотоксического действия урупоедина А (23) отличается от механизмов действия других исследуемых соединений (Табл. 8, рис. 44) [262].

Таблица 8. Суммарные эффекты алкалоидов **11**, **12**, **17–20**, **23** и **27**. Таблица составлена на основе описанных выше данных

	11 (Mc-A)	12 (Mc-B)	18 (Mm-C)	19 (Pt-A)	20 (Pch-A)	23 (Ur-A)	17 (Mm-B)	27 (Nm-D)	Цисплатин
Фрагментация ДНК при IC ₅₀	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Активация каспазы-3/7 при IC ₅₀	↑	↑	↑	↑	↑↑	нет эффекта	↑	↑	↑↑↑
Арест клеточного цикла	S, G2/M	S	S	S	нет эффекта	G2/M	S	S	G2/M
Эффект на активность AP-1	↑	↑	↑	↑	↓	нет эффекта	-	-	↑
Эффект на фосфорилирование ERK1/2	↑	↑	↑	↑	нет эффекта	↑	↑	↑	-
Эффект на фосфорилирование JNK1/2	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-
Эффект SP600125 (ингибитор JNK1/2) на цитотоксическую активность веществ	↓	↓	↓	↓	↓	нет эффекта	↓	↓	-
Эффект на Активность p53	нет эффекта	нет эффекта	нет эффекта	нет эффекта	нет эффекта	нет эффекта	нет эффекта	нет эффекта	нет эффекта

“↑” – активация в 1~2 раза по сравнению с контролем; “↑↑” – активация в 2~3 раза по сравнению с контролем; “↑↑↑” – активация в более чем в 3 раза по сравнению с контролем; “↓” – ингибирование; “нет эффекта” – нет эффекта; “-” – соединение не было исследовано в данном эксперименте

Таким образом, полученные результаты говорят о том, что гуанидиновые алкалоиды морской губки *Monanchora pulchra* могут иметь потенциал в качестве химиотерапевтических агентов, способных ингибировать формирование, рост и жизнеспособность опухолевых клеток человека, а также предотвращать их распространение в другие органы и ткани организма. Однако данное предположение должно быть проверено в экспериментах *in vivo*. Настоящая работа является первым исследованием молекулярных механизмов биологической активности монанхоцидина В (Mc-B, **12**), монанхомикалина С (Mm-C, **18**), птиломикалина А (Pt-A, **19**), пульхранина А (Pch-A, **20**), урупцидина А (Ur-A, **23**), монанхомикалина В (Mm-B, **17**), и нормонанхоцидина D (Nm-D, **27**) в клетках млекопитающих [262].

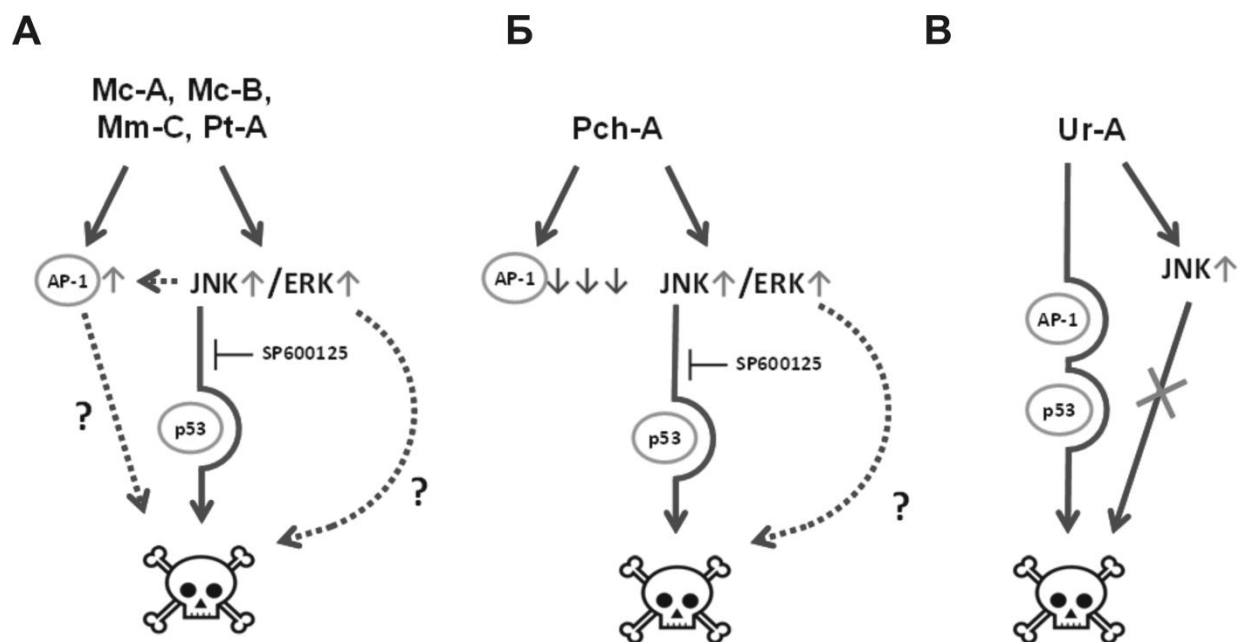


Рисунок 44. Суммарный механизм цитотоксического действия исследованных алкалоидов на клетки JB6 Cl41

3.4. Исследование противоопухолевой активности тритерпенового гликозида фрондозид А (FrA) из кукумарии *Cucumaria okhotensis*

3.4.1. Исследование активности FrA на моделях рака простаты

3.4.1.1. Исследование эффекта FrA на жизнеспособность, способность к пролиферации, а также колониобразование клеток рака простаты

Цитотоксическая активность FrA (**30**) была исследована на линиях клеток рака простаты человека PC-3, DU145, VCaP, 22Rv1 и LNCaP, а также нормальных неопухолевых человеческих клетках линий MRC-9, HEK 293T и HUVEC с помощью МТТ-теста (Рис. 45). Клетки PC-3 и DU145, являясь андроген-независимыми, были одинаково чувствительны к действию FrA, в то время как андроген-зависимые клетки линии LNCaP были более чувствительны к действию вещества. Примечательно, что линии клеток рака простаты 22Rv1 и VCaP, обе экспрессирующие альтернативный вариант сплайсинга андрогенного рецептора V7 (AR-V7) и поэтому являющиеся устойчивыми к действию препаратов энзалутамида и абиратерона, были также чувствительны к действию FrA. Чувствительность этих двух клеточных линий была сравнима с чувствительностью клеток LNCaP. Важно отметить, что цитотоксический эффект FrA на нормальные клетки человека был существенно меньше, чем на клетки рака простаты (Рис. 45) [279].

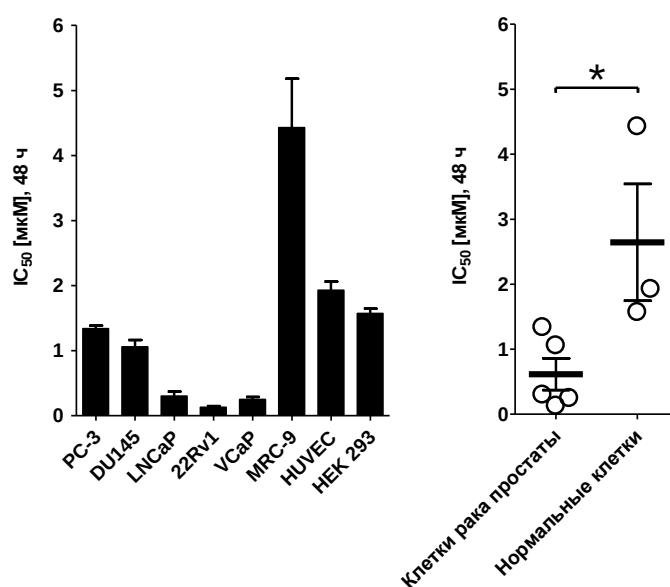


Рисунок 45. Эффект FrA на жизнеспособность пяти линий клеток рака простаты, а также нормальных неопухолевых клеток человека. Эффекты были измерены с использованием МТТ-теста после 48 ч обработки клеток веществом. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, с помощью метода Чоу-Талалая был исследован эффект FrA в комбинации с доцетакселем – химиотерапевтическим препаратом, используемым при лечении рака простаты. При этом были показаны аддитивный и антагонистический эффект комбинированной обработки клеток (Рис. 46).

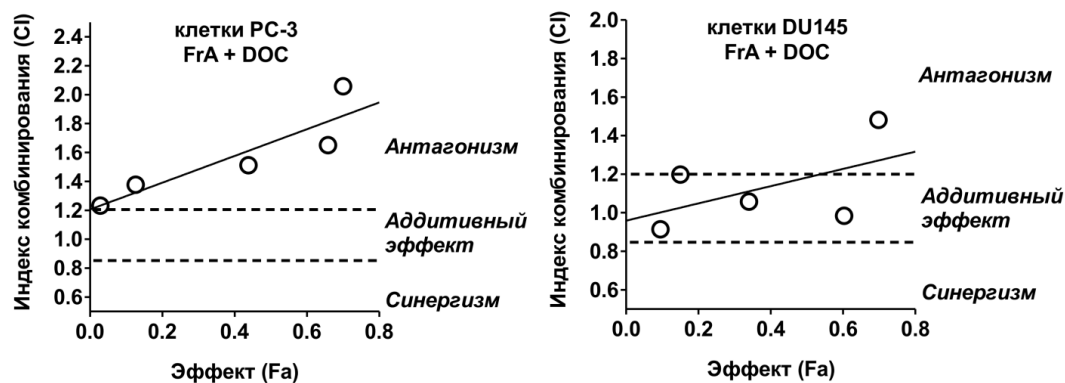


Рисунок 46. Исследование цитотоксического эффекта комбинации FrA и доцетакселя (DOC) на опухолевые клетки PC-3 и DU145. Клетки были обработаны комбинацией FrA и DOC или индивидуальными веществами в течение 48 ч. Индекс комбинирования был рассчитан с использованием программного обеспечения CompuSyn 1.0. на основе данных о жизнеспособности клеток, полученных с помощью МТТ-теста

Антипролиферативный время- и дозозависимый эффект FrA был исследован с использованием окрашивания клеток трипановым синим. Было установлено, что андроген-зависимые клетки LNCaP являются более чувствительными к действию FrA, нежели андроген-независимые клетки PC-3 и DU145 (Рис. 47) [279].

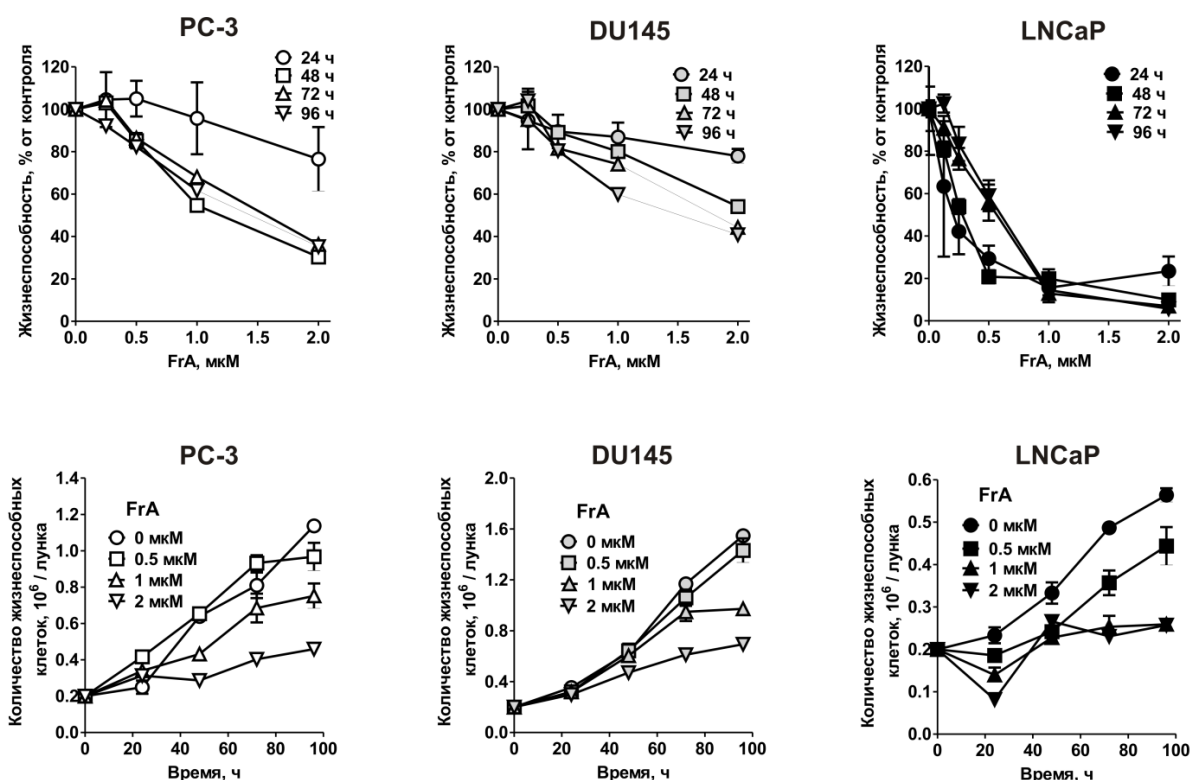


Рисунок 47. Эффект FrA на пролиферативную активность трёх линий клеток рака простаты человека. Эффекты были измерены методом автоматического счета клеток с использованием окрашивания трипановым синим через 24 ч, 48 ч, 72 ч или 96 ч обработки клеток веществом

Кроме того, в нецитотоксических концентрациях FrA был способен ингибировать формирование колоний клеток (из единичной жизнеспособной клетки) PC-3, DU145 и 22Rv1 после обработки клеток в течение 48 ч (Рис. 48). Следует отметить, что клетки VCaP and LNCaP (как обработанные, так и необработанные FrA) не образовывали колоний [279].

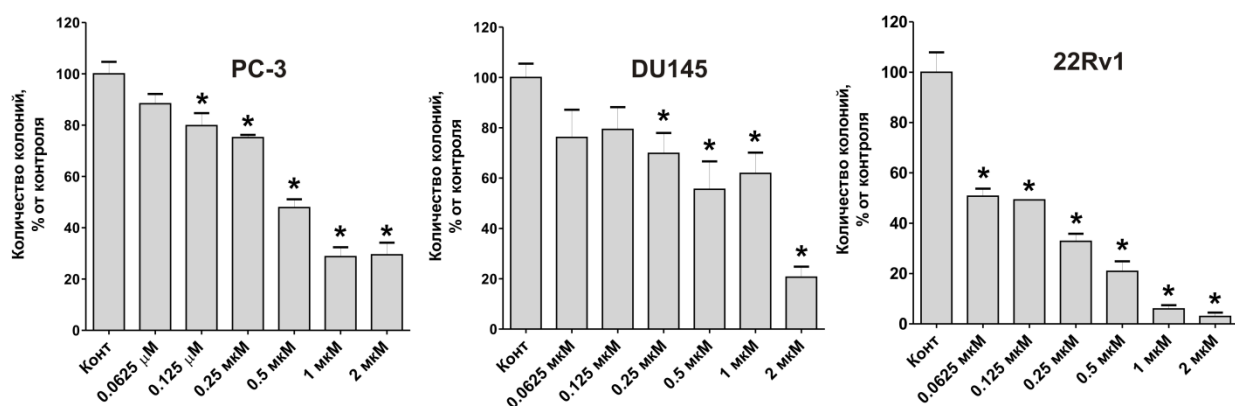


Рисунок 48. Ингибирование колониобразования опухолевых клеток. Клетки были обработаны FrA в указанных концентрациях в течение 48 ч, затем 100 живых клеток были помещены в лунки 6-луночного планшета и инкубированы в течение 10 дней. После чего клеточные колонии были зафиксированы, окрашены и подсчитаны невооруженным глазом. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Целью настоящего исследования было изучение активности FrA на клетках рака простаты, устойчивых к кастрации (депривации андрогенов). Поэтому последующие эксперименты были проведены преимущественно с использованием более агрессивных клеток PC-3 и DU145, которые являются нечувствительными к депривации андрогенов (кастрации) и имеют средний (DU145) или высокий (PC-3) метастатический потенциал [280]. На основании экспериментов по исследованию цитотоксической активности для дальнейших экспериментов были выбраны концентрации FrA в диапазоне 0.5–2 мкМ [279].

3.4.1.2. Эффект FrA на прогрессию клеточного цикла и индукцию апоптоза клеток рака простаты

Была исследована способность FrA ингибировать прогрессию клеточного цикла клеток рака простаты человека. Примечательно, что FrA проявлял различный эффект на разные линии опухолевых клеток. Так, в клетках PC-3, обработанных 0.5 мкМ FrA в течение 48 ч, была выявлена остановка клеточного цикла в фазе G2/M, в то время как в клетках DU145 и LNCaP, обработанных субцитотоксическими дозами FrA (2 мкМ и 0.5 мкМ, соответственно), не было выявлено каких-либо изменений в распределении клеток по фазам клеточного цикла (Рис. 49А) [279].

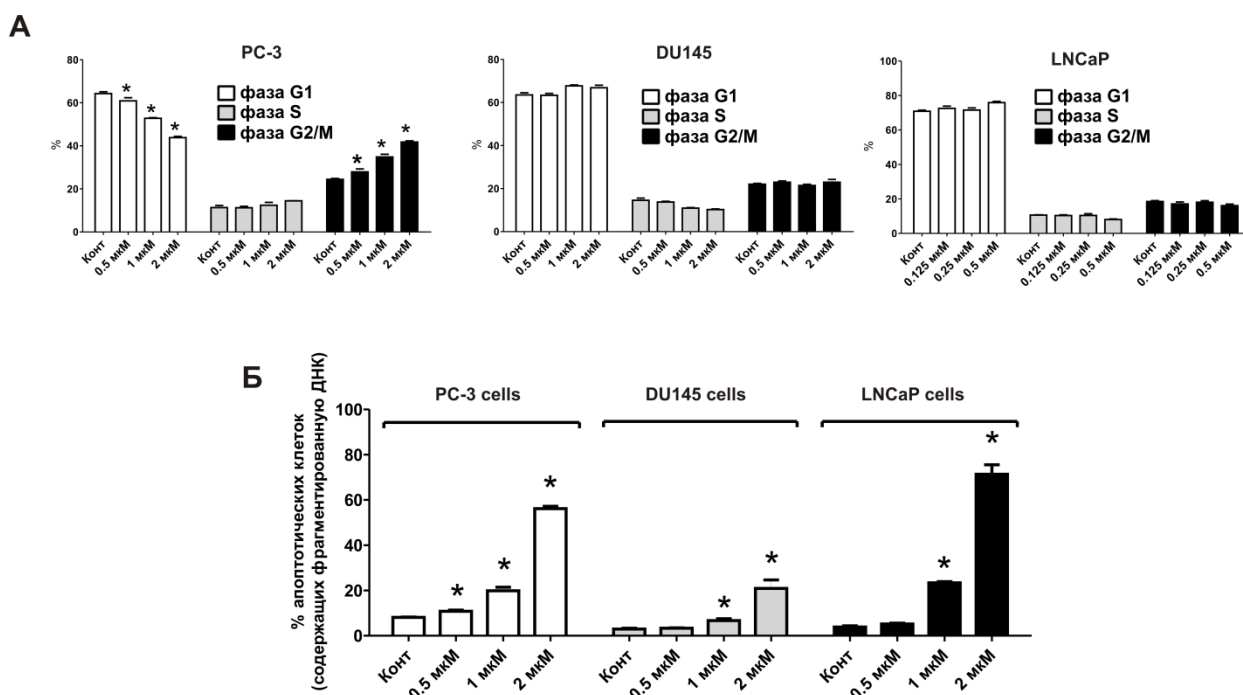


Рисунок 49. Результаты исследования прогрессии клеточного цикла клеток рака простаты PC-3, DU145 и LNCaP под действием FrA. Клетки были обработаны в течение 48 ч, зафиксированы, окрашены PI, и содержание ДНК было измерено с помощью проточной цитометрии (А). Клетки, находящиеся в суб-G1 фазе, считали апоптотическими (Б). * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Наблюдаемая в обработанных FrA клетках дозозависимая фрагментация ДНК (Рис. 49Б), а также экстернализация фосфатидилсерина (Рис. 50) свидетельствовали об индукции апоптоза. Эффективность индукции апоптоза уменьшалась в ряду LNCaP > PC-3 > DU145. Примечательно, что ингибирование активности каспаз с помощью ингибитора z-VAD-fmk существенно уменьшало долю апоптотических клеток для линии DU145, но не для линий PC-3 или LNCaP (Рис. 50) [279].

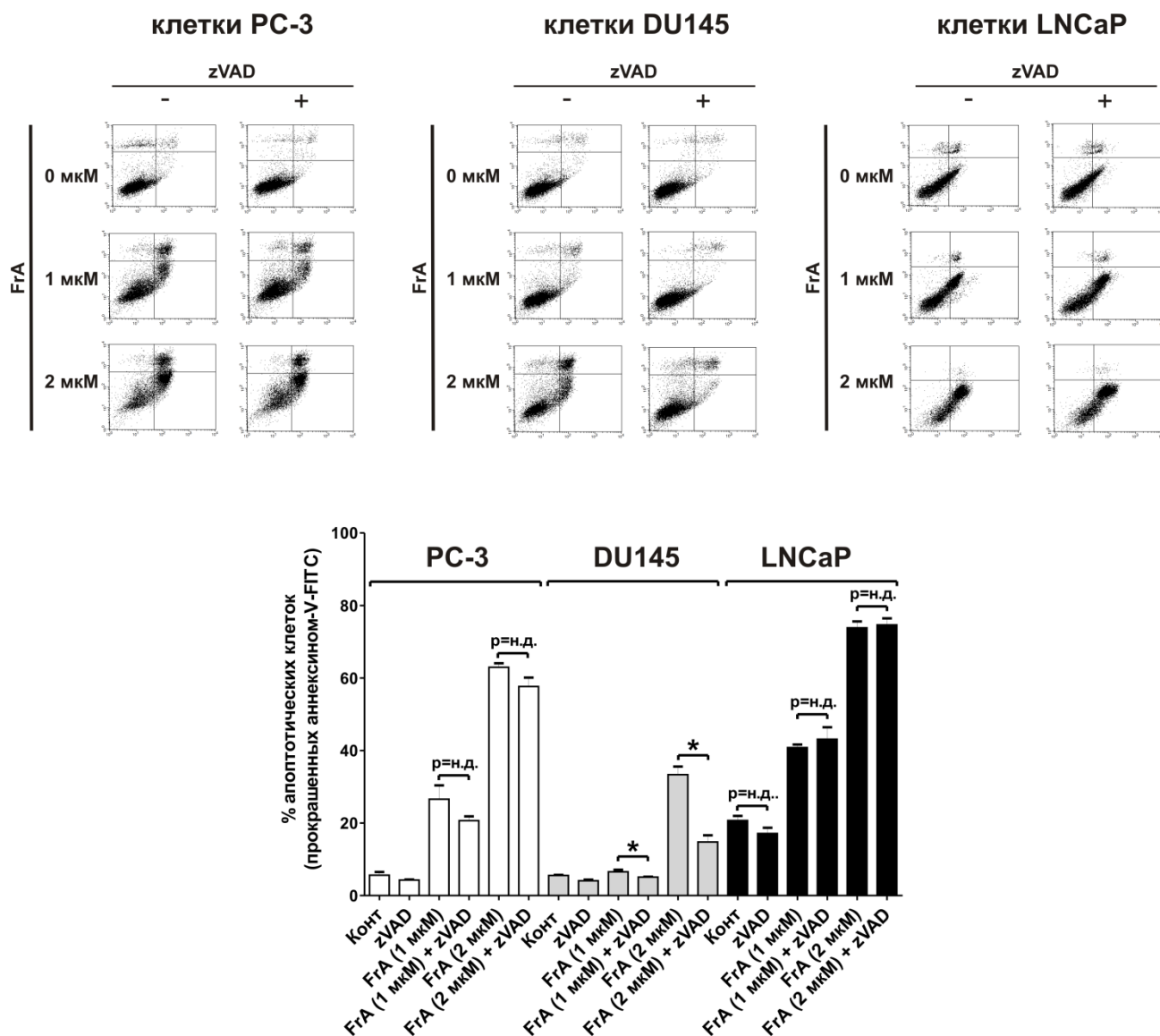


Рисунок 50. Исследование методом проточной цитометрии эффекта ингибитора активности каспаз zVAD на проапоптотический эффект FrA. Клетки были предварительно обработаны 100 мкМ ингибитора zVAD в течение 1 ч, а затем указанными концентрациями FrA в течение 48 ч. Экстернализация фосфатидилсерина была измерена методом проточной цитометрии с использованием двойного окрашивания клеток аннексином-V-FITC и PI. На рисунке представлены первичные гистограммы и количественная оценка представленных данных. Клетки, окрашенные аннексином-V-FITC, считали апоптотическими. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

В то же время предварительная обработка ингибитором z-VAD-fmk существенно снижала апоптоз-индуцирующий эффект анизомидина – известного индуктора классического апоптоза – во всех трёх клеточных линиях (Рис. 51). На основании этих

данных был сделан вывод о большей чувствительности клеток PC-3, по сравнению с DU145, к FrA: реализация проапоптотического эффекта в клетках линии DU145 требовала не только более высоких концентраций FrA, но и наличия активных каспаз [279].

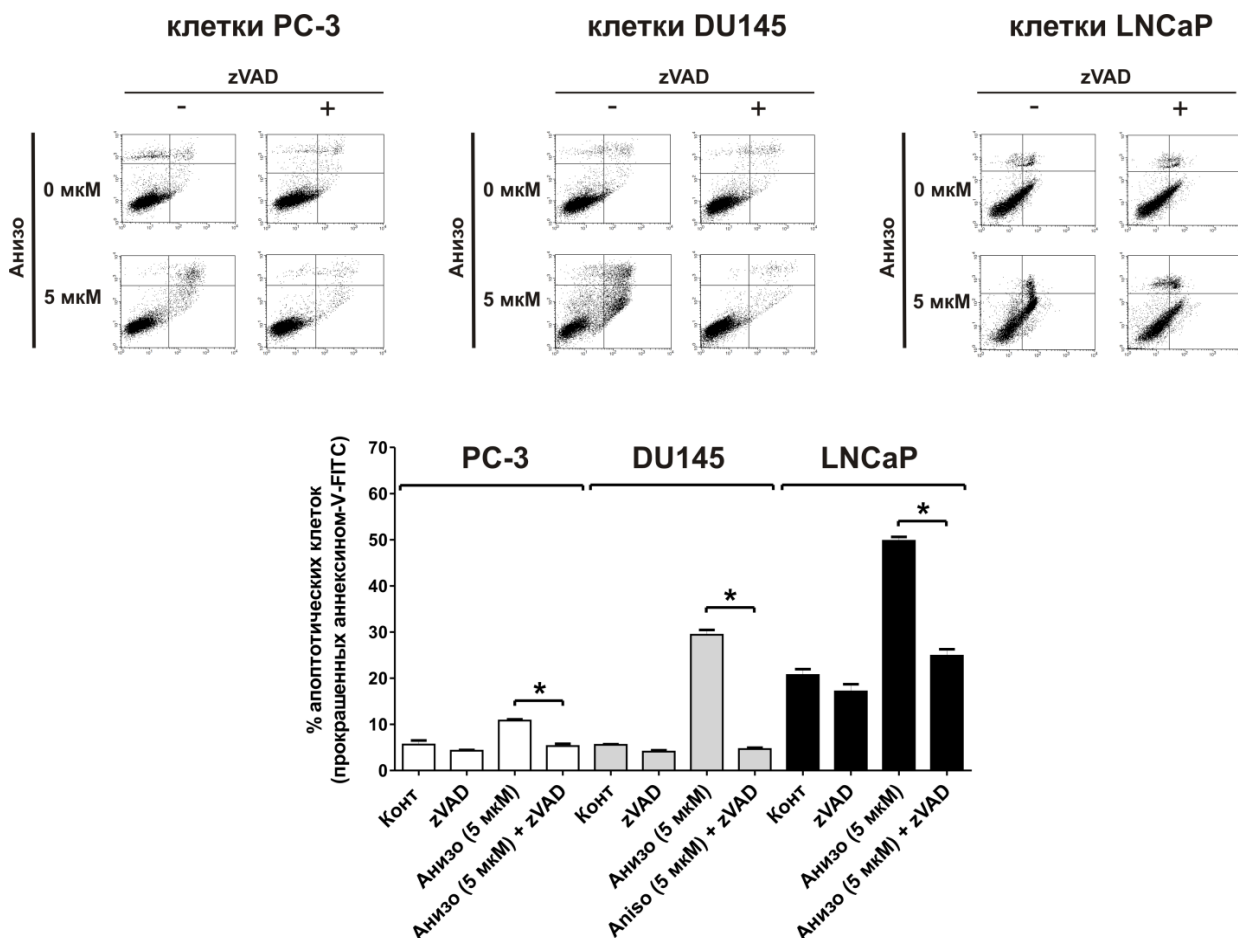


Рисунок 51. Исследование методом проточной цитометрии эффекта ингибитора активности каспаз z-VAD-fmk на проапоптотический эффект анизомицина. Клетки были предварительно обработаны 100 мкМ ингибитора z-VAD-fmk в течение 1 ч, а затем указанными концентрациями анизомицина в течение 48 ч. Экстернализация фосфатидилсерина была измерена методом проточной цитометрии с использованием двойного окрашивания аннексином-V-FITC и PI. На рисунке представлены первичные гистограммы и их количественная оценка. Клетки, окрашенные аннексином-V-FITC, считали апоптотическими. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.4.1.3. Эффект FrA на экспрессию некоторых про- и антиапоптотических белков в клетках рака простаты

Проведённый методом Вестерн-блоттинга анализ эффекта FrA на экспрессию ряда белков в клетках PC-3 и DU145 выявил индукцию таких маркеров апоптоза, как расщеплённые PARP и каспаза-3 (Рис. 52), а также увеличение экспрессии таких проапоптотических белков как Вах (только для клеток DU145) и Bad (Рис. 52), а также снижение экспрессии антиапоптотических белков сурвивина и Bcl-2 (Рис. 52). Уровень экспрессии антиапоптотического белка PAK1 не изменялся под действием FrA на клетки (Рис. 52). Экспрессия проапоптотического белка PTEN увеличивалась в клетках DU145, в то время как в клетках PC-3 экспрессия этого белка отсутствовала вследствие ранее описанной делеции гена PTEN [281]. Кроме того, генетические различия клеток PC-3 и DU145 [282, 283] могут объяснить различный характер FrA-индуцируемого апоптоза в этих клетках (каспаза-зависимый или -независимый апоптоз, рис. 50), хотя активация каспазы-3 и наблюдалась в обоих случаях.

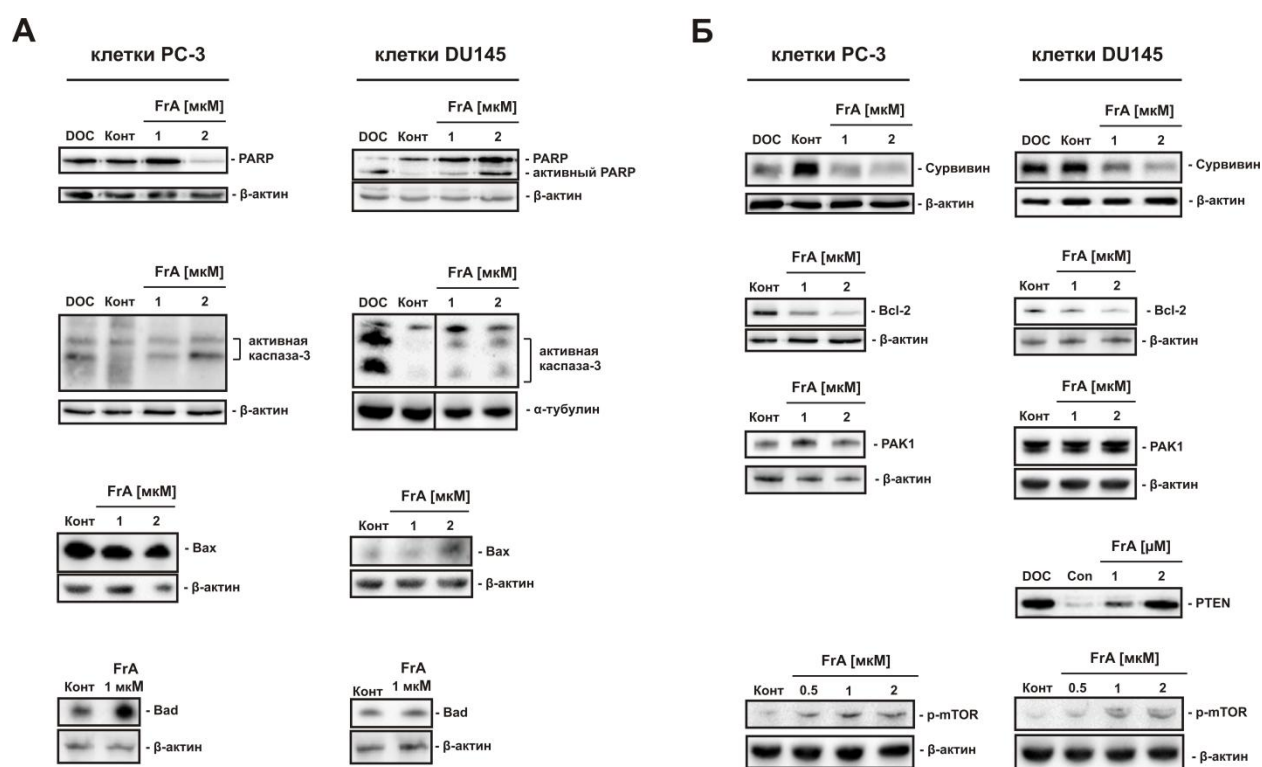


Рисунок 52. Вестерн-блоттинг анализ ключевых про- и антиапоптотических белков в клетках PC-3 и DU145, обработанных FrA в течение 48 ч

Примечательно, что в клетках PC-3 и DU145 обработка FrA вызывала увеличение экспрессии p-mTOR и p21, в то время как в клетках LNCaP наблюдалось снижение уровня белка p21 (Рис. 53). Ранее было показано, что увеличение экспрессии p21 ведёт к ингибированию прогрессии клеточного цикла в фазе G2/M [284]. Количественная оценка сигнала белка показала, что увеличение экспрессии p21 под действием FrA было намного более существенно в клетках PC-3 по сравнению с DU145, и, напротив, уровень p21 уменьшался в эксперименте с клетками LNCaP (Рис. 53). Данный факт может объяснить более выраженный G2/M-арест клеточного цикла в клетках PC-3 по сравнению с клетками DU145 и LNCaP (Рис. 53) [279].

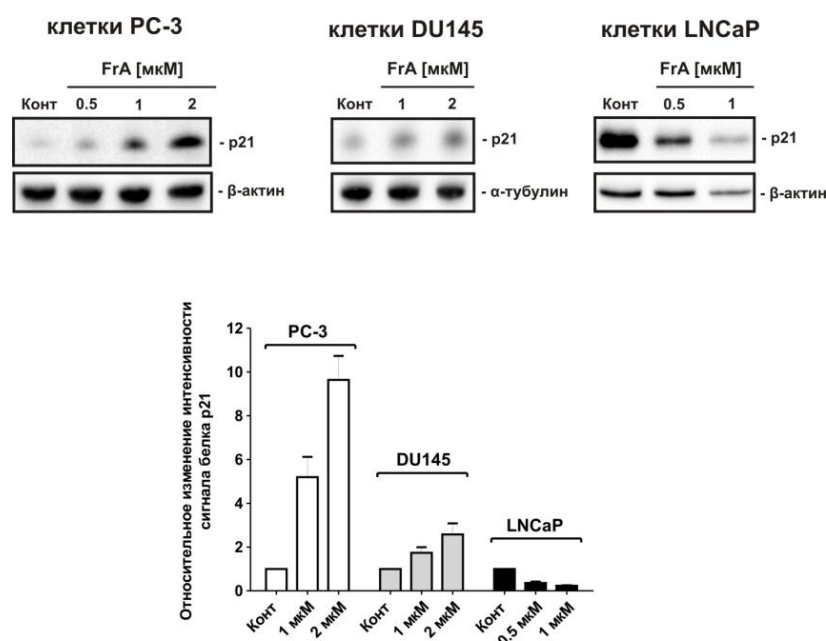


Рисунок 53. Вестерн-блоттинг анализ белка p21 в клетках PC-3, DU145 и LNCaP, обработанных FrA в течение 48 ч. На рисунке представлены фотографии мембран, а также количественная оценка сигнала

3.4.1.4. Эффект FrA на цитопротекторную аутофагию в клетках рака простаты

Были исследованы уровни экспрессии белков LC3B-I и LC3B-II (Рис. 54А), а также вакуолизация цитоплазмы (световая микроскопия, рис. 54Б) в трех типах клеток рака простаты человека, обработанных FrA. Увеличение соотношения LC3B-II / LC3B-I было обнаружено в случае экспериментов с клетками PC-3 и LNCaP (Рис. 54А). В то же время в случае клеток линии DU145 изоформа LC3B-II не была обнаружена ни в контрольных клетках, ни в клетках, обработанных FrA, бафиломицином A1 или хлорокином (известные ингибиторы аутофагии, использовались как положительный контроль, рис. 54А). Данный

феномен ранее был описан и другими группами [285]. В то же время вакуолизация цитоплазмы в результате обработки клеток FrA была обнаружена во всех трёх линиях PC-3, DU145 и LNCaP (Рис. 54Б). На основании этих наблюдений для дальнейших экспериментов по изучению эффекта FrA на аутофагию в опухолевых клетках рака простаты была выбрана линия PC-3 [279].

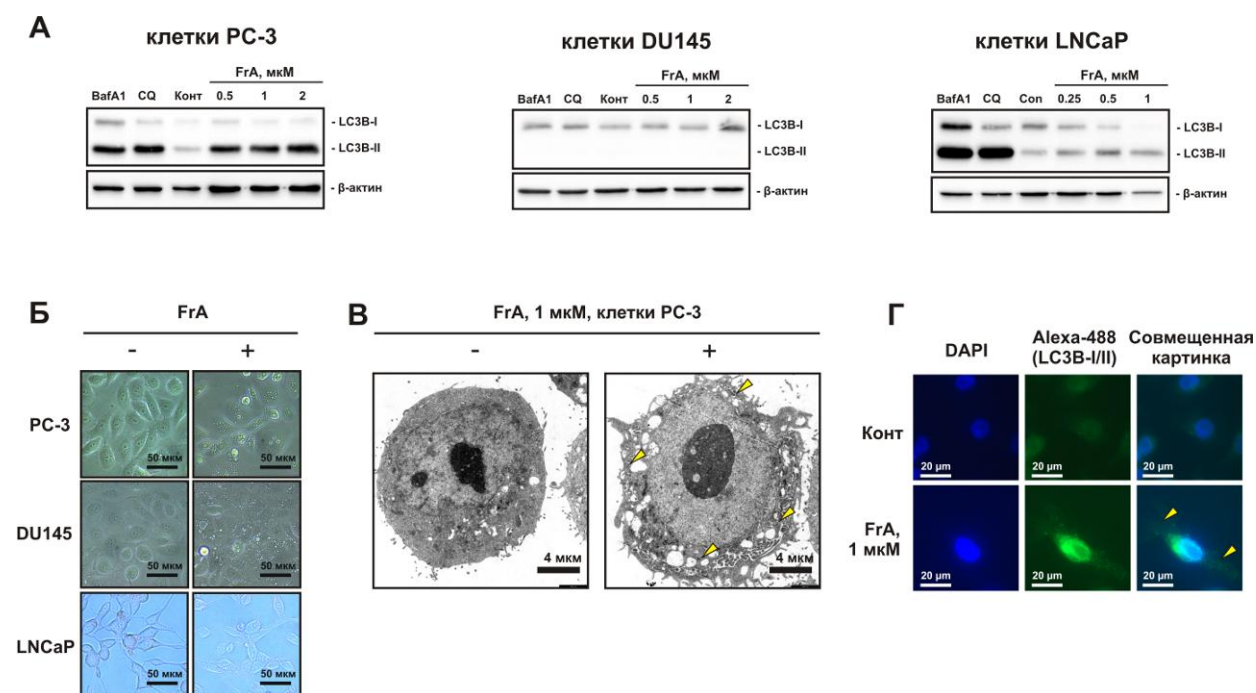


Рисунок 54. (А) Вестерн-блоттинг анализ экспрессии белка LC3B-I/II в клетках PC-3, DU145 и LNCaP, обработанных FrA в течение 48 ч. Исследование образования вакуолей методом световой микроскопии (Б), а также аутофагосом/аутолизосом методами электронной (В) и иммунофлуоресцентной микроскопии (Г) в клетках PC-3, обработанных FrA в течение 48 ч. Клетки были подвергнуты фиксации (В, Г), пермеабиллизации (Г) и последовательно обработаны первичными анти-LC3B-I/II антителами и вторичными Alexa Fluor 488-связанными антителами (Г). Количество аутофагосом – внутриклеточных структур с двумя мембранами (обозначены жёлтыми стрелками, В) или LC3B-I/II-положительных структур (Б, обозначены белой стрелкой), увеличивалось под действием FrA на клетки

На основании результатов анализа уровня экспрессии LC3B-II а также вакуолизации цитоплазмы был сделан вывод, что процессы, ассоциированные с аутофагией, вовлечены в клеточный ответ на действие FrA. В подтверждение этого предположения было обнаружено формирование структур, содержащих двойную

мембрану (электронная микроскопия, рис. 54В). С использованием метода иммуноцитохимии были выявлены LC3В-I/II-положительные структуры, и таким образом было обнаружено перераспределение содержащегося в цитозоли LC3В-I/II в аутофагосомы и аутолизосомы (обнаружены в виде точек), а также увеличение внутриклеточного количества этих органелл (Рис. 54Г) [279].

В зависимости от типа клеток накопление LC3В-II вместе с одновременным формированием LC3В-I/II-положительных структур с двойной мембраной может быть признаком как инициации, так и ингибирования аутофагии. Для того чтобы различить эти два принципиально отличающихся друг от друга процесса, клетки были обработаны одновременно FrA и 3-метиладенином (3-МА), известным ингибитором ранних стадий аутофагии. При этом не было замечено какого-либо существенного влияния 3-МА на цитотоксическую активность FrA в эксперименте с окрашиванием клеток трипановым синим (Рис. 55А). Результаты предыдущего эксперимента были подтверждены с помощью другого теста на цитотоксичность (МТТ-тест, рис. 55Б). Однако поскольку сам 3-МА проявлял небольшую цитотоксическую активность по отношению к клеткам РС-3 в своей активной концентрации (в которой он был способен ингибировать аутофагию), то эксперимент был проведён с использованием метода Чоу-Талалая [178]. Результаты данного эксперимента выявили аддитивный эффект FrA при его комбинации с 3-МА, что говорит о том, что оба вещества могут иметь сходный механизм действия, то есть способны ингибировать аутофагию в опухолевых клетках (Рис. 55Б). Различное время предварительной обработки клеток 3-МА (0–60 мин), а также различные молярные соотношения веществ ($C(\text{FrA}) : C(3\text{-МА}) = 1 : 5000; 1 : 2500; \text{или } 1 : 1250$) не изменяли результатов эксперимента (данные не приведены). Помимо этого было показано, что бафиломицин А1 (BafA1) способен антагонизировать цитотоксический эффект FrA (Рис. 55В, Г). Ранее для BafA1 (который сам является ингибитором аутофагии) была описана способность ингибировать цитотоксический эффект других ингибиторов аутофагии [286].

Для того чтобы подтвердить способность FrA ингибировать аутофагию, было проведено изучение кинетики аккумуляции-деградации LC3В-II как маркера аутофагии. Известно, что активация аутофагии приводит к кратковременному повышению уровня LC3В-II с последующим его уменьшением, в то время как ингибирование аутофагии приводит к постоянному и долгосрочному повышению уровня LC3В-II [287].

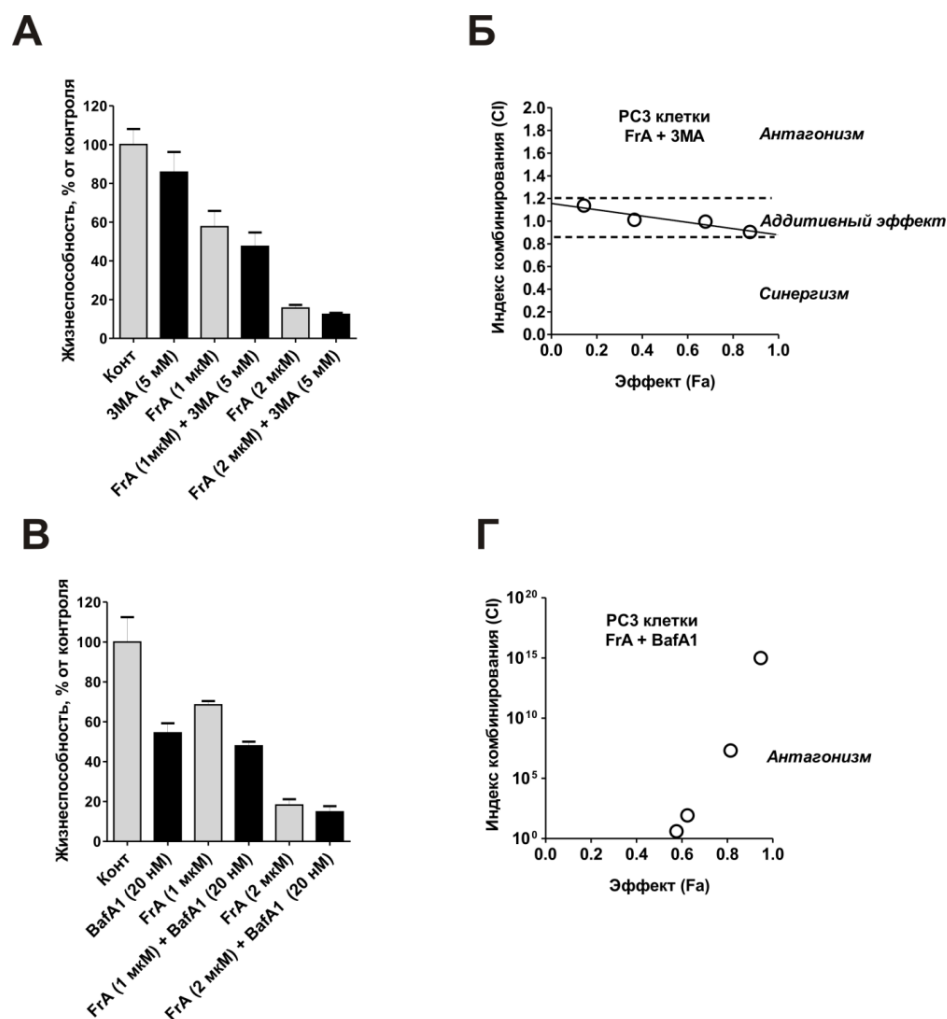


Рисунок 55. Исследование эффекта 3-метиладенина (3-МА) и бафиломицина А1 (BafA1) на цитотоксическую активность FrA в опухолевых клетках РС-3. Клетки были обработаны комбинациями FrA и 3-МА или FrA и BafA1 в течение 48 ч в разных (**А**, **В**) или одинаковых молярных соотношениях (**Б**, **Г**, C(FrA) : C(3-МА) = 1 : 2500 (**Б**); C(FrA) : C(BafA1) = 20 : 1 (**Г**)). Жизнеспособность клеток была измерена с помощью МТТ-теста (**А**, **В**). Индекс комбинирования был рассчитан с использованием программного обеспечения CompuSyn 1.0 (**Б**, **Г**)

Как и в случае FrA, в клетках РС-3, обработанных BafA1 или хлорокином (CQ) (ингибиторы последних стадий аутофагии), наблюдалась времязависимая аккумуляция LC3B-II (Рис. 56). В противоположность этому, в клетках, обработанных рапамицином (Rapa) (индуктор аутофагии) или находящихся в условиях голодания, наблюдалось устойчивое ингибирование уровня экспрессии LC3B-II (Рис. 56). 3-МА, будучи ингибитором начальных стадий аутофагии, не вызывал значительных изменений в уровнях экспрессии LC3B-I/II (Рис. 56) [279].

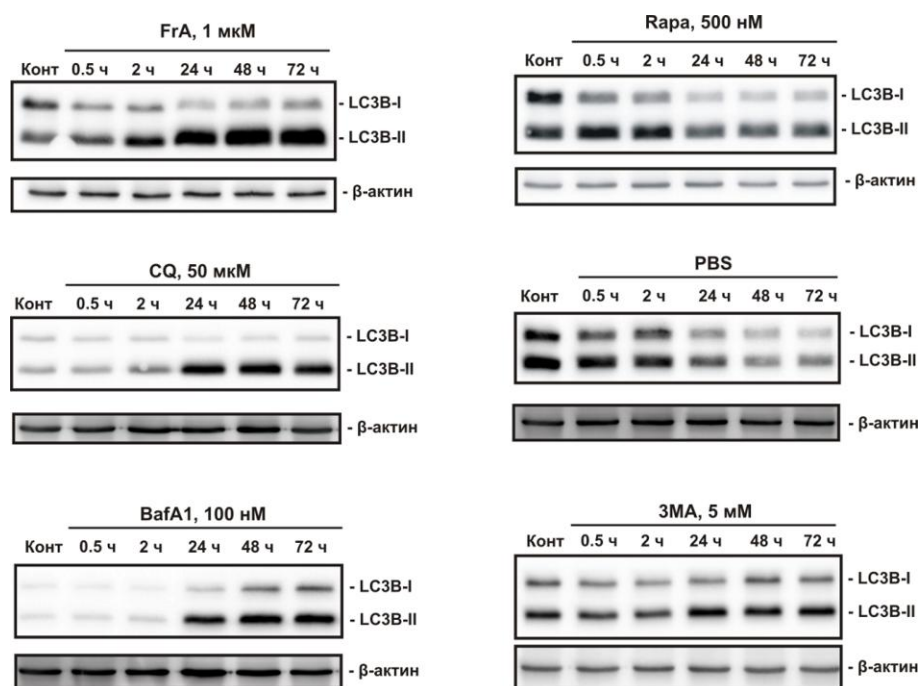


Рисунок 56. Вестерн-блоттинг анализ экспрессии белка LC3B-I/II в клетках PC-3, обработанных FrA, хлорокином (CQ) или бафилоцицином A1 (BafA1), рапамицином (Rapamycin), 100% PBS (симуляция голодания, PBS) или 3-метиладенином (3-MA) в течение 48 ч

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что FrA способен ингибировать цитопротекторную аутофагию клеток рака простаты на её конечных стадиях. Кроме того, увеличение уровня p-mTOR в обработанных FrA клетках может также частично вносить вклад в ингибирование аутофагии на её ранних стадиях (Рис. 52)

3.4.1.5. Выявление белков, регулируемых в клетках PC-3 под действием цитотоксических концентраций FrA, с помощью методов протеомики

Для того чтобы выявить белки, регулируемые в клетках рака простаты под действием на них FrA и охарактеризовать механизм действия вещества в организме человека, нами был применён метод глобального протеомного скрининга. Полученный с помощью 2D-PAGE двумерный гель, представляющий картину экспрессии различных белков в виде окрашенных кумасси бриллиантовым синим G-250 белковых пятен (Рис. 57), был отсканирован и сравнен с картиной экспрессии белков в необработанных веществом клетках. Сравнение и анализ проводили с помощью программы Delta 2D. Всего было выявлено 946 белковых пятен, для 30 из которых было показано изменение интенсивности в 2 и более раза ($p < 0.05$, t-тест Стьюдента) при обработке клеток FrA.

Интенсивность пятен 1–19, при обработке клеток веществом увеличивалась, пятен 20–30 – уменьшалась (Табл. 9). Все 30 пятен вырезали из геля и обработали трипсином с целью получения набора пептидов, которые далее проанализировали с помощью тандемной масс-спектрометрии. Соответствующие вырезанным пятнам белки были идентифицированы на основании сравнения полученных масс-спектров пептидов с информацией из баз данных. Важно отметить, что одним из ограничений метода глобального протеомного скрининга является невозможность детекции белков с низким уровнем экспрессии [288]. Вследствие этого регуляция таких сигнальных белков, как каспазы и киназы, представленных на рисунке 52, не могла быть установлена с помощью метода 2D-PAGE [279].

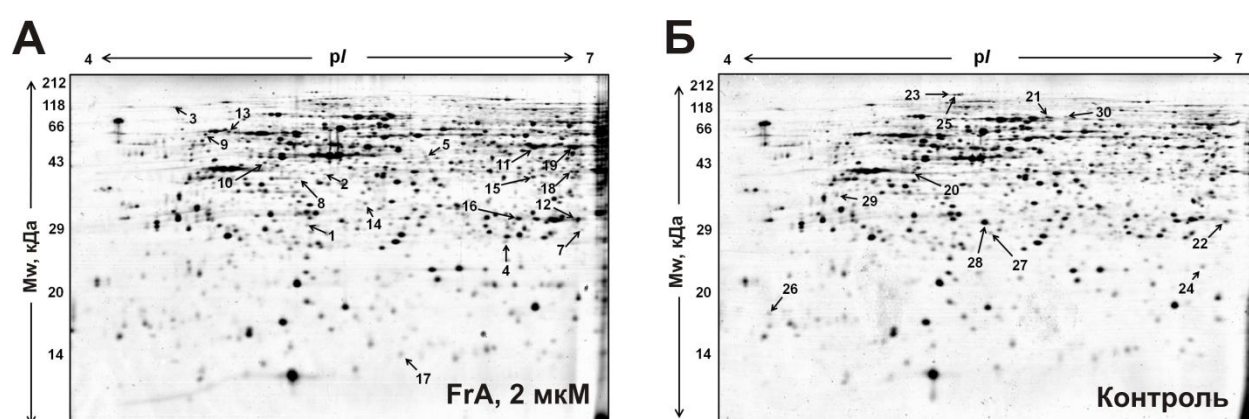


Рисунок 57. Результаты анализа методом 2D-PAGE экстракта РС-3 клеток, обработанных 2 мкМ FrA в течение 48 ч. На рисунке представлены фотографии 2D-гелей с отмеченными белками, уровень экспрессии которых увеличивается (А) или уменьшается (Б); белки обозначены названиями соответствующих генов. Отмеченные белковые пятна показали статистически достоверное изменение интенсивности окраски в ≥ 2 раза (значение фактора $p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Таблица 9. Белки, уровень экспрессии которых меняется в клетках РС-3 при обработке 2 мкМ FrA в течение 48 ч. Белки были идентифицированы методом MALDI-ToF-MS. Номера белков соответствуют номерам белковых пятен, представленных на рисунке 57

Номер пятна на геле	Относительное изменение уровня экспрессии белка	Название белка	Номер в базе Swiss-Prot	Название гена	Теор. Mw (Да)	Теор. pI
1	0.188	Катепсин В	CATB_HUMAN	CTSB	37797	5.9
2	0.230	Промежуточный фактор транскрипции 1	TIF1B_HUMAN	TRIM28	88493	5.5

3	0.257	Гетерогенный ядерный U-подобный рибонуклеопротеин 2	HNRL2_HUMAN	HNRNPUL2	85052	4.9
4	0.296	Дипептилил пептидаза 1	CATC_HUMAN	CTSC	51820	6.5
5	0.310	Цитоскелетный кератин 1, тип II	K2C1_HUMAN	KRT1	65999	8.2
6	0.333	Убиквитин-связанный энзим E2, вариант 1	UB2V1_HUMAN	UBE2V1	16484	7.7
7	0.340	Триозофосфатная изомераза	TPIS_HUMAN	TPI1	30772	5.7
8	0.344	Белок теплового шока HSP 90-бета	HS90B_HUMAN	HSP90AB1	83212	5.0
9	0.349	Эндоплазмин	ENPL_HUMAN	HSP90B1	92411	4.8
10	0.357	Цитоскелетный кератин 10, тип I	K1C10_HUMAN	KRT10	58792	5.1
11	0.368	Член 3 субсемейства C гомологов DnaJ	DNJC3_HUMAN	DNAJC3	57544	5.8
12	0.420	Триозофосфатная изомераза	TPIS_HUMAN	TPI1	30772	5.7
13	0.422	Эндоплазмин	ENPL_HUMAN	HSP90B1	92411	4.8
14	0.439	Субъединица 2 протеасомного активаторного комплекса	PSME2_HUMAN	PSME2	27384	5.5
15	0.448	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A/B	ROAA_HUMAN	HNRNPAB	36202	8.2
16	0.470	Триозофосфатная изомераза	TPIS_HUMAN	TPI1	30772	5.7
17	0.488	Птерин-4-альфа-карбиноламин дегидратаза	PHS_HUMAN	PCBD1	11992	6.3
18	0.493	Цитоскелетный кератин 9, тип I	K1C9_HUMAN	KRT9	62027	5.1
19	0.496	D-3-фосфоглицерат дегидрогеназа	SERA_HUMAN	PHGDH	56614	6.3
20	2.170	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин C1/C2	HNRPC_HUMAN	HNRNPC	33650	5.0
21	2.241	Интерактор клатрина 1	EPN4_HUMAN	CLINT1	68216	6.0
22	2.388	Митохондриальная субъединица комплекса цитохром b-c1	UCRI_HUMAN	UQCRRS1	29649	8.6
23	2.479	Триозофосфатная изомераза	TPIS_HUMAN	TPI1	30772	5.7
24	2.587	Кофилин 1	COF1_HUMAN	CFL1	18491	8.2
25	2.645	Гипоксия-активированный белок 1	HYOU1_HUMAN	HYOU1	111266	5.2
26	2.932	Нуклеофосмин	NPM_HUMAN	NPM1	32555	4.6
27	2.939	Адапторная молекула crk	CRK_HUMAN	CRK	33810	5.4
28	2.959	Кутикулярный кератин 10, тип II	KRT81_HUMAN	KRT81	54893	5.4
29	3.092	Интерлейкин 1-бета	IL1B_HUMAN	IL1B	30728	4.7
30	3.234	Ацетилтрансферазный компонент пируват-дегидрогеназного митохондриального комплекса, содержащий дигидролипоиллизиновый остаток	ODP2_HUMAN	DLAT	68953	8.0

3.4.1.6. Анализ экспрессии открытых с помощью 2D-PAGE белков методами 1D- и 2D-Вестерн-блоттинга

Для того чтобы подтвердить валидность результатов, полученных методом 2D-PAGE, мы более детально исследовали изменения, происходящие с четырьмя регулируемыми белками: IL-1 β , адаптерным белком crkII, катепсином В и кератином 81 –

каждый из которых играет определённую роль в процессах, ассоциированных с ростом и развитием опухолей. Было установлено, что уровень экспрессии белков IL-1 β и crkII повышается в клетках, обработанных FrA (Рис. 58А). В то же время было обнаружено существенное снижение экспрессии активированной формы катепсина В (Рис. 58А). Одномерный Вестерн-блоттинг не выявил каких-либо существенных изменений в уровне экспрессии кератина 81 (Рис. 58А), однако увеличение экспрессии одной специфической изоформы этого белка удалось выявить при помощи 2D-Вестерн-блоттига (Рис. 58Б) [279].

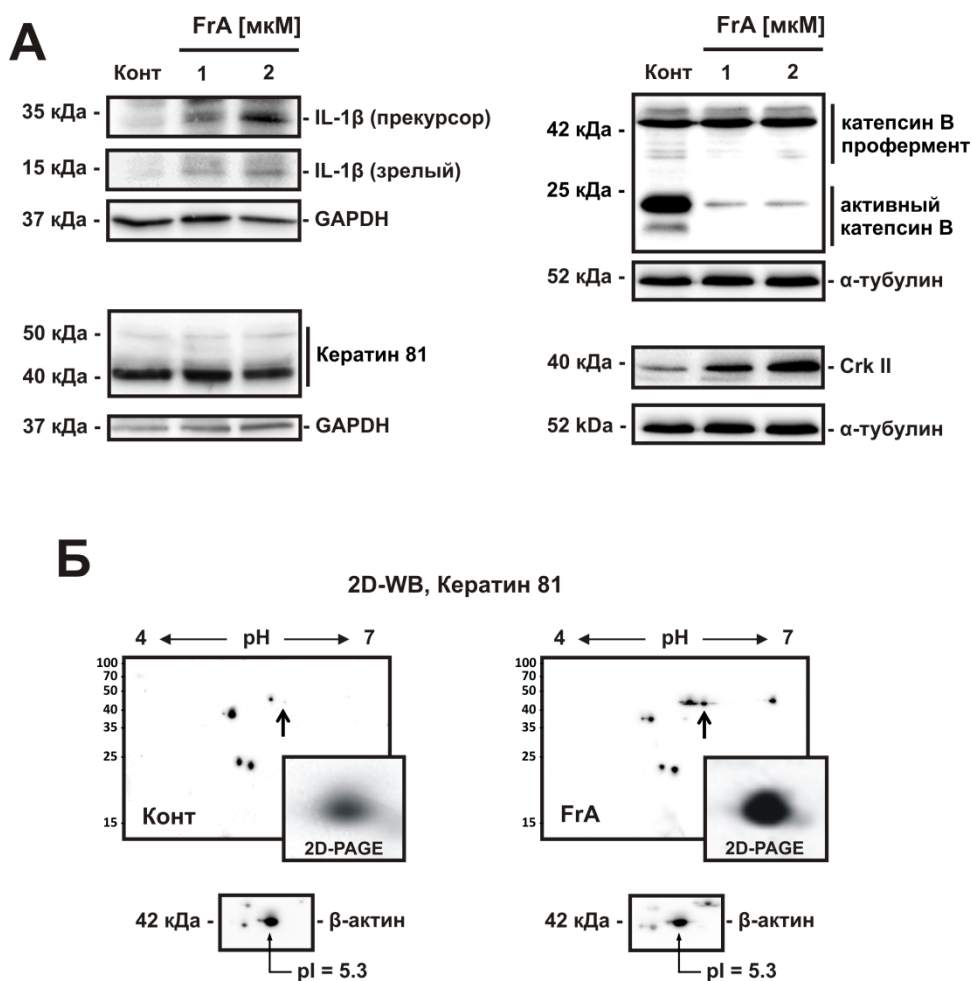


Рисунок 58. Результаты анализа методами одномерного Вестерн-блоттинга (А) и 2D-Вестерн-блоттинга (Б) внутриклеточных уровней экспрессии четырёх белков, претерпевающих изменения под действием FrA на клетки РС-3

3.4.1.7. Анализ возможных взаимодействий регулируемых под действием FrA белков

Для того чтобы предсказать возможные молекулярные мишени, а также пути, задействованные в клеточном ответе на действие FrA, данные, полученные методом глобального протеомного скрининга, были проанализированы с помощью программы

MetaCore™. Анализ определил такую молекулярную функцию как «связывание белков» как основную, которой обладают 23 из 30 выявленных регулируемых белков. Кроме того, около половины предсказанных MetaCore™ наиболее релевантных биологических процессов (8 из 15) и молекулярных путей (5 из 10) были так или иначе связаны с иммунными процессами.

Дальнейший анализ данных выявил, что такие транскрипционные факторы как CREB1, c-Мус, SP1, p53, а также андрогеновый рецептор (AR) могут быть также вовлечены в клеточный ответ на обработку FrA. 3 из 15 наиболее релевантных гипотетических карт белок-белковых взаимодействий, построенных программой MetaCore™, были ассоциированы с миграцией или адгезией опухолевых клеток. Кроме того, проведённый анализ показал, что такие процессы как репрезентация антигена, реорганизация цитоскелета, клеточный цикл и апоптоз, а также ангиогенез-ассоциированные процессы также могут принимать участие в реализации противоопухолевого эффекта FrA. [279]

3.4.1.8. *In vivo* активность FrA на моделях рака простаты человека

3.4.1.8.1. Эффект FrA на рост первичных опухолей и формирование метастазов

Эффективность и токсичность FrA *in vivo* была изучена на моделях ксенографтов человеческих клеток рака простаты PC-3 и DU145 (Рис. 59). В первом эксперименте животным, которым были привиты клетки PC-3, ежедневно внутрибрюшинно вводили FrA в дозе 0.1 мг/кг/день. Во втором эксперименте животным с привитыми клетками DU145 вводили повышенную дозу FrA 0.8 мг/кг/день по причине того, что 1) FrA хорошо переносился животными при введении в низкой дозе и 2) клетки DU145 показали меньшую чувствительность к FrA по сравнению с PC-3 клетками в экспериментах *in vitro* (Рис. 59). Таким образом, была получена дополнительная информация о побочных эффектах FrA в его более высоких дозах [279].

Рост опухоли

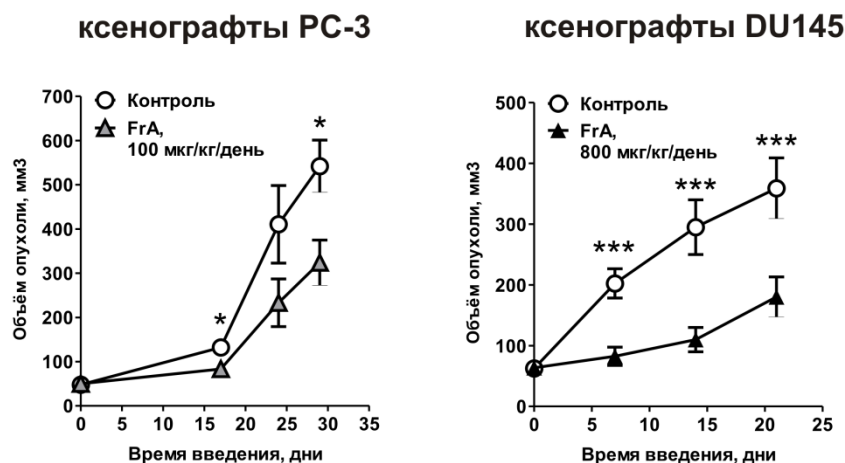


Рисунок 59. Рост опухолей в мышинных ксенографтах (животные линии NOD SCID), которым были подкожно привиты человеческие клетки рака простаты линий PC-3 или DU145. После того как опухоли достигли 50–60 мм³ животным ежедневно вводили FrA или эквивалентный объём физиологического раствора. Растворы вводили внутривенно. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

FrA был способен ингибировать рост опухолей в обоих экспериментах (Рис. 59). В случае модели, основанной на ксенграфтах клеток PC-3, количество опухолевых клеток, обнаруженных в лёгочной ткани, также существенно снижалось в группе, которой вводили FrA ($p = 0.058$, t-тест Стьюдента). В случае модели с использованием клеток DU145, у 50% животных контрольной группы опухолевые клетки были обнаружены в лёгочной ткани, в то время как ни у одного из животных из группы, которой вводили FrA ($p = 0.214$, t-тест Стьюдента) в лёгочной ткани опухолевые клетки обнаружены не были (Рис. 60А). Гистологическое исследование лёгочной ткани на наличие метастазов выявило статистически достоверное снижение количества лёгочных метастазов в группе, которой вводили FrA, по сравнению с контрольной группой ($p < 0.01$, t-тест Стьюдента, рис. 60Б). При этом лёгочные метастазы не были обнаружены ни в одной из групп животных, которым были ксенотрансплантированы клетки DU145 (данные не показаны), что, по всей видимости, было связано с более низким метастатическим потенциалом клеток DU145, а также с меньшей продолжительностью данного *in vivo* эксперимента [279].

А Опухолевые клетки в лёгких

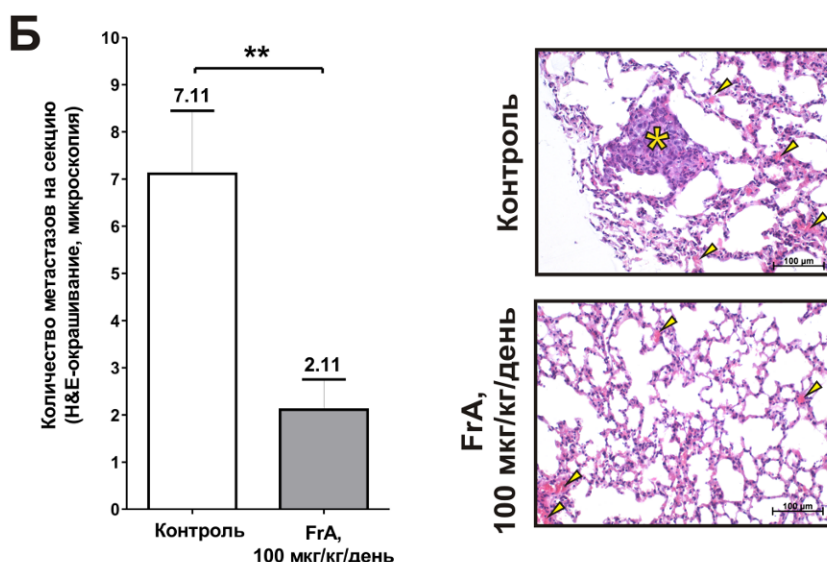
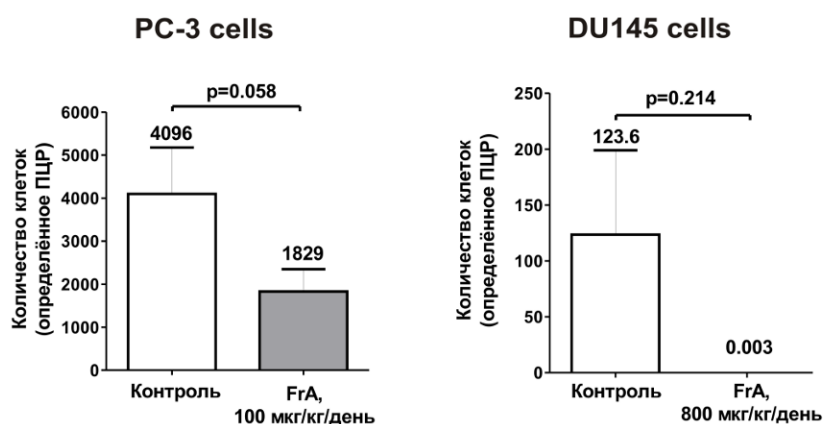


Рисунок 60. Количественная оценка опухолевых клеток в лёгочной ткани с помощью *Alu*-ПЦР в реальном времени (А), а также количественная оценка лёгочных микрометастазов при помощи гистологического окрашивания образцов тканей гематоксилином-эозином (Б). На представленных микрофотографиях метастазы отмечены астериском (*), кровяные сосуды – жёлтыми стрелками. ** – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.01$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, трёхкратное уменьшение количества циркулирующих в крови опухолевых клеток было обнаружено в *in vivo* эксперименте с использованием клеток DU145 ($p = 0.475$), в то же время этой разницы не наблюдалось в случае *in vivo* эксперимента с использованием модели клеток PC-3, что может быть связано с меньшей дозой FrA, используемой в последнем эксперименте (Рис. 61). Таким образом, на данных

экспериментальных моделях было показано, что FrA способен ингибировать формирование метастазов опухолей рака простаты человека. Стоит также отметить, что распространение опухолевых клеток в костный мозг не наблюдалось ни для одного из используемых экспериментальных животных (данные не показаны).

Опухолевые клетки в крови

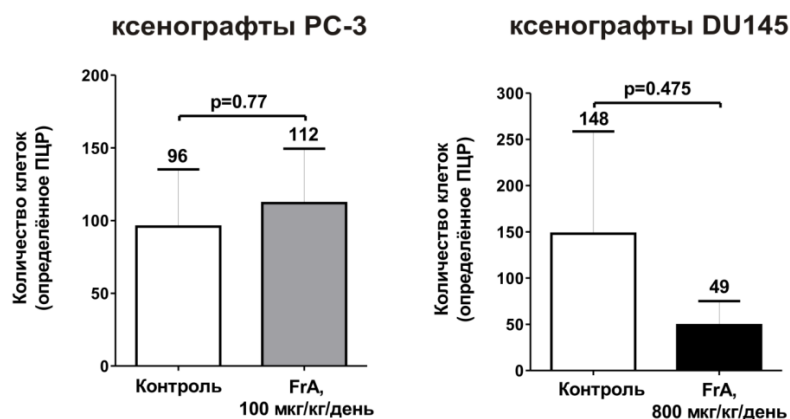


Рисунок 61. Количественная оценка опухолевых клеток в крови животных с помощью *Alu*-ПЦР в реальном времени

3.4.1.8.2. Исследование побочных эффектов применения FrA *in vivo*

В целом, FrA был хорошо переносим животными, и при внутрибрюшном введении не было обнаружено каких-либо существенных побочных эффектов, даже в эксперименте с высокими дозами FrA. В частности, не было замечено изменений в поведении, весе тела животных, а также каких-либо признаков боли или стресса. Также не было обнаружено существенных изменений масс таких органов, как сердце, печень, лёгкие и почки. В то же время у животных, которым вводили FrA наблюдалось увеличение массы селезёнки (на 21%, $p = 0.084$, t-тест Стьюдента, для животных, которым вводили FrA в дозе 100 мкг/кг/день; и увеличение на 50%, $p < 0.0001$, t-тест Стьюдента, для животных, которым вводили FrA в дозе 800 мкг/кг/день) (Рис. 62). Анализ крови животных по окончании эксперимента не выявил каких-либо изменений уровней тромбоцитов или гемоглобина (Рис. 62). Примечательно, что тенденция к увеличению количества лейкоцитов в крови животных, которым вводили FrA, наблюдалась в обоих экспериментах и была связана с лимфоцитозом (Рис. 62). Кроме того, двукратное увеличение количества моноцитов было обнаружено в группе животных, которым вводили FrA в дозе 800 мкг/кг/день ($p < 0.01$,

рис. 62). Лимфоцитоз и моноцитоз, а также увеличение селезёнки могут указывать на иммуномодулирующие свойства FrA, которые были описаны ранее [289, 290].

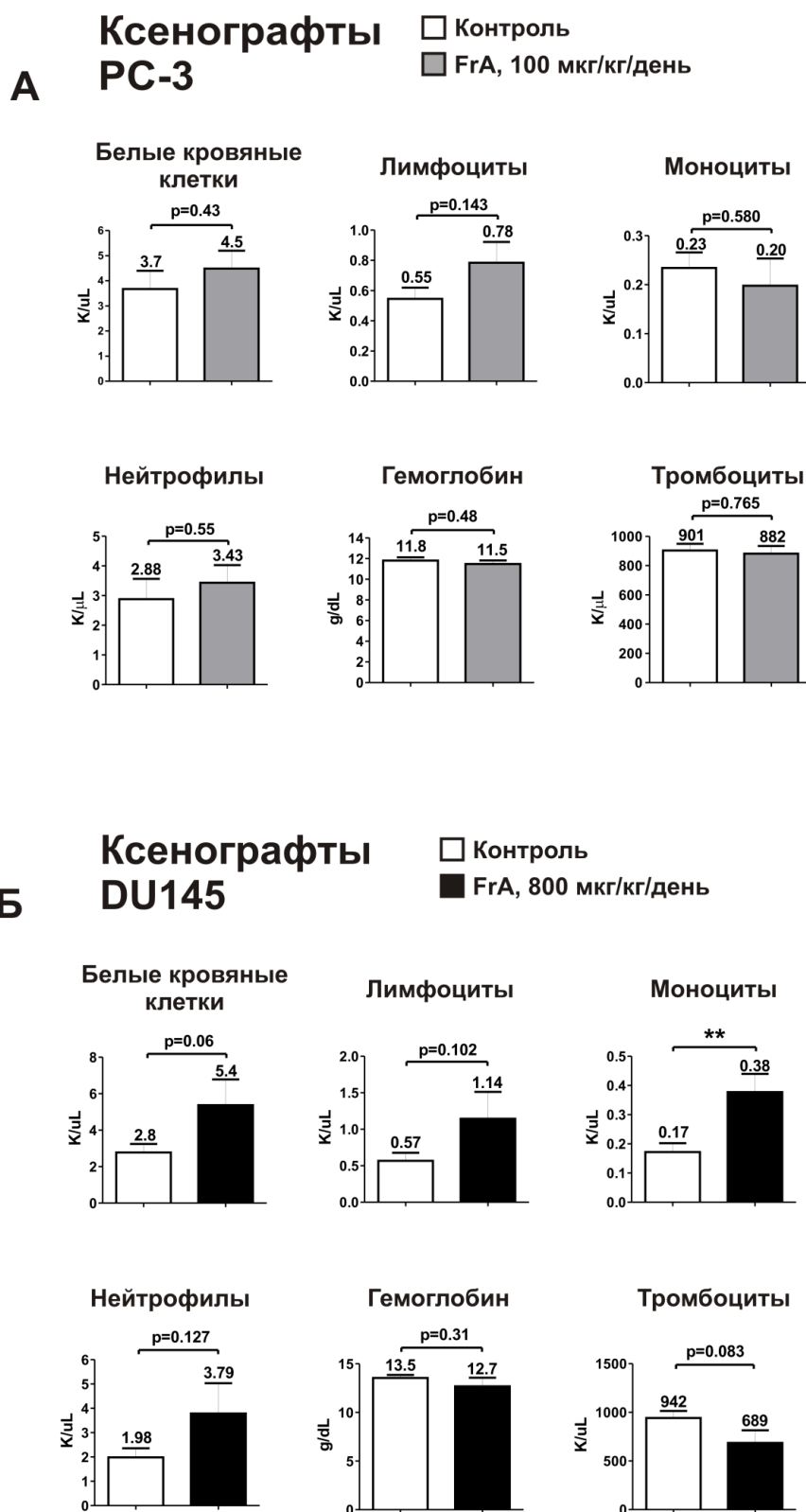


Рисунок 62. Измерение количества клеток крови, а также содержания гемоглобина в крови животных, которым были привиты опухолевые клетки РС-3 (А) или DU145 (Б), и

которым вводился плацебо (физиологический раствор) или раствор FgA в указанных концентрациях дозах. ** – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.01$, t-тест Стьюдента)

3.4.1.9. Обсуждение результатов экспериментов по воздействию FgA на опухолевые клетки рака простаты человека

За последние годы количество вариантов терапии пациентов с прогрессирующим раком простаты, устойчивым к гормональной терапии, сильно увеличилось. Кроме стандартных подходов, основанных на применении доцетакселя и кабазитакселя, на рынок были выведены такие новые препараты, как абиратерон и энзалутамид, действие которых направленно на андрогеновый рецептор. Однако развитие устойчивости опухолей к химиотерапии ограничивает и снижает её эффективность [92]. Существуют различные механизмы приобретения устойчивости опухолей к противоопухолевым препаратам, среди них повышенное выведение препаратов из клеток посредством р-глицопротеона [291]; повышенный клеточный метаболизм белков, детоксифицирующих препараты, например глутатион-S-трансферазы; изменения в изоформах тубулина, приводящих к изменениям кинетики формирования микротрубочек [95]; а также изменение активности андрогенового рецептора [292]. Так, недавно было показано, что наличие одного из транскрипционных вариантов андрогенового рецептора – варианта AR-V7 – ответственно за первичную и вторичную лекарственную устойчивость к абиратерону и энзалутамиду [293]. Поэтому крайне необходимы новые препараты, которые были бы способны преодолеть данную лекарственную устойчивость.

В настоящей работе была исследована противоопухолевая активность фрондозиды А (FgA) на клетках рака простаты человека, включая лекарственно-устойчивые клеточные линии. FgA эффективно ингибировал рост клеток рака простаты PC-3 и DU145 (обе линии не экспрессируют AR, и, как следствие, являются лекарственно-устойчивыми) *in vitro* в своих микро- и субмикромольных концентрациях. Кроме того, андроген-зависимые клетки рака простаты LNCaP, а также абиратерон- и энзалутамид-устойчивые AR-V7-положительные клетки 22Rv1 и VCaP были высокочувствительны к действию FgA. Таким образом, по отношению к данным клеточным линиям не было обнаружено кросс-резистентности между FgA и терапией, направленной на функцию AR. При этом нормальные клетки были менее чувствительны к цитотоксическому действию FgA, чем опухолевые. Это, по крайней мере отчасти, может быть объяснено различным влиянием соединения на аутофагию или сигнальные пути, которые избыточно активированы в

клетках рака простаты по сравнению с неопухолевыми клетками. Однако, точный механизм данного эффекта остаётся неизвестным и нуждается в дальнейших исследованиях.

В данном исследовании мы сфокусировались на изучении FgA на моделях рака простаты человека, устойчивых к медикаментозной кастрации (депривации андрогенов), таких как клетки линий PC-3 и DU145, и имеющих определённый метастатический потенциал. Эффект FgA был различен по отношению к этим клеточным линиям. Так, FgA ингибировал прогрессию клеточного цикла и индуцировал каспаза-независимый апоптоз в клетках PC-3. В то же время в клетках DU145 наблюдался каспаза-зависимый апоптоз без ингибирования прогрессии клеточного цикла. Тем не менее, соответствующие значения IC₅₀ для обеих клеточных линий были сопоставимыми между собой. Также противоопухолевый эффект соединения сопровождался регуляцией некоторых про- и антиапоптотических белков, таких как Bax, Bad, сурвивин, Bcl-2, PTEN, p-mTOR, а также PARP и активированная форма каспазы-3. Клетки LNCaP, будучи AR-положительными и являющиеся чувствительными к терапии, основанной на депривации андрогенов, были также высокочувствительны к FgA. При этом эффект изучаемого соединения сопровождался индукцией каспаза-независимого апоптоза без ареста клеточного цикла. Неодинаковые эффекты FgA на прогрессию клеточного цикла могут быть, по крайней мере, частично объяснены различным влиянием исследуемого соединения на экспрессию белка p21 в клетках PC-3, DU145 и LNCaP. Это влияние, а также различный характер индуцируемого апоптоза (каспаза-зависимый или -независимый) может быть результатом генетических различий данных клеточных линий [281-283].

Было показано, что FgA индуцирует апоптоз опухолевых клеток рака простаты человека, а также – в отличие от других цитотоксических химиотерапевтических препаратов – одновременно способен ингибировать цитопротекторную аутофагию клеток рака простаты. Однако следует также отметить, что FgA показал антагонистический эффект в отношении клеток PC-3 при его комбинации с доцетакселом *in vitro*. В то же время комбинация данных препаратов показала аддитивный эффект при исследовании на модели клеток DU145. Таким образом, перед началом возможных клинических испытаний, особенно в случае комбинированной терапии, такое влияние должно быть исследовано более детально.

Глобальный протеомный скрининг выявил регуляцию некоторых белков, которые были ранее описаны как играющие роль в таких процессах как формирование метастазов, инвазия опухолевых клеток, ангиогенез, апоптоз и рост опухоли. Среди прочего, под действием FgA на клетки PC-3 было обнаружено увеличение экспрессии белка cskII,

прекурсорной и зрелой формы IL-1 β , снижение уровня активной формы катепсина В и одной из изоформ кератина 81. Ранее было показано, что белки cdkII и IL-1 β могут играть проапоптотическую роль в человеческих опухолевых и нормальных клетках [171, 294]. Также ранее сообщалось, что увеличение экспрессии cdkII способно стимулировать элиминирование апоптотических клеток [295]. Было показано, что активация катепсина В ассоциирована с повышением инвазии и миграции клеток рака простаты, в то время как инактивация этого белка приводила к ингибированию данных процессов, а также к индукции апоптоза [296]. Профили экспрессии кератинов могут сильно различаться в доброкачественных и злокачественных опухолях тканей простаты [297]. Несколько более ранних исследований показали роль кератинов в инвазии и метастазировании опухолевых клеток, а также в клеточном ответе на химиотерапию [298]. Однако роль специфической регулируемой изоформы кератина 81 в биологических процессах, происходящих в клетках рака простаты, неизвестна.

Следует отметить, что биоинформатический анализ полученных протеомных данных предсказал, что в клеточный ответ на действие FrA может быть вовлечён сигнальный путь, ассоциированный с андрогеновым рецептором. Примечательно, что клетки PC-3, с использованием которых были получены протеомные данные, являются AR-отрицательными. Однако анализ данных с помощью программы MetaCoreTM способен предсказывать молекулярные мишени, которые могут взаимодействовать со специфическими регулируемыми под действием вещества на клетки белками (открытыми с помощью методов протеомики), даже несмотря на то, что сам белок-мишень не присутствует в модельной клеточной линии. Полученные данные свидетельствуют о том, что андрогеновый сигнальный путь может быть задействован в клеточном ответе на воздействие FrA не только в клетках рака простаты, несущих дикий тип андрогенового рецептора (AR) (клетки LNCaP), но и в клетках, в которых присутствуют одновременно дикий тип AR и транскрипционные варианты этого рецептора (например, клетки 22Rv1 и VCaP) [99, 100]. Это может частично объяснить более высокую чувствительность клеток LNCaP, 22Rv1 и VCaP к FrA, по сравнению с клетками PC-3 и DU145.

В экспериментах *in vivo* FrA проявил высокую эффективность и низкую токсичность при испытании на двух моделях ксенографтов клеток рака простаты человека. Этот гликозид существенно снижал количество опухолевых клеток в лёгочной ткани животных, количество лёгочных микрометастазов, а также количество циркулирующих в крови опухолевых клеток. Наблюдаемый лейкоцитоз, вызванный увеличением количества лимфоцитов и моноцитов, а также увеличение селезёнки в группе животных, которым вводили FrA, может говорить об иммуномодулирующей

активности FrA. Данные наблюдения хорошо согласуются как с более ранними публикациями [289, 290], так и с результатами биоинформатического анализа, который предсказал эффект FrA на процессы, так или иначе связанные с иммунитетом.

Таким образом, FrA показал высокую эффективность и низкую токсичность при исследовании на моделях рака простаты человека, включая клеточные линии, устойчивые к стандартным химиотерапевтическим препаратам. Уникальная комбинация свойств, включающая в себя индукцию апоптоза опухолевых клеток вместе с одновременным ингибированием прогрессии клеточного цикла и ингибированием цитопротекторной аутофагии, а также возможные иммуномодулирующие эффекты делают FrA привлекательным кандидатом на роль препарата для терапии рака простаты человека.

3.4.2. Исследование активности FrA на моделях уротелиальной карциномы человека

3.4.2.1. Исследование эффекта FrA на жизнеспособность клеток уротелиальной карциномы человека

FrA проявил цитотоксическую активность по отношению к шести клеточным линиям уротелиальной карциномы человека, имея IC_{50} в пределах от 0.55 мкМ до 2.33 мкМ (Рис. 63). Примечательно, что применяемый при лечении этого типа рака препарат цисплатин был менее активен и имел IC_{50} , которые были больше аналогичных значений для FrA в 2–6 раз (Рис. 63). Клетки рака мочевого пузыря линии RT112 были наиболее чувствительны к действию FrA, и поэтому были выбраны далее для дальнейшего изучения действия данного соединения на этом типе рака человека [299].

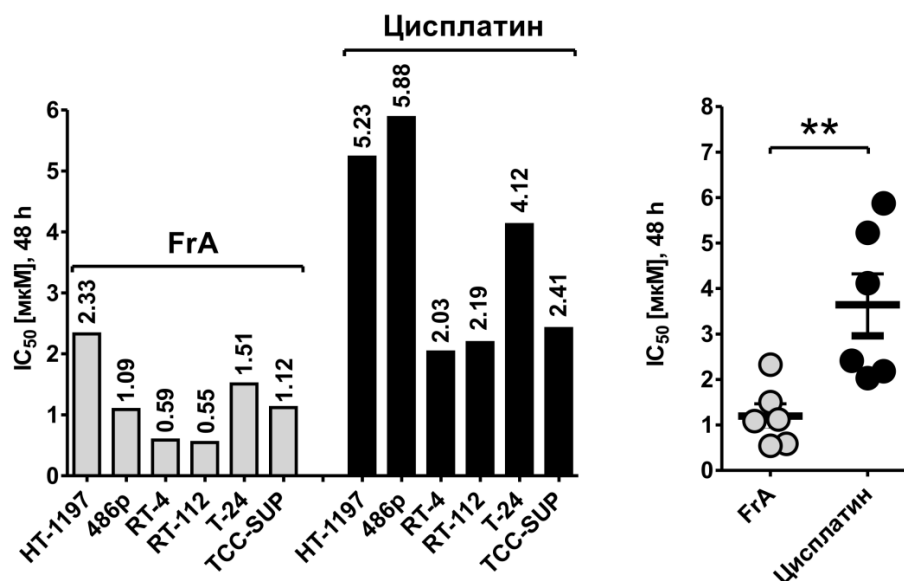


Рисунок 63. Эффект FrA и цисплатина на жизнеспособность шести линий клеток уротелиальной карциномы человека. Эффекты были измерены с использованием автоматического счётчика жизнеспособных клеток с применением окрашивания трипановым синим после 48 ч обработки клеток веществом. ** – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.01$, t-тест Стьюдента)

3.4.2.2. Исследование апоптоз-индуцирующего эффекта FrA в клетках уротелиальной карциномы человека

При обработке FrA клеток RT112 были обнаружены такие маркеры апоптоза, как дозозависимая активация каспаз и расщепление PARP (Рис. 64), фрагментация ДНК (Рис. 65А), а также экстернализация фосфатидилсерина (Рис. 65Б). Дополнительно влияние FrA на некоторые про- и антиапоптотические белки было исследовано с помощью Вестерн-блоттинга (Рис. 64). Было обнаружено увеличение экспрессии проапоптотических белков Вах и р21 (Рис. 64), в то же время не было обнаружено какого-либо изменения экспрессии белков р-Akt, р53, Bad, Pak1, сурвивина и Bcl-2 (данные не приведены). Анализ с использованием метода проточной цитометрии не выявил какого-либо существенного эффекта FrA на прогрессию клеточного цикла клеток RT112 (данные не показаны) [299].

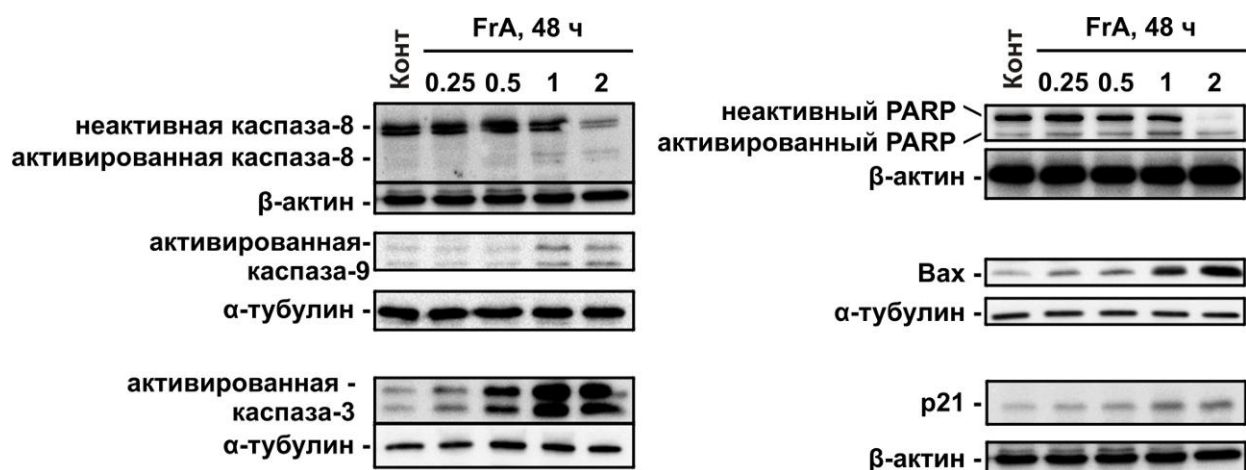


Рисунок 64. Вестерн-блоттинг анализ некоторых проапоптотических белков в клетках RT112, обработанных FrA в течение 48 ч

3.4.2.3. Исследование роли каспаз в FrA-индуцируемом апоптозе

Известно, что многие противоопухолевые препараты реализуют своё цитотоксическое действие через каспаза- и p53-ассоциированные сигнальные пути. В то же время эти пути зачастую являются дефектными в опухолевых клетках, что с большой долей вероятности может привести лекарственной устойчивости опухолевых клеток [106, 109]. Поэтому была исследована роль данных двух сигнальных каскадов в апоптозе, индуцируемом FrA в клетках RT112. Было показано, что FrA индуцирует активацию каспаз-3, -8, и -9 (Рис. 64). Однако ингибирование активности каспаз посредством обработки клеток ингибитором z-VAD-fmk не снижало проапоптотический эффект FrA в клетках RT112 (Рис. 65B). В то же время проапоптотический эффект анизомицина значительно снижался под действием ингибитора z-VAD-fmk (Рис. 65B). Таким образом, был сделан вывод о каспаза-независимом характере апоптоза, индуцируемого FrA в клетках уротелиальной карциномы человека [299].

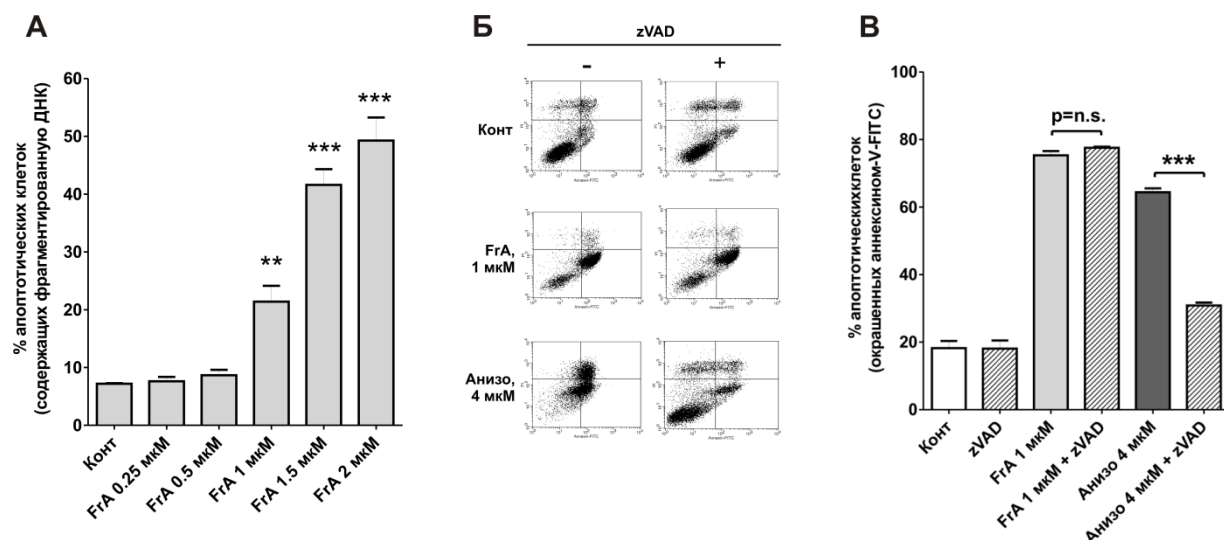


Рисунок 65. Исследование проапоптотического эффекта FrA методом проточной цитометрии. **(А)** Результаты исследования прогрессии клеточного цикла клеток RT112 под действием FrA. Клетки были обработаны в течение 48 ч, окрашены PI, и содержание ДНК было измерено с помощью метода проточной цитометрии. Клетки, обнаруженные в суб-G1-фазе, считали апоптотическими. **(Б, В)** Эффект ингибитора активности каспаз z-VAD-fmk на проапоптотический эффект FrA или анизомицина (Анизо). Клетки были предварительно обработаны 100 мкМ ингибитора z-VAD-fmk в течение 1 ч, а затем указанными концентрациями FrA или анизомицина в течение 48 ч. Экстернализация фосфатидилсерина была измерена методом проточной цитометрии с использованием двойного окрашивания аннексином-V-FITC и PI. На рисунке представлены первичные гистограммы **(Б)** а также их количественная оценка **(В)**. Клетки, окрашенные аннексином-V-FITC, считали апоптотическими. Статистически достоверное отличие от контроля: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ (t-тест Стьюдента)

Известно, что клетки RT112 экспрессируют дикий тип белка p53. [300]. Было показано, что обработка клеток FrA не приводила к изменению общего уровня экспрессии белка p53 (Рис. 66А). Подавление же экспрессии гена P53 с использованием малой интерферирующей РНК (siRNA) привело к существенному снижению уровня белка p53 в клетках RT112 (Рис. 66Б). Цитотоксический эффект цисплатина был существенно ниже в клетках с пониженным уровнем экспрессии p53, по сравнению с контрольными клетками (Рис. 66В), в то же время эффективность FrA в клетках со сниженной экспрессией p53 не была снижена (Рис. 66В). Кроме того, предварительная обработка клеток пифитрином- α – химическим ингибитором активности p53 – приводила к подавлению цитотоксической активности цисплатина, но не FrA (Рис. 66Г, Д). Полученные данные свидетельствуют о

том, что FrA сохраняет свою активность в опухолевых клетках, экспрессирующих мутантный нефункциональный p53 [299].

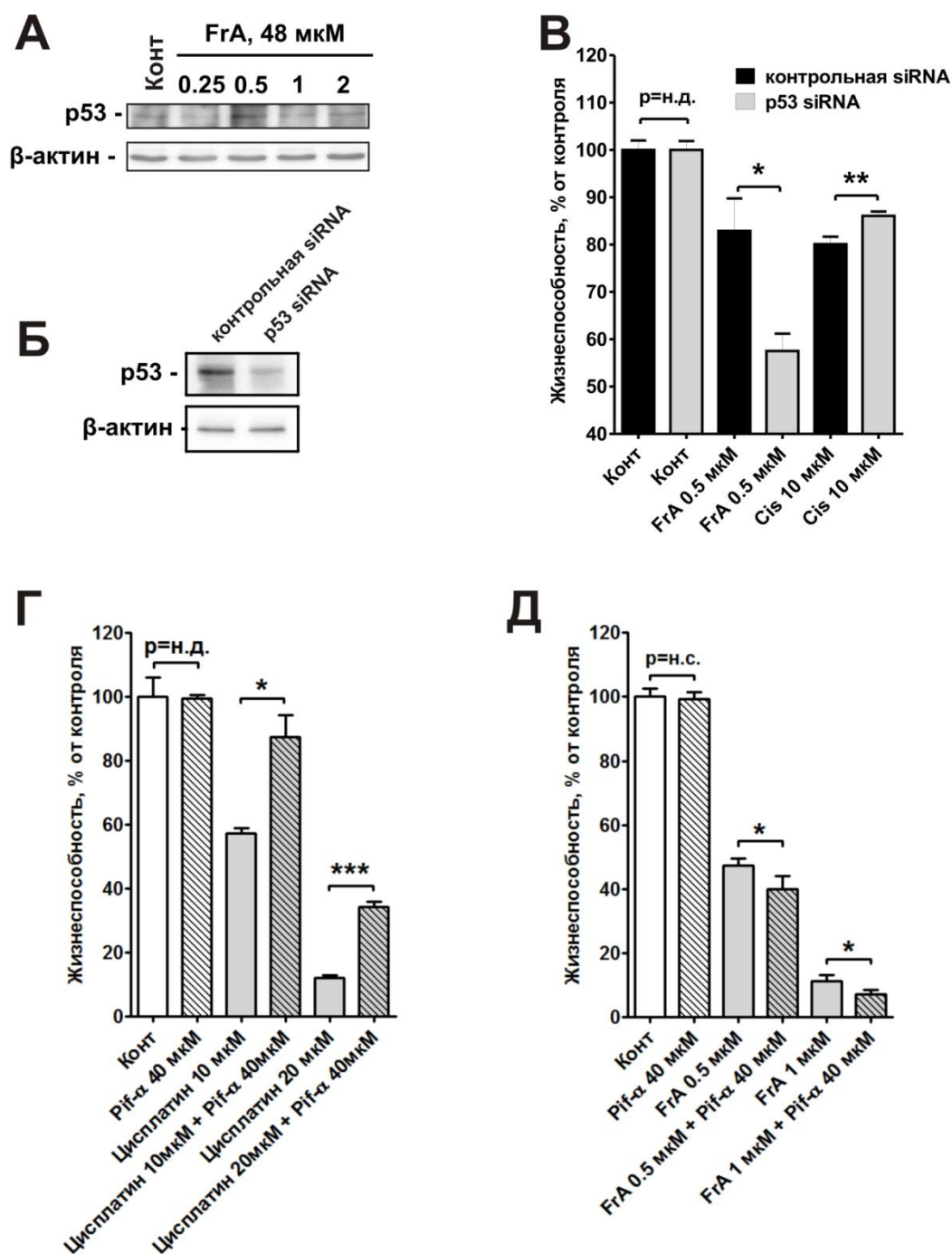


Рисунок 66. Эффект подавления экспрессии белка p53 на цитотоксическую активность FrA. (А) Эффект FrA на экспрессию p53 в клетках RT112 после обработки в течение 48 ч. (Б) Эффект трансфекции клеток RT112 с помощью p53 siRNA или контрольной несмысловой siRNA. (В) Жизнеспособность клеток с подавленным уровнем экспрессии p53, обработанных FrA или цисплатином в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток была проанализирована с помощью метода проточной цитометрии с

использованием двойного окрашивания аннексином-V-FITC / PI. Жизнеспособные клетки определяли как клетки, находящиеся в левом нижнем квадранте (анализ был проведён с помощью программы Cell Quest Pro). (Г, Д) Эффект пифитрина- α (Pif- α) – ингибитора транскрипционной активности p53 – на цитотоксическую активность FrA и цисплатина в нетрансфицированных клетках RT112. Клетки были обработаны 40 мкМ Pif- α в течение 30 мин, а затем FrA (Г) или цисплатином (Д) в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток была исследована с помощью метода МТТ. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.4.2.4. Исследование эффекта FrA на MAPK в клетках RT112

Митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) могут играть как пропролиферативную, так и проапоптотическую роли в клетках уротелиальной карциномы человека [301, 302]. После обработки клеток FrA в течение короткого времени (1 ч) наблюдалось ингибирование фосфорилирования киназ p38 и ERK1/2, но при этом активировалась киназа JNK1/2 (Рис. 67А). Кроме того, активация JNK1/2 была обнаружена после длительного воздействия FrA на клетки в течение 48 ч (Рис. 67Б). Для того чтобы понять роль активации JNK1/2 в клеточном ответе на обработку FrA был использован SP600125 – известный ингибитор активности JNK1/2. Исследование эффекта SP600125 на цитотоксическую активность FrA выявило синергический эффект (Рис. 67В), что говорит о цитопротекторной роли активации JNK1/2 в обработанных FrA клетках RT112 [299].

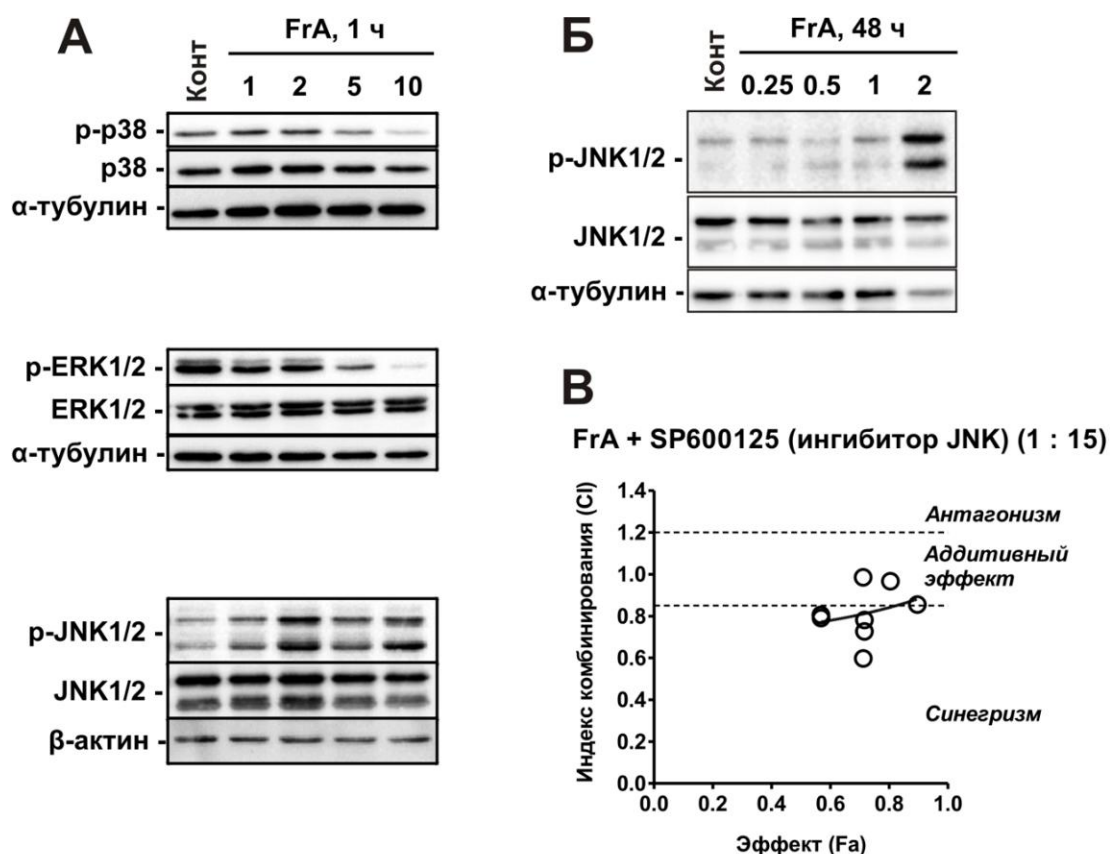


Рисунок 67. Эффект FrA на MAPK. (А, Б) Вестерн-блоттинг анализ MAPK в клетках RT112, обработанных FrA в течение 1 ч (А) или 48 ч (Б). (С), Эффект SP600125 (специфический ингибитор JNK1/2) на жизнеспособность клеток RT112, обработанных FrA в течение 48 ч. Клетки были предварительно обработаны 20 мкМ или 40 мкМ SP600125 в объёме культуральной среды 50 мкл/лунку в течение 1 ч, а затем FrA в течение 48 ч. Соотношение концентраций веществ было постоянным $C(\text{FrA}) : C(\text{SP600125}) = 1 : 15$. Индекс комбинирования (CI) был рассчитан с помощью программы CompuSyn 1.0. Жизнеспособность клеток была измерена с использованием окрашивания клеток красителем трипановым синим

3.4.2.5. Исследование эффекта FrA на аутофагию в клетках уротелиальной карциномы

Известно, что индукция цитопротекторной аутофагии является одним из основных механизмов лекарственной устойчивости в клетках уротелиальной карциномы человека [119, 168, 303, 304]. Было показано, что FrA индуцирует время- и дозозависимую аккумуляцию белков LC3B-II и SQSTM1/p62, что является маркером ингибирования аутофагии (Рис. 68А, Б). Примечательно, что максимальный уровень экспрессии белка

SQSTM1/p62 был обнаружен через 2 ч после начала обработки клеток, в то время как для белка LC3B-II это время составило 48 ч (Рис. 68А, Б) [299].

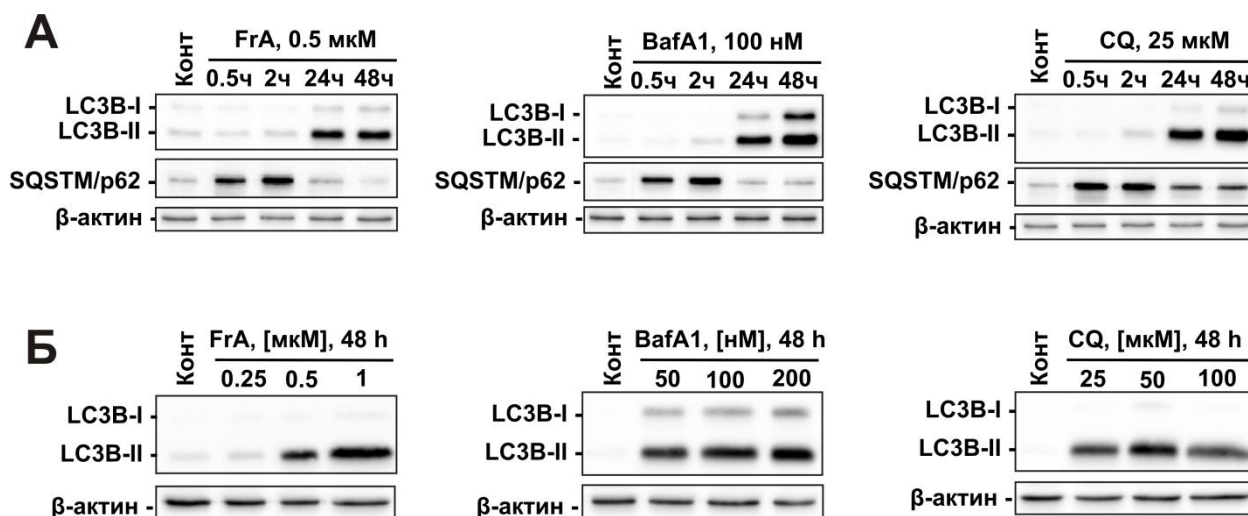


Рисунок 68. Вестерн-блоттинг анализ белков LC3B-I/II и SQSTM1/p62 в клетках RT112, обработанных одной концентрацией FrA, BafA1 или CQ в течение 0.5–48 ч (**А**); или разными концентрациями этих веществ в течение 48 ч (**Б**)

Кроме того, было показано, что повышенная интенсивность окрашивания обработанных FrA клеток LC3B-I/II-специфичными антителами была связана с аккумуляцией аутофагосом, что также подтверждает факт ингибирования аутофагии (Рис. 69А, Б). Более того, схожие эффекты наблюдались в клетках, обработанных известными ингибиторами аутофагии – BafA1 и CQ (Рис. 69А), что говорит о сходном молекулярном действии этих соединений, т.е. способности ингибировать аутофагию.

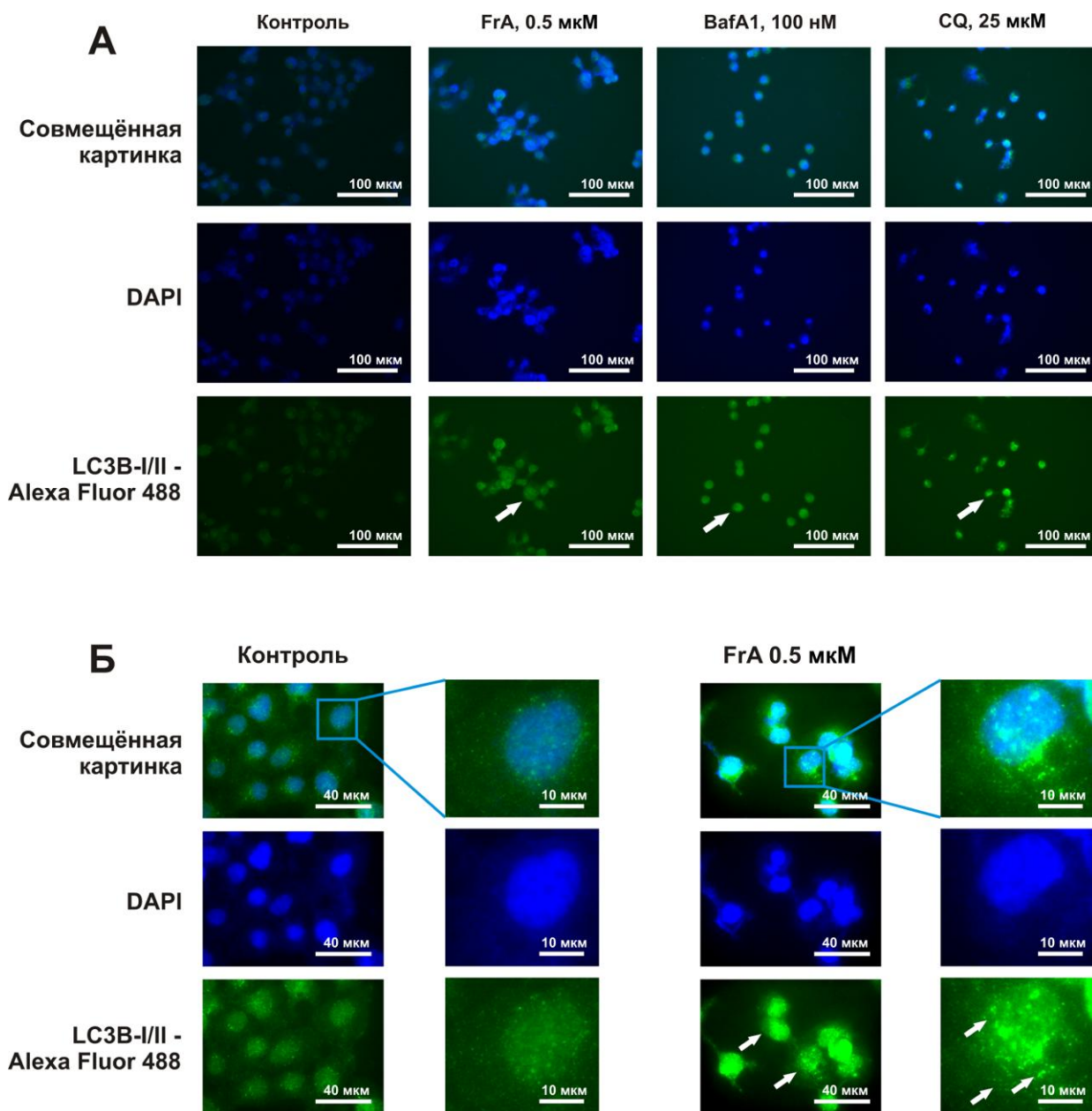


Рисунок 69. Аккумуляция аутофагосом под действием FrA, BafA1 или CQ на клетки RT112. Клетки были обработаны исследуемыми веществами в течение 48 ч, зафиксированы, пермеабиллизированы и проинкубированы с первичными антителами к LC3B-I/II, а затем со вторичными антителами, меченными Alexa Fluor 488. Снимки были сделаны на разрешение $\times 400$ (А) или $\times 1000$ (Б). Органеллы, окрашенные антителами к LC3B-I/II (аутофагосомы и аутолизосомы), обозначены стрелками

3.4.2.6. Исследование комбинированного действия FrA с цисплатином или гемцитабином на клетки уротелиальной карциномы человека

Цитотоксический эффект FrA был исследован на клетках RT112 при его комбинации с двумя стандартными препаратами – цисплатином и гемцитабином, применяемыми в химиотерапии уротелиальной карциномы человека. Примечательно, что FrA проявил сильный синергический эффект в комбинации с каждым из двух препаратов (Рис. 70А, Б) [299].

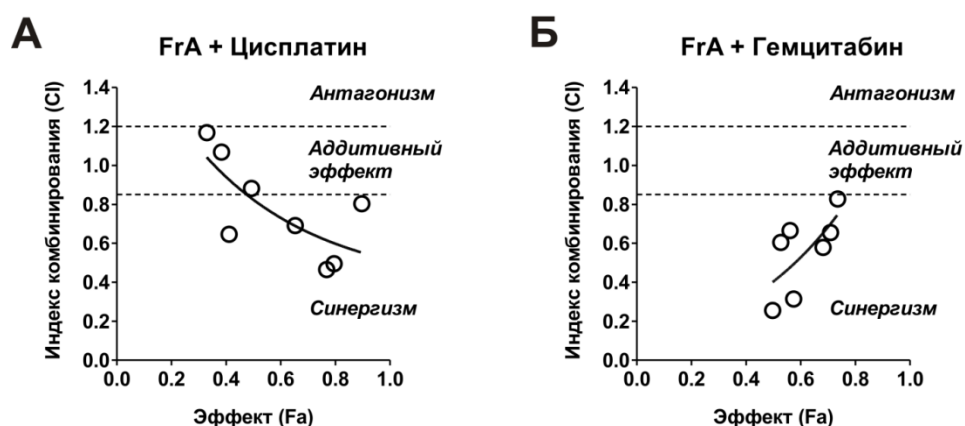


Рисунок 70. Эффект FrA в комбинации его с цисплатином или гемцитабином. Клетки RT112 были обработаны индивидуальными веществами или их комбинациями в молярном соотношении $C(\text{FrA}) : C(\text{цисплатин}) = 1 : 4$ (А) and $C(\text{FrA}) : C(\text{гемцитабин}) = 1 : 0.25$ (Б) в течение 48 ч. Индекс комбинирования (CI) был рассчитан с помощью программы CompuSyn v.1.0. Жизнеспособность клеток была измерена с использованием автоматического счёта клеток, окрашенных красителем трипановым синим

3.4.2.7. Обсуждение результатов исследования эффекта FrA на клетки уротелиальной карциномы человека

Основанная на применении цисплатина химиотерапия является стандартной терапией первой линии при прогрессирующей и метастатической уротелиальной карциноме. Однако в 40–70% случаев наблюдаются рецидивы, и большинство пациентов умирает вследствие развития лекарственной устойчивости [110, 115, 303].

В настоящем исследовании было показано, что FrA был более эффективен в сравнении с цисплатином по отношению к клеткам уротелиальной карциномы человека *in vitro*. Цитотоксичность FrA реализовывалась посредством индукции апоптоза, который был ассоциирован с активацией каспаз-3, -8, и -9 и расщеплением PARP, а также с

регуляцией белков Вах и p21. Кроме того, обработка клеток FgA приводила к ингибированию активных форм киназ p38 и ERK1/2 и одновременной активации JNK1/2. Активация JNK1/2 может играть про- или антиапоптотическую роль в зависимости от типа клеток, природы стимула и других факторов [305]. Поскольку в данном конкретном случае ингибирование JNK1/2 приводило к усилению цитотоксического эффекта FgA, то был сделан вывод о том, что фосфорилированная форма JNK1/2 может частично ингибировать эффект FgA в клетках уротелиальной карциномы человека. Однако данное утверждение требует дальнейшего более детального подтверждения.

Проапоптотические пути, связанные с активацией каспаз, могут быть зачастую нефункциональны в опухолевых клетках. Это может быть обусловлено экспрессией эндогенных ингибиторов каспаз; с мутацией генов, кодирующих каспазы и другие молекулы данного каскада; а также с низким уровнем экспрессии данных генов [106]. Также следует упомянуть, что более 50% всех злокачественных опухолей человека (и более 60% опухолей уротелиальной карциномы [116]) экспрессируют мутантный белок p53, не выполняющий функции супрессора опухолей, или не экспрессируют его вообще. Это явление часто бывает ассоциированным с ускоренной прогрессией опухолей и неблагоприятным терапевтическим прогнозом [109, 117, 118]. Таким образом, вещества, которые способны индуцировать апоптоз независимо от наличия и активности каспаз и белка p53, могут быть интересны с клинической точки зрения [109]. Примечательно, что индукция апоптоза в клетках RT112 при обработке их FgA не требовала наличия ферментативной активности каспаз, хотя увеличение уровня активных форм каспаз отмечено в обработанных веществом клетках. Наблюдаемая активация каспаз скорее всего является вторичным событием, возникающим вследствие других цитотоксических эффектов FgA [142, 224]. Кроме того, было показано другое очень важное свойство FgA, а именно – его способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток вне зависимости от наличия и активности белка p53. Данное свойство FgA было доказано с помощью двух методов – подавления экспрессии гена p53 с помощью siRNA, а также ингибирования транскрипционной активности p53 при помощи пифитрина-α. В подтверждение этих результатов было показано, что FgA проявляет одинаковую активность по отношению к клеткам уротелиальной карциномы человека, экспрессирующим как дикий (линии RT112, RT4 и HT-1197), так и мутантный (линии T-24 и TCC-SUP) тип белка p53 [300]. Примечательно, что FgA был даже немного более активен в клетках с подавленной экспрессией или пониженной активностью белка p53. В противоположность этому цисплатин был менее активен в данных клетках. Последний факт может говорить о том,

что эффективность этого классического химиотерапевтического агента носит p53-зависимый характер.

Недавно цитопротекторная аутофагия была описана как один из важных механизмов лекарственной устойчивости клеток уротелиальной карциномы человека [119, 303, 304]. Ингибирование аутофагии вело к гибели клеток этого типа рака, а также приводило к их сенсibilизации по отношению к химиотерапевтическим препаратам [119, 303]. В настоящей работе было показано, что FrA способен индуцировать апоптоз и, в отличие от других цитотоксических веществ, одновременно ингибировать аутофагию в клетках уротелиальной карциномы. Также было показано, что FrA проявляет сильный синергический эффект при его комбинировании с другими химиотерапевтическими препаратами. Этот эффект по крайней мере отчасти может быть объяснён способностью FrA ингибировать цитопротекторную аутофагию, поскольку аналогичный эффект наблюдался ранее при комбинации цисплатина с другими ингибиторами аутофагии на клетках уротелиальной карциномы человека [303].

В заключение следует отметить, что уникальная комбинация противоопухолевых свойств, а именно способность индуцировать каспаза- и p53-независимый апоптоз, ингибировать цитопротекторную аутофагию и усиливать эффект известных противоопухолевых препаратов делают FrA перспективным веществом для терапии уротелиальной карциномы человека.

3.4.3. Исследование активности FrA на моделях лимфомы Бёркитта

3.4.3.1. Исследование эффекта FrA на жизнеспособность клеток лимфомы Бёркитта

Для FrA была показана способность время- и дозозависимо ингибировать жизнеспособность восьми линий клеток лимфомы Бёркитта (Рис. 71). После обработки клеток FrA в концентрации 0.3 мкМ в течение 48 ч жизнеспособность этих клеток снижалась до 13–68% (Рис. 71) [306].

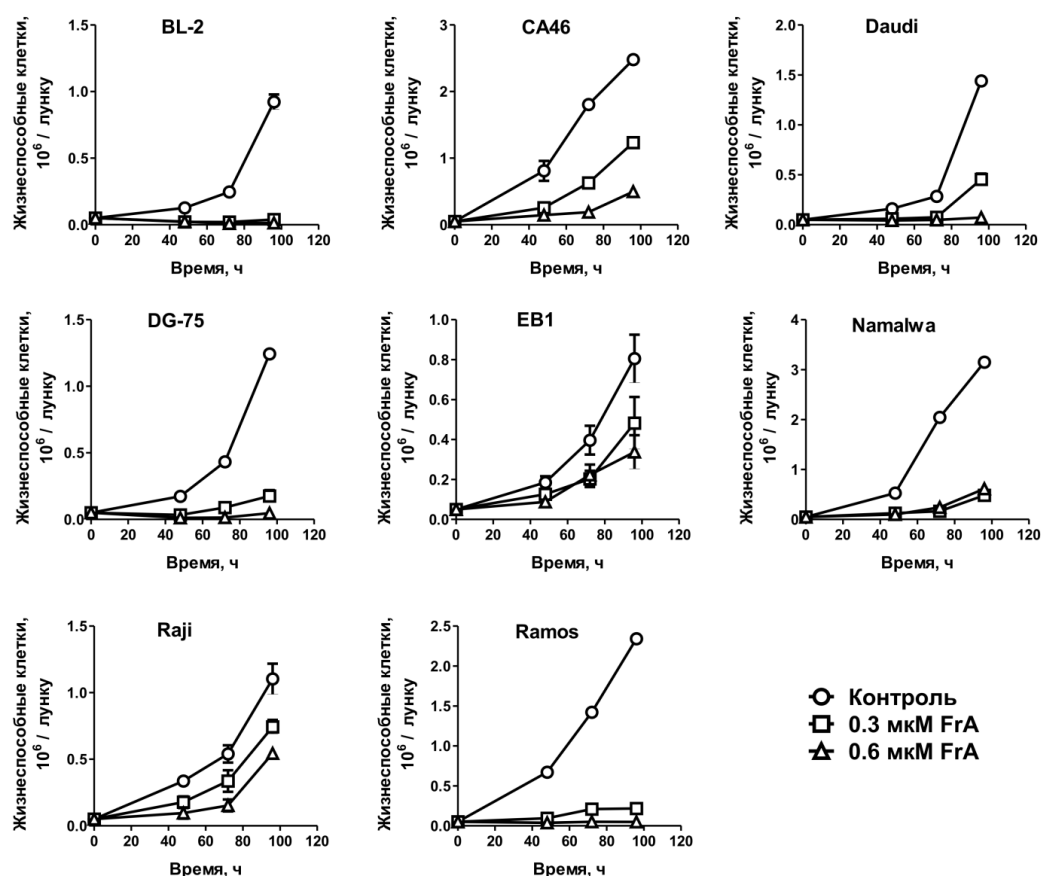


Рисунок 71. Эффект FrA на жизнеспособность клеток восьми клеточных линий лимфомы Бёркитта. Эффекты 0.3 мкМ и 0.6 мкМ FrA были измерены с использованием автоматического счета жизнеспособных клеток с применением окрашивания трипановым синим после 48 ч обработки клеток веществом

3.4.3.2. Эффект FrA на прогрессию клеточного цикла клеток лимфомы Бёркитта

Для дальнейших экспериментов были выбраны клеточные линии CA46 (устойчивые к цитотоксическим стимулам, экспрессирующие мутантный p53), Namalwa и Ramos (чувствительные к цитотоксическим стимулам, экспрессирующие мутантный p53) и BL-2 (чувствительные к цитотоксическим стимулам, экспрессирующие дикий тип (wild type) p53). Была показана способность FrA ингибировать прогрессию клеточного цикла клеток лимфомы Бёркитта в фазе G1 (Рис. 72А, Б). Эффект на прогрессию клеточного цикла был менее существенен, чем апоптоз-индуцирующий эффект соединения (Рис. 72А, В) [306].

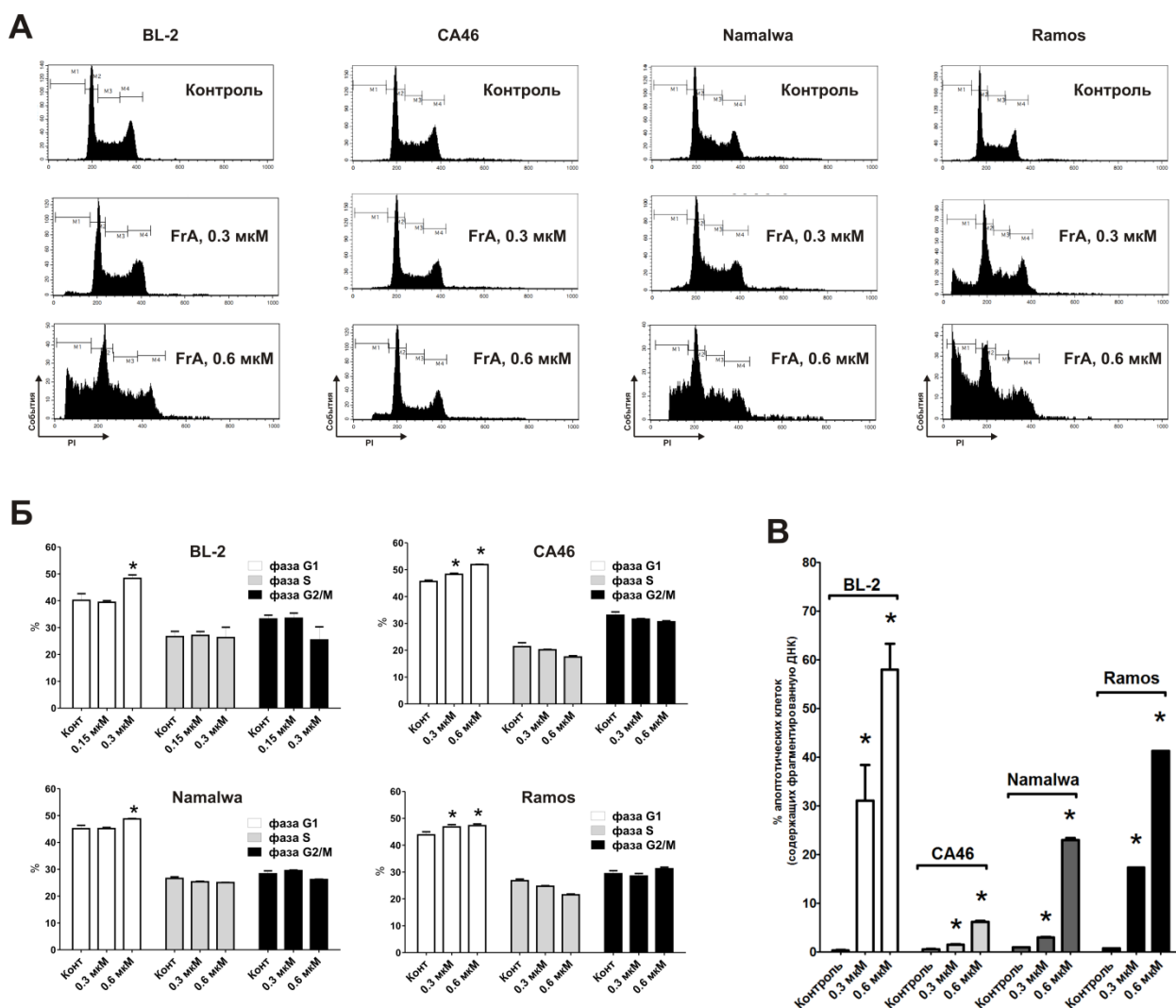


Рисунок 72. Результаты исследования эффекта FrA на прогрессию клеточного цикла клеток лимфомы Бёркитта BL-2, CA46, Namalwa и Ramos. Клетки были обработаны в течение 48 ч, окрашены PI, и содержание ДНК было измерено (А) и оценено количественно (Б) с помощью метода проточной цитометрии. Клетки, находящиеся в суб-G1-фазе, считали апоптотическими (В). * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.4.3.3. Исследование способности FrA индуцировать каспаза-независимый апоптоз клеток лимфомы Бёркитта

С помощью методов проточной цитометрии и Вестерн-блоттинга была показана экстернализация фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточной мембраны (Рис. 73А, Б), фрагментация ДНК (Рис. 72А, В), а также активация каспазы-3 в обработанных FrA клетках лимфомы Бёркитта (Рис. 74А), что говорит об индукции апоптоза под действием FrA на клетки. Дефекты в проапоптотических сигнальных путях, ассоциированных с каспазой-3, являются одной из причин развития устойчивости лимфом к химиотерапии

[104, 106]. Поэтому была предпринята попытка более детально исследовать роль данного сигнального пути в индуцируемом FrA апоптозе. Такие эксперименты были проведены на четырёх линиях клеток – BL-2, CA46, Namalwa и Ramos. Анизомидин был использован в качестве положительного контроля. Было показано, что ингибитор активности каспаз z-VAD-fmk был способен значительно снижать цитотоксический и апоптоз-индуцирующий эффект анизомидина в клетках BL-2, Namalwa и Ramos (Рис. 73В, Г). Данный факт говорил о том, что функционирующие сигнальные каскады, проходящие через активацию каспаз, являются необходимыми для осуществления цитотоксического действия апоптоз-индуцирующего агента анизомидина в клетках лимфомы Бёркитта. В то же время, ингибирование активности каспаз с помощью z-VAD-fmk не приводила к уменьшению цитотоксического эффекта FrA ни в одной из четырёх исследуемых клеточных линий (Рис. 73А, Б) [306].

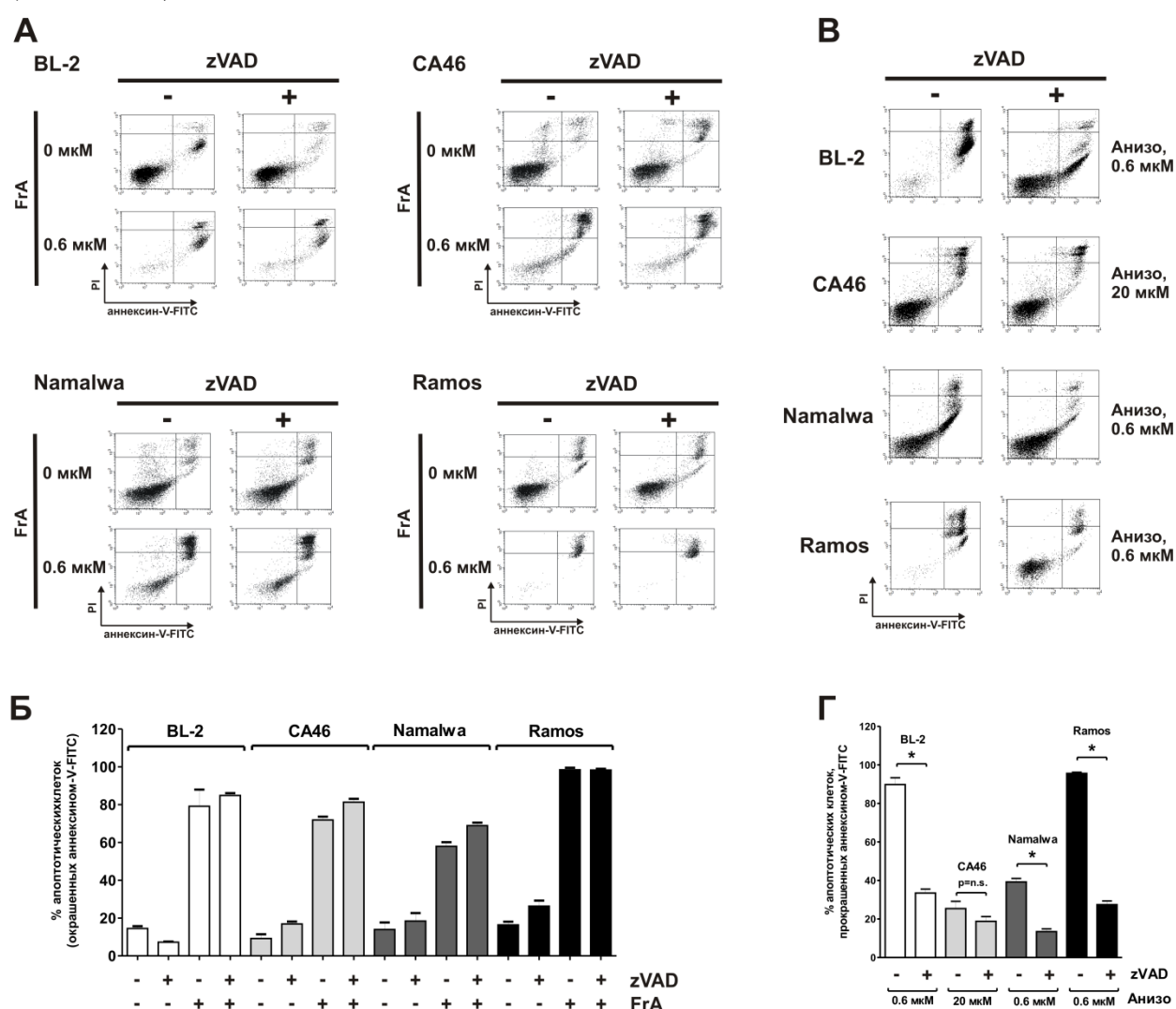


Рисунок 73. Исследование проапоптотического эффекта FrA (А, Б) и анизомидина (Анизо, В, Г) методом проточной цитометрии. Клетки были предварительно обработаны

100 мкМ ингибитора z-VAD-fmk в течение 1 ч, а затем указанными концентрациями FrA или анизомицина в течение 48 ч. Экстернализация фосфатидилсерина на внешнюю сторону клеточной мембраны была измерена методом проточной цитометрии с использованием аннексина-V-FITC и PI в качестве красителей. На рисунке представлены первичные гистограммы (А, В), а также их количественная оценка (Б, Г). Клетки, окрашенные аннексином-V-FITC считали апоптотическими. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, для клеток BL-2, Namalwa и Ramos была показана только умеренная активация каспазы-3 под действием FrA (Рис. 74А), в то время как в обработанных анизомицином клетках активация каспазы-3 была намного более выраженной (Рис. 74Б). На основании этих результатов было сделано предположение, что апоптоз, индуцируемый в клетках лимфомы Бёркитта под действием FrA является каспаза-независимым [306].

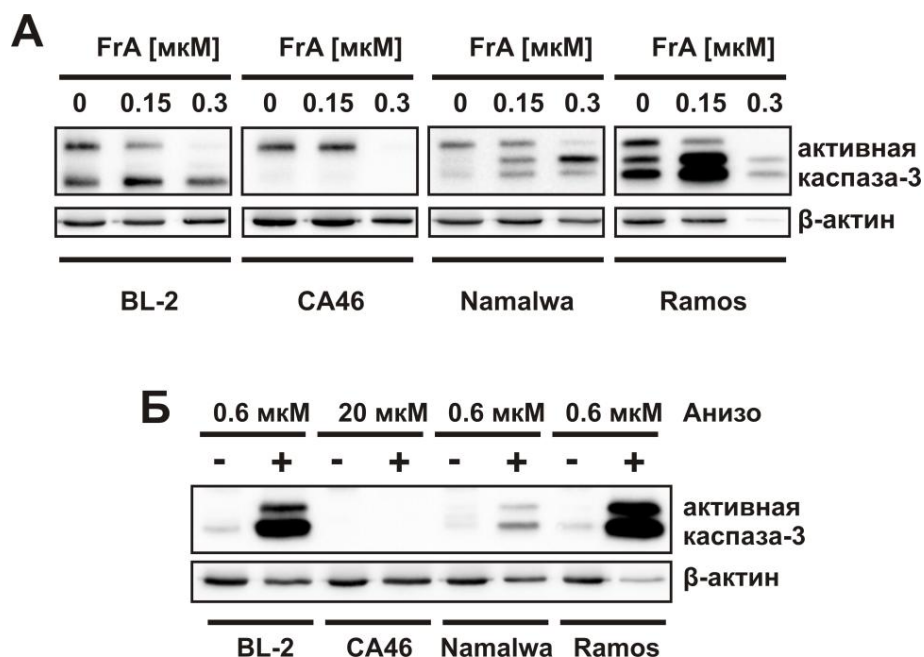


Рисунок 74. Вестерн-блоттинг анализ активированной каспазы-3 в клетках лимфомы Бёркитта, обработанных FrA (А) или анизомицином (Б) в течение 48 ч

Примечательно, что в устойчивых к различным цитотоксическим стимулам клетках CA46 анизомицин был способен индуцировать апоптоз только в очень высокой концентрации – 20 мкМ (апоптоз был детектирован с помощью метода проточной цитометрии, рис. 73В, Г), в то время как по отношению к остальным клеткам анизомицин был намного более активен, и значительная индукция апоптоза наблюдалась в концентрации 0.6 мкМ (Рис. 73В, Г). Кроме того, z-VAD-fmk не был способен

ингибировать анизомицин-индуцируемый апоптоз в клетках CA46 (Рис. 73В, Г). Этот феномен может быть, по крайней мере частично, объяснён значительно более низким уровнем экспрессии каспазы-3 в клетках CA46 (и, как следствие, более низким проапоптотическим эффектом активации данного белка в этих клетках, рис. 75А), а также общей устойчивостью данной клеточной линии к апоптоз-индуцирующим стимулам вследствие низкой экспрессии (или её полного отсутствия) таких проапоптотических белков как Bax, Bak и Bcl-xL [104]. В противоположность этому, FgA был высокоцитотоксичен по отношению к клеткам CA46, и уровень активности FgA в данных клетках был сравним с активностью по отношению к другим клеточным линиям (Рис. 73А, Б).

Кроме того, в клетках CA46, обработанных FgA в течение 48 ч, было обнаружено расщепление PARP и снижение экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и сурвивина (Рис. 75Б). Известно, что экспрессия сурвивина в образцах биопсии лимфомы Бёркитта является признаком неблагоприятного прогноза лечения [307]. Изменения экспрессии таких белков как p21 и PTEN в обработанных FgA клетках CA46 не было выявлено (данные не показаны) [306].

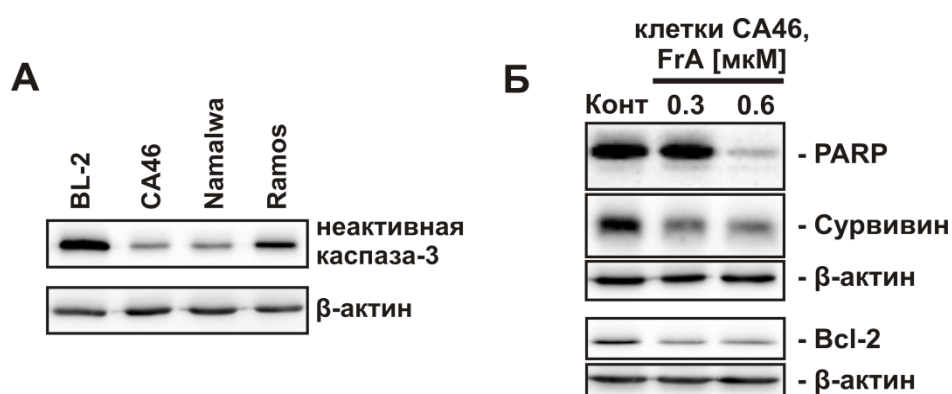


Рисунок 75. Вестерн-блоттинг анализ экспрессии некоторых про- и антиапоптотических белков в клетках лимфомы Бёркитта, необработанных (А) или обработанных FgA в течение 48 ч (Б)

3.4.3.4. Исследование эффекта FgA на митохондрии и транслокацию AIF в клеточное ядро

Направленное действие на митохондрий, ведущее к их пермеабиллизации, является одним из известных механизмов каспаза-независимой клеточной смерти [143, 144]. Поэтому мы исследовали эффект FgA на такие митохондриальные белки как цитохром С,

сериновая протеаза HtrA2/Omi и апоптоз-индуцирующий фактор (AIF), которые являются также наиболее хорошо изученными медиаторами каспаза-независимой клеточной смерти [144]. После выхода из митохондрий AIF транслоцируется в клеточное ядро, где он может вызывать конденсацию хроматина и последующую клеточную смерть. Присутствие активных форм каспаз не является необходимым для осуществления данного процесса [147]. Выход цитохрома C, HtrA2/Omi и AIF из митохондрий клеток CA46, BL-2 и Ramos, обработанных FrA в течение 48 ч, был подтверждён с помощью Вестерн-блоттинга (Рис. 76А). Более того, был обнаружен переход прекурсорной формы AIF (67 кДа) в апоптогенную форму (57 кДа) [146], а также увеличение уровня апоптогенной формы AIF в ядерной фракции обработанных FrA клеток (Рис. 76А). Выход AIF из митохондрий в цитоплазму был также подтверждён с помощью иммунофлуоресцентного анализа клеток CA46, обработанных FrA (Рис. 76Б) [306].

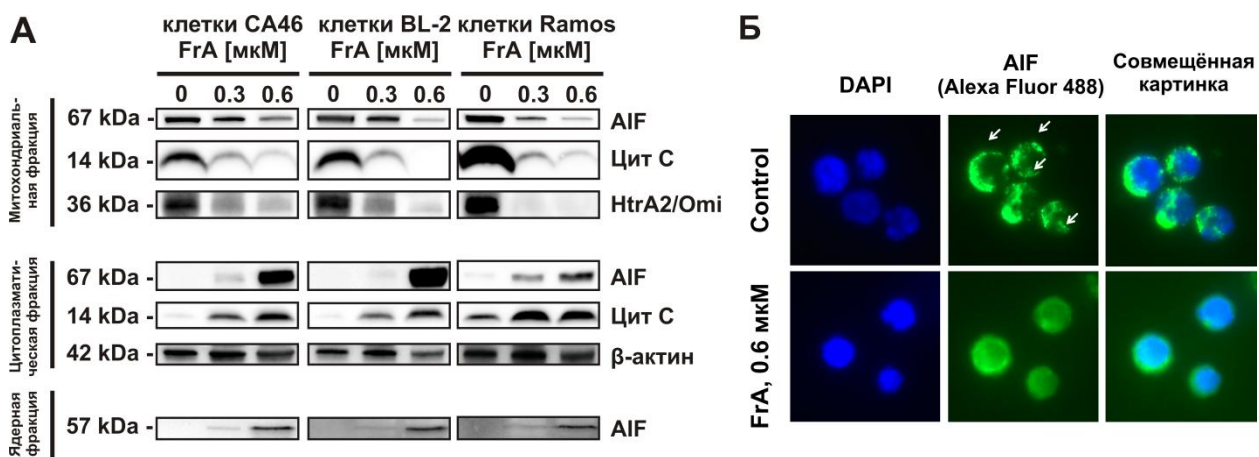


Рисунок 76. Эффект FrA на некоторые митохондриальные белки. (А) Клетки CA46, BL-2 и Ramos были обработаны FrA в течение 48 ч. Клеточные фракции были разделены, белки были экстрагированы с использованием набора Cell Fractionation Kit (abcam), и далее проанализированы с помощью Вестерн-блоттинга. (Б) Иммуноцитохимический анализ локализации AIF в клетках CA46, обработанных 0.6 мкМ FrA в течение 48 ч

В подтверждение идеи о том, что FrA направленно действует на митохондрии клеток лимфомы Бёркитта, было выявлено уменьшение продукции активных форм кислорода ROS в обработанных FrA клетках CA46 (Рис. 77) [306], что может быть объяснено нарушением митохондриальной целостности / функций [308].

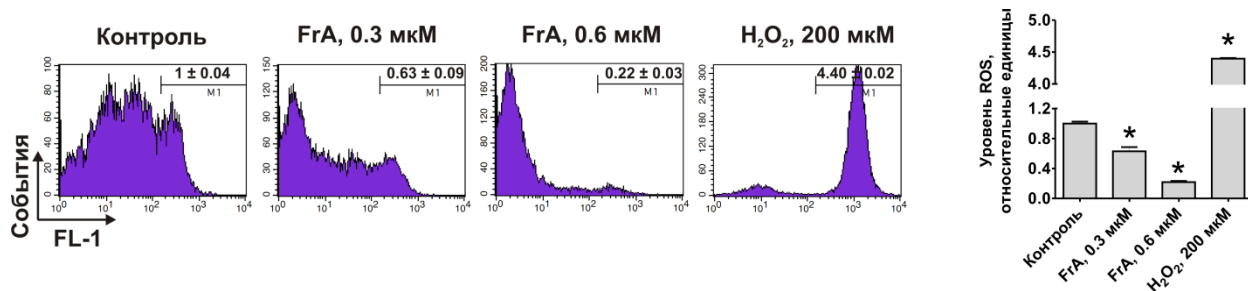


Рисунок 77. Эффект FrA на уровень ROS в клетках CA46. Клетки были последовательно обработаны CM-H₂DCFDA, а затем FrA или H₂O₂ в течение 2 ч, после чего проанализированы при помощи метода проточной цитометрии. Уровень ROS представлен в относительных единицах. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Наконец, был исследован эффект FrA на активацию каспазы-9, которая часто бывает активирована в ответ на выход цитохрома С из митохондрий (Рис. 78). Существенное увеличение ферментативной активности каспазы-9 было обнаружено в клетках, обработанных как FrA, так и аннимоцином (Рис. 78). Примечательно, что z-VAD-fmk был способен эффективно подавлять активность каспазы-9 (Рис. 78), в то время как ингибирующего эффекта на цитотоксическую активность FrA при этом не наблюдалось (Рис. 73А, Б) [306].

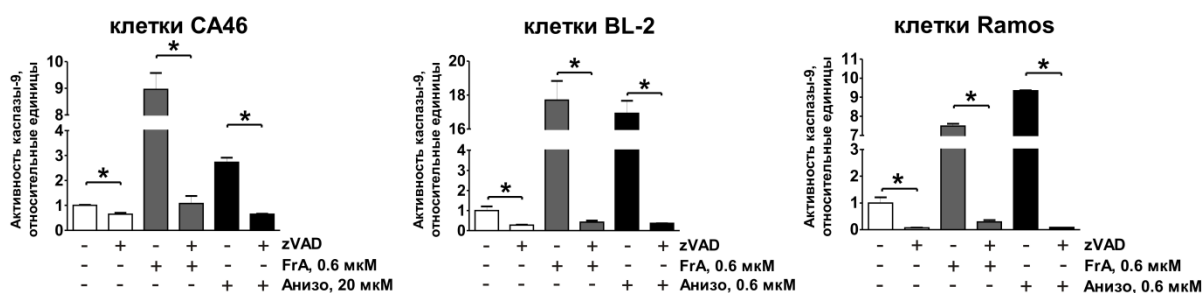


Рисунок 78. Анализ активности каспазы-9 в клетках лимфомы Бёркитта. Клетки были предварительно обработаны z-VAD-fmk (100 мкМ в течение 1 ч), а затем FrA или аннимоцином в течение 48 ч. Активность каспазы-9 была измерена с помощью набора Caspase-Glo® 9 Assay Kit (Promega) и нормализована по отношению к уровню клеточной жизнеспособности, измеренной с помощью MTS-теста. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.4.3.5. Исследование роли белка p53 в FgA-индуцируемом апоптозе клеток лимфомы Бёркитта

Было показано, что FgA проявляет одинаковую цитотоксическую активность в клетках лимфомы Бёркитта, экспрессирующих дикий (клетки BL-2 [309]) или мутантный тип p53 (клетки CA46 [310], Namalwa [311] и Ramos [311]) (Рис. 73А, Б). Это наблюдение позволяет предположить, что цитотоксический эффект FgA не зависит от статуса белка p53 в опухолевых клетках. Для того чтобы подтвердить данную гипотезу была исследована цитотоксическая активность FgA и цисплатина на клетках BL-2 (экспрессирующих дикий тип p53), после предварительной обработки клеток пифитрином- α (Pif- α), являющимся химическим ингибитором транскрипционной активности p53 [312]. Поскольку Pif- α в индивидуальном виде был умеренно цитотоксичен для клеток BL-2, то эксперимент по определению цитотоксической активности (MTS-тест) проводили по методу Чоу-Талалая [178]. Результат чётко показал аддитивный эффект FgA при его комбинации с Pif- α (Рис. 79А, В), в то время как цитотоксический эффект цисплатина при этом не был аддитивным (Рис. 79Б, В). Таким образом, эффект цисплатина был p53-зависимым, в то время как реализация цитотоксического эффекта FgA не требовала наличия функционального p53 [306].

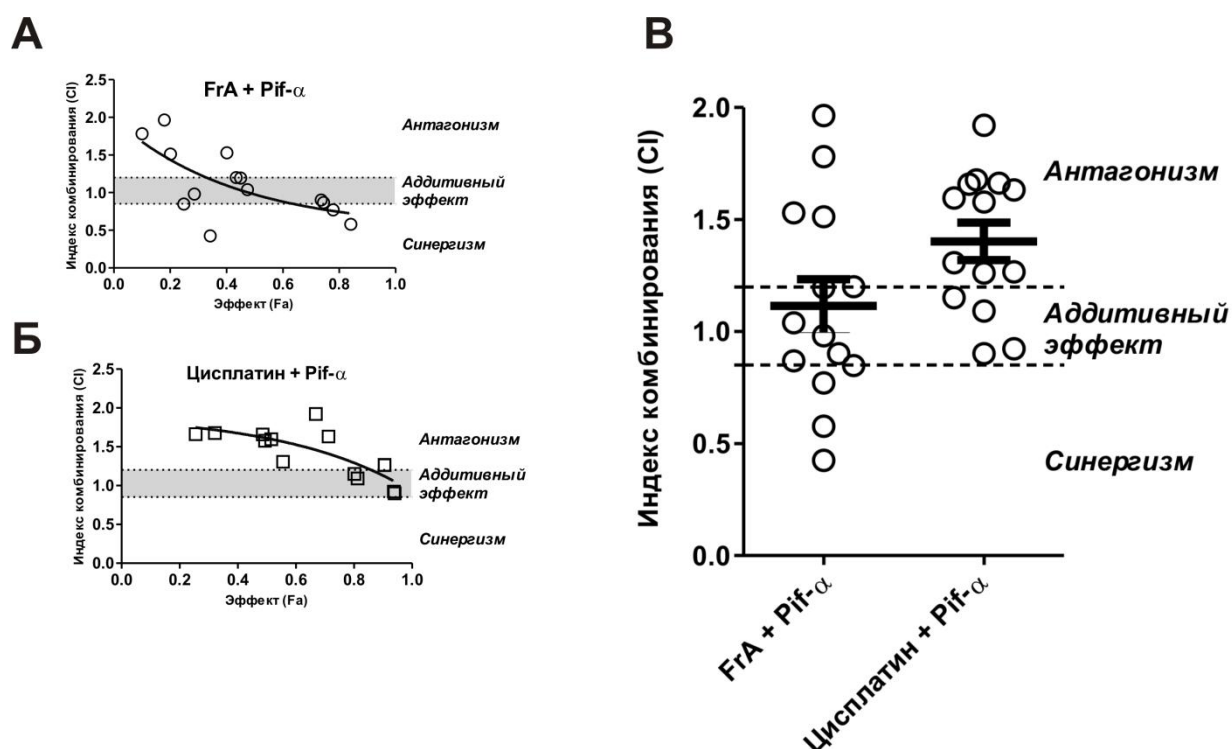


Рисунок 79. Эффект пифитрина- α (Pif- α , ингибитор транскрипционной активности p53) на жизнеспособность клеток BL-2, обработанных FgA или цисплатином в течение 48

ч. Клетки были предварительно обработаны 5–40 мкМ Pif-α в течение 1 ч, а затем различными концентрациями FrA (А, В) или цисплатина (Б, В) в течение 48 ч. Индекс комбинирования (CI) был рассчитан с помощью программы CompuSyn 1.0. Клеточная жизнеспособность была измерена с помощью MTS-теста

3.4.3.6. Действие FrA на аутофагию в клетках лимфомы Бёркитта

Белок LC3B-I и LC3B-II, а также SQSTM1/p62 являются важнейшими белками, принимающими участие в процессе аутофагии [175]. Известно, что одновременная аккумуляция данных белков является признаком ингибирования процесса аутофагии [175]. Мы обнаружили времязависимое накопление обоих белков в клетках CA46, обработанных FrA (Рис. 80). Эти данные свидетельствуют об ингибировании аутофагии в клетках лимфомы Бёркитта, что прекрасно согласуется с предыдущими наблюдениями эффекта исследуемого вещества в клетках рака простаты и клетках уротелиальной карциномы [306].

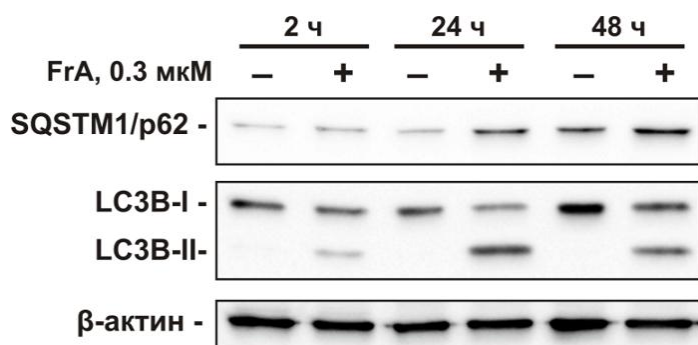


Рисунок 80. Вестерн-блоттинг анализ уровня белков LC3B-I/II и SQSTM1/p62 в клетках CA46, обработанных FrA в течение 48 ч

3.4.3.7. Обсуждение результатов исследования активности FrA на моделях лимфомы Бёркитта

Устойчивость к химиотерапии при лечении лимфом часто бывает связана с устойчивостью к апоптозу, индуцируемому химиотерапевтическими препаратами [104, 105]. В свою очередь это может быть связано с дефектами в каспаза-зависимых сигнальных путях [105, 106], а также мутациями или отсутствием экспрессии в клетках белка p53 [105, 107, 108]. Поэтому вещества, способные индуцировать апоптоз независимо от наличия активных каспаз и/или p53, имеют высокий потенциал [109].

В настоящей работе была исследована противоопухолевая *in vitro* активность морского природного соединения FrA на клетках лимфомы Бёркитта. FrA показал цитотоксическую активность по отношению к данному типу рака в наномолярных концентрациях (включая клетки CA46, которые являются устойчивыми к множественным цитотоксическим стимулам вследствие пониженной экспрессии ряда проапоптотических белков) [104]. Апоптотические маркеры, такие как активирование каспазы-3, расщепление PARP, экстернализация фосфатидилсерина и фрагментация ДНК, а также снижение экспрессии антиапоптотических белков, были обнаружены в обработанных FrA клетках. При этом ингибирование активности каспаз с помощью z-VAD-fmk не приводило к снижению цитотоксической активности FrA. В то же время наличие активных каспаз было критично для реализации цитотоксической активности анизомицина. Также эффект анизомицина на активацию каспаз был значительно более выражен по сравнению с эффектом FrA. Кроме того, FrA был одинаково активен в клетках с низким (CA46 и Namalwa) и высоким (BL-2 и Ramos) уровнем экспрессии каспазы-3, в то время как активность анизомицина коррелировала с уровнем экспрессии данного белка. На основании полученных данных был сделан вывод о способности FrA индуцировать неклассический каспаза-независимый апоптоз в клетках лимфомы Бёркитта. При этом наблюдаемая под действием FrA на клетки активация каспаз, скорее всего, является вторичным событием, происходящим в результате активации других цитотоксических процессов под действием FrA на клетки [142, 224].

В общем случае каспаза-независимая клеточная смерть может быть реализована по одному из нескольких сценариев, включающих некроптоз, индуцируемый посредством активации «рецептора смерти», а также митохондриальный или лизосомный стресс, либо стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [142, 143, 313]. Последние три события часто инициируются низкомолекулярными соединениями и могут вести к пермеабиллизации (нарушению целостности) митохондриальных мембран (ПММ) [143, 144]. ПММ может приводить к последующему выходу в цитоплазматическое пространство некоторых митохондриальных белков, что в свою очередь ведёт к инициации каспаза-независимой клеточной гибели [144]. Одним из таких медиаторов является AIF (апоптоз-индуцирующий фактор) [144]. После выхода из митохондрий AIF переходит в свою апоптогенную форму и транслоцируется в ядро, где вызывает конденсацию хроматина с последующей каспаза-независимой клеточной гибелью [147]. В наших экспериментах было показано, что в клетках лимфомы Бёркитта FrA индуцирует выход и транслокацию AIF в клеточное ядро.

Также было показано, что FrA индуцирует апоптоз в клетках лимфомы Бёркитта

независимо от статуса и активности белка p53, в то время как цитотоксическая активность цисплатина была зависима от транскрипционной активности p53.

Кроме того, FgA был способен ингибировать цитопротекторную аутофагию в клетках лимфомы Бёркитта. Ранее было показано, что аутофагия является важным механизмом лекарственной устойчивости в различных типах рака [168, 304], включая лимфомы [314]. Так, ингибирование аутофагии в клетках Мус-индуцируемой лимфомы приводило к повышению их чувствительности к химиотерапии в моделях лекарственно-устойчивых p53-дефицитных лимфом *in vivo* [314]. Таким образом, ингибирование аутофагии может играть по крайней мере дополнительную роль в противоопухолевом эффекте FgA в моделях лимфомы Бёркитта.

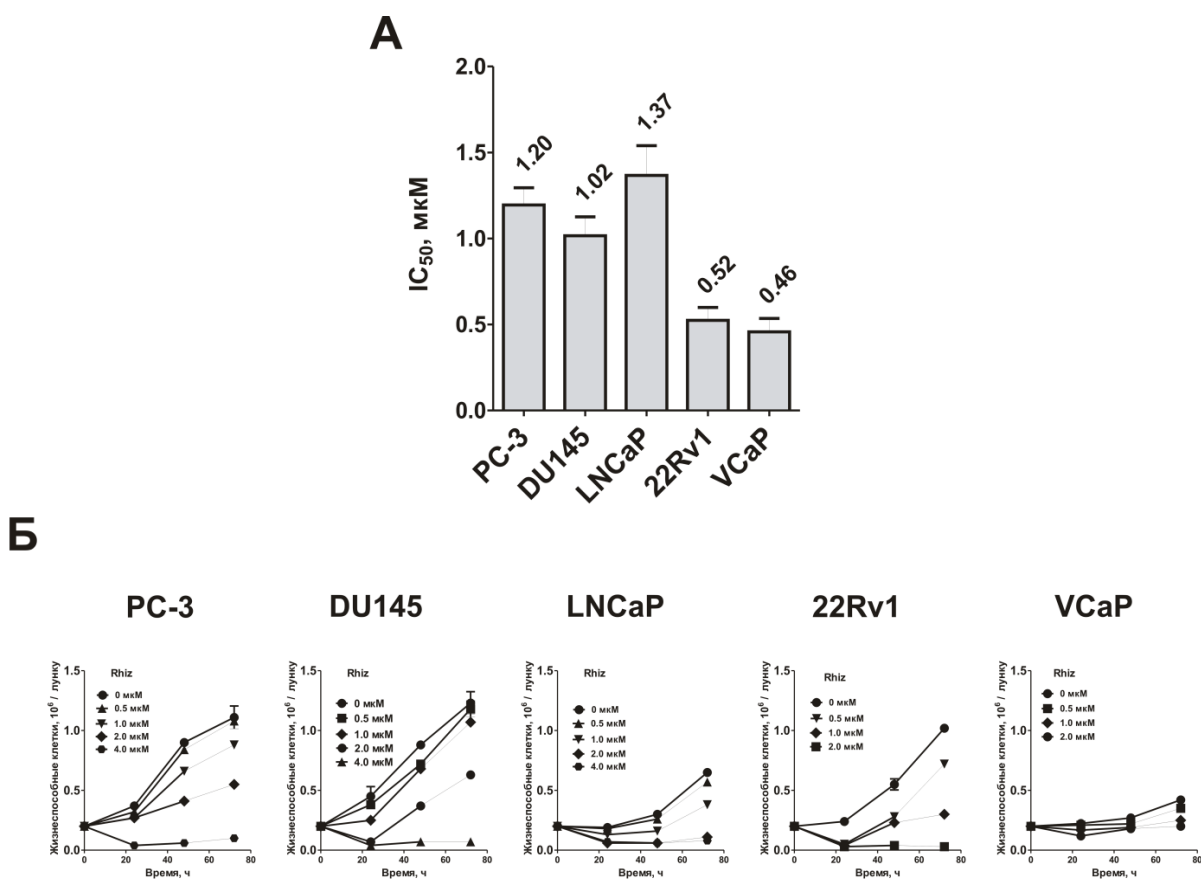
Можно сделать заключение, что FgA способен индуцировать каспаза- и p53-независимый апоптоз клеток лимфомы Бёркитта в наномолярных концентрациях, а также ингибировать цитопротекторную аутофагию. FgA-индуцируемая транслокация AIF из митохондрий в ядро была идентифицирована как один из возможных механизмов каспаза-независимой клеточной смерти, индуцируемой исследуемым соединением. Такое сочетание свойств делает FgA перспективным веществом для терапии пациентов с лекарственно-устойчивой лимфомой Бёркитта.

3.5. Исследование противоопухолевой активности ризохалинина (Rhiz) и его производных на моделях рака простаты человека

3.5.1. Исследование эффектов Rhiz *in vitro*

3.5.1.1. Исследование способности Rhiz ингибировать жизнеспособность клеток рака простаты человека

Ризохалинин – необычный биполярный сфинголипид, полученный в нашей лаборатории из морского природного соединения ризохалина (также открытого в нашей лаборатории). Цитотоксическая активность ризохалинина (Rhiz) была изучена по отношению к клеткам пяти линий рака простаты человека: PC-3, DU145, LNCaP, 22Rv1 и VCaP. Соединение проявляло цитотоксическую активность по отношению к данным клеточным линиям в низких микромолярных концентрациях (Рис. 81А, Б) [189].



Примечательно, что наиболее сильный цитотоксический эффект наблюдался по отношению к клеткам 22Rv1 и VCaP, содержащим один из транскрипционных вариантов андрогенного рецептора AR-V7. Клеточные линии PC-3, DU145 и LNCaP показали примерно одинаковую чувствительность к Rhiz, при этом клетки 22Rv1 и VCaP были намного более чувствительны к воздействию вещества (Рис. 81А, Б) [189].

3.5.1.2. Исследование апоптоз-индуцирующей активности Rhiz в клетках рака простаты человека

Была исследована также проапоптотическая активность Rhiz. Было показано, что соединение способно индуцировать появление нескольких маркеров апоптоза. В частности, обработка клеток Rhiz приводила к фрагментации ДНК (Рис. 82А, Б) [189].

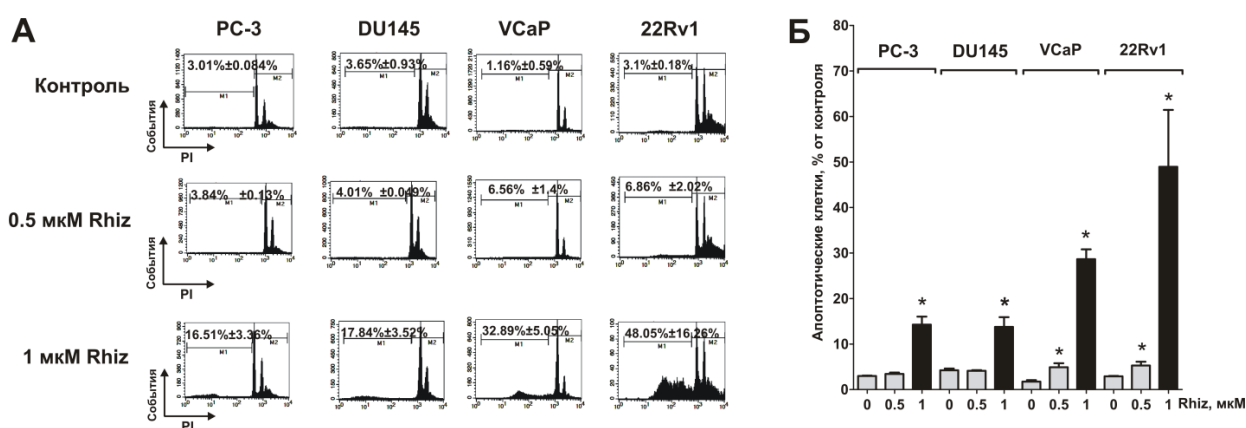


Рисунок 82. Результаты исследования методом проточной цитометрии клеток рака простаты PC-3, DU145, VCaP, 22Rv1 обработанных Rhiz в течение 48 ч. Фрагментация ДНК под действием вещества на клетки была исследована с использованием окрашивания PI – полученные исходные гистограммы (А) и последующей количественной оценки фракции апоптотических клеток (Б). * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, было показано, что Rhiz вызывает время- и дозозависимую активацию каспазы-3 (Рис. 83А, Б).

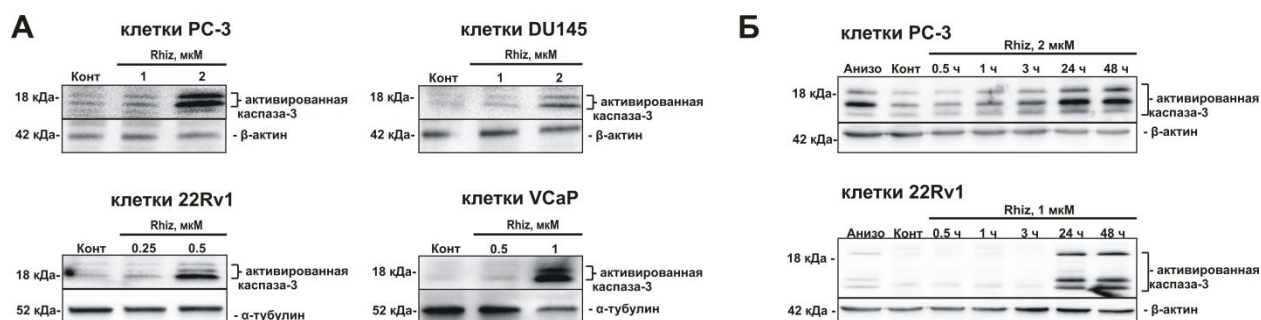


Рисунок 83. Исследование дозо- и времязависимой активации каспазы-3 в клетках рака простаты, обработанных Rhiz, с помощью Вестерн-блоттинга. Клетки были обработаны веществами в течение 48 ч (А) или в течение другого указанного времени (Б). Клетки, обработанные 5 мкМ анизомицина (Анизо) в течение 48 ч, использовали в качестве положительного контроля

Кроме того, наблюдалась время- и дозозависимая экстернализация фосфатидилсерина под действием вещества на клетки PC-3 (Рис. 84А, Б) [189].

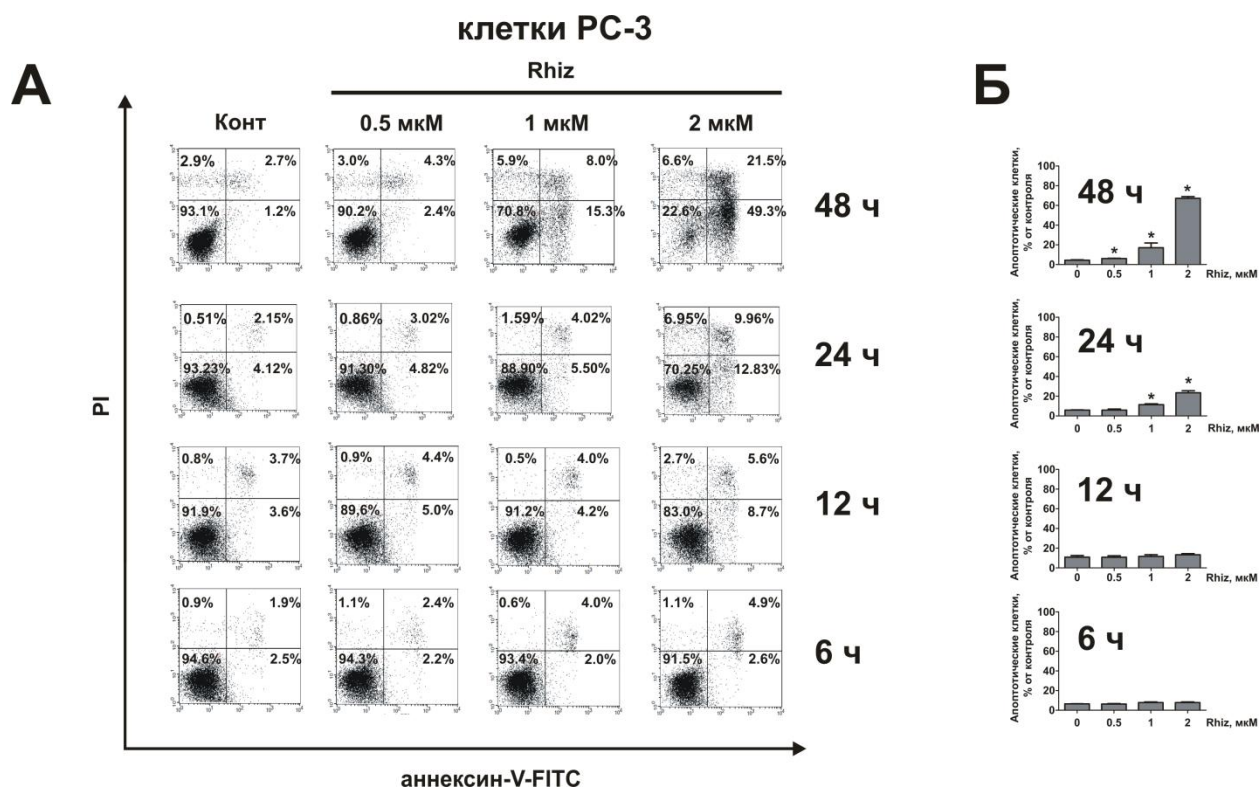


Рисунок 84. Исследование методом проточной цитометрии дозо- и времязависимой экстернализации фосфатидилсерина в клетках рака простаты, обработанных Rhiz. Аннексин-V-FITC и PI были использованы в качестве красителей. На рисунке представлены первичные гистограммы (А) и их количественная оценка (Б). * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Примечательно, что предварительная обработка клеток ингибитором каспаз z-VAD-fmk существенно уменьшала количество апоптотических клеток (Рис. 85). Таким образом, был сделан вывод о каспаза-зависимом характере индуцируемого Rhiz апоптоза. Также примечательно, что индукция апоптоза была более сильной в клетках 22Rv1 и VCaP, нежели чем в клетках PC-3 и DU145 (Рис. 85) [189].

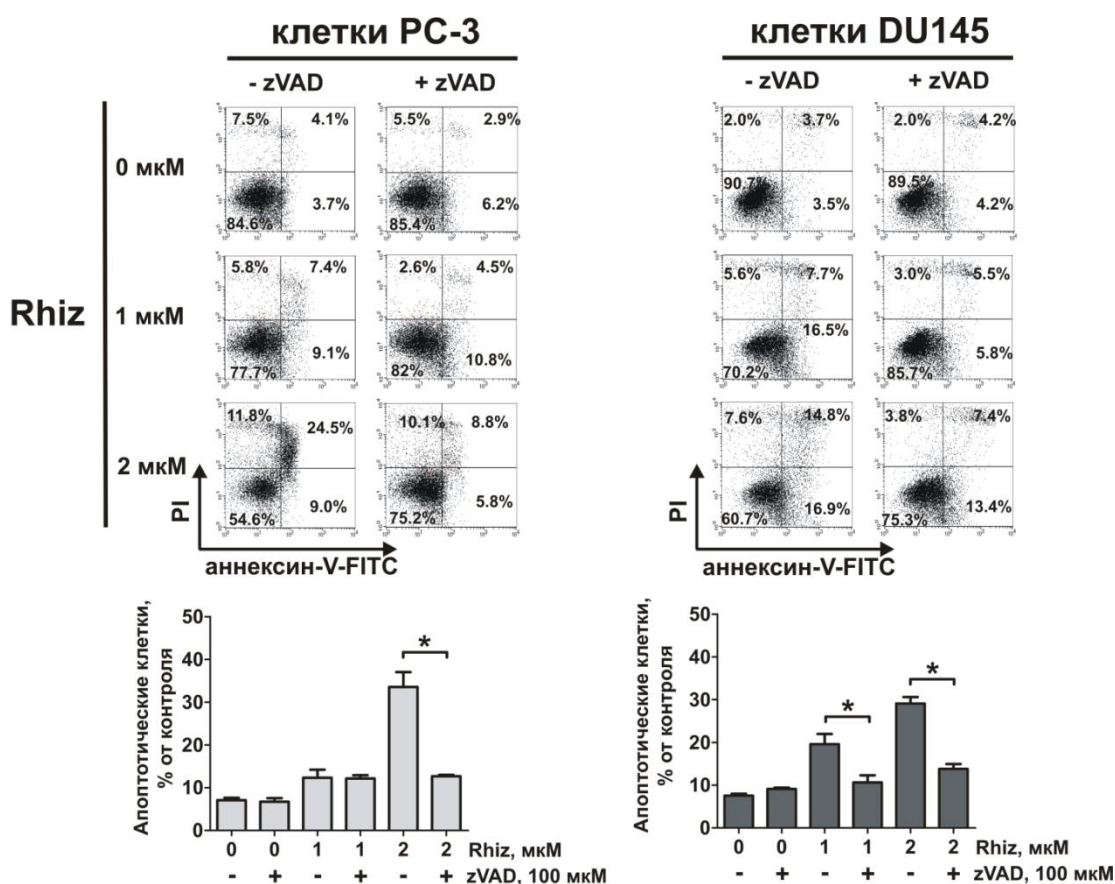


Рисунок 85. Исследование методом проточной цитометрии эффекта ингибитора активности каспаз z-VAD-fmk на цитотоксический эффект Rhiz. Клетки были предварительно обработаны 100 мкМ ингибитора z-VAD-fmk в течение 1 ч, а затем указанными концентрациями Rhiz в течение 48 ч. Экстернализация фосфатидилсерина была оценена методом проточной цитометрии с использованием аннексина-V-FITC и PI в качестве красителей. На рисунке представлены первичные гистограммы и их количественная оценка. Клетки, окрашенные аннексином-V-FITC считали апоптотическими. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Далее, был исследован эффект Rhiz на экспрессию основных про- и антиапоптотических белков в клетках рака простаты. Было установлено, что обработка клеток Rhiz приводит к увеличению экспрессии таких проапоптотических белков, как p21, p53 и Bad, а также расщеплению PARP и каспазы-8. В то же время наблюдалось подавление экспрессии антиапоптотического белка сурвайвина (Рис. 86). Уровни экспрессии белков Bax, Pak1, каспазы-9 и Bcl-2 не изменялись под действием Rhiz на опухолевые клетки (Рис. 86) [189].

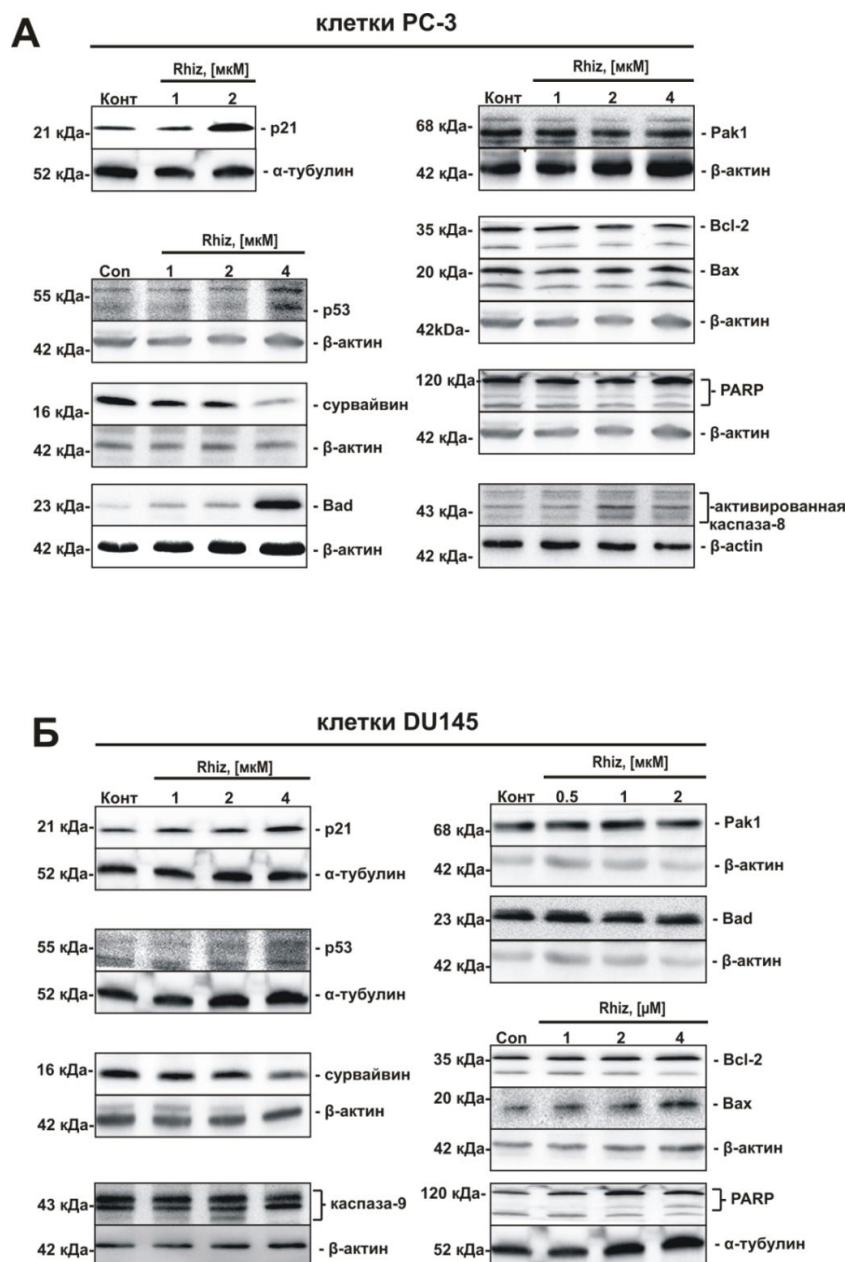


Рисунок 86. Вестерн-блоттинг анализ ключевых про- и антиапоптотических белков в клетках PC-3 (А) и DU145 (Б), обработанных Rhiz в течение 48 ч

3.5.1.3. Исследование эффекта Rhiz на аутофагию в клетках рака простаты

Далее был исследован эффект Rhiz на аутофагию, как на один основных механизмов преодоления лекарственной устойчивости и выживаемости опухолевых клеток. С помощью метода Вестерн-блоттинга была показана способность Rhiz вызывать сдвиг соотношения LC3B-I / LC3B-II в сторону аккумуляции LC3B-II после 48 ч обработки клеток этим веществом (Рис. 87) [189].

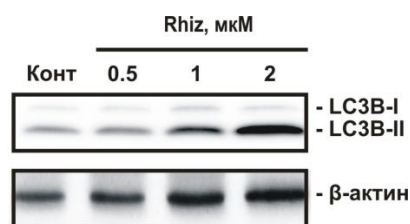


Рисунок 87. Вестерн-блоттинг анализ белка LC3B-I/II в клетках PC-3, обработанных Rhiz в течение 48 ч

Также факт формирования и аккумуляции аутофагосом / аутолизосом (структур, имеющих двойную мембрану) под действием Rhiz на опухолевые клетки был подтверждён методом электронной микроскопии (Рис. 88А). Дополнительно с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии были показаны формирование и аккумуляция LC3B-I/II-позитивных структур (т.е. аутофагосом / аутолизосом, рис. 88Б) [189].

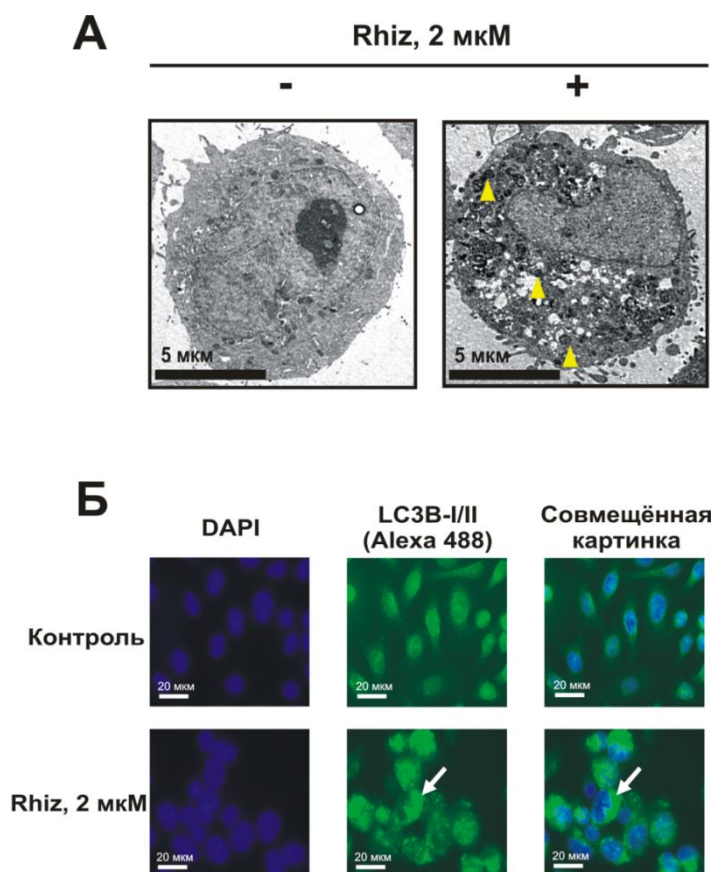


Рисунок 88. Исследование аккумуляции аутофагосом / аутолизосом методами электронной (А) и иммунофлуоресцентной (Б) микроскопии в клетках РС-3, обработанных Rhiz в течение 48 ч. Клетки были зафиксированы и, для исследования методом иммунофлуоресцентной микроскопии, пермеабелизованы и последовательно обработаны первичными антителами к LC3B-I/II и вторичными Alexa Fluor 488-связанными антителами. Для исследования методом электронной микроскопии пермеабелизация и обработка клеток антителами не проводилась. Количество аутофагосом – внутриклеточных структур с двойной мембраной (обозначены жёлтыми стрелками (А)), или LC3B-I/II-положительных структур (обозначены белой стрелкой (Б)) – увеличивалось под действием Rhiz на клетки

Для того чтобы отличить индукцию аутофагии от её ингибирования, был исследован эффект ингибитора аутофагии 3-метиладенина (3-МА) на цитотоксический эффект Rhiz. В связи с умеренной цитотоксичностью самого ингибитора 3-МА мы использовали метод Чоу-Талалая для определения эффекта ингибитора на активность Rhiz. Комбинация Rhiz с 3-МА показала чёткий аддитивный цитотоксический эффект на клетки РС-3 (Рис. 89А, Б). На основании этого был сделан вывод о том, что оба

соединения способны ингибировать цитопротекторную аутофагию (способствующую выживанию клеток) [189].

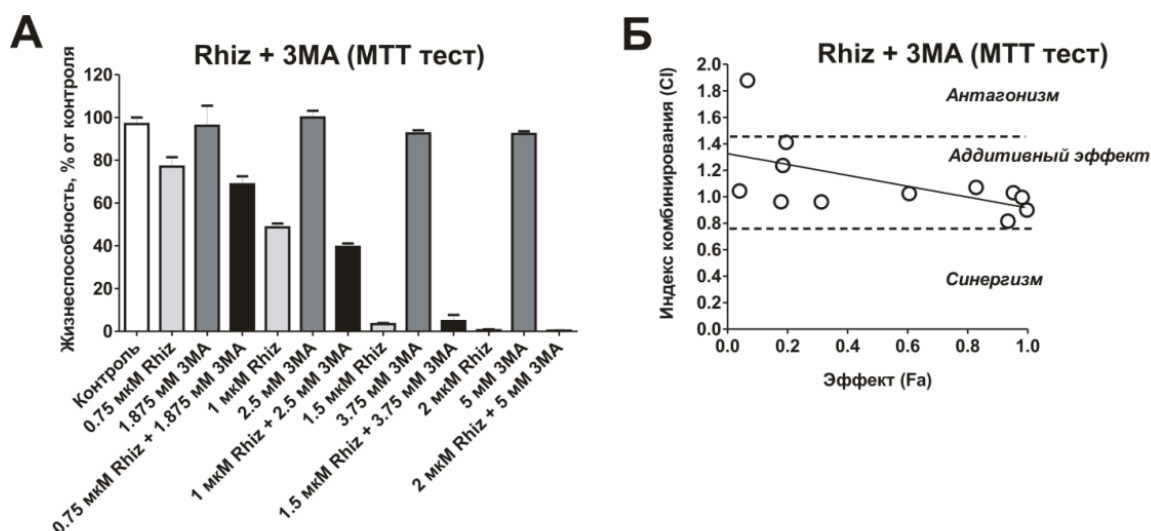


Рисунок 89. Исследование эффекта 3-МА – ингибитора ранних стадий аутофагии – на цитотоксическую активность Rhiz в опухолевых клетках РС-3. Клетки были обработаны комбинацией Rhiz и 3-МА в течение 48 ч при постоянном молярном соотношении $C(\text{Rhiz}) : C(3\text{-МА}) = 1 : 2500$. Жизнеспособность клеток была измерена с помощью МТТ-теста (**А**). Индекс комбинирования был рассчитан на основе этих данных с использованием программного обеспечения CompuSyn 1.0 (**Б**)

Кроме того, было показано, что BafA1 способен ингибировать цитотоксический эффект Rhiz (Рис. 90). Известно, что BafA1, являясь ингибитором аутофагии, может антагонизировать цитотоксический эффект других ингибиторов этого процесса [286].

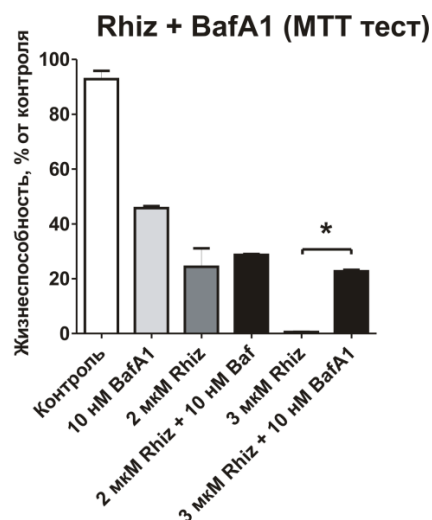


Рисунок 90. Исследование эффекта BafA1 – ингибитора поздних стадий аутофагии – на цитотоксическую активность Rhiz в опухолевых клетках PC-3. Клетки были обработаны комбинацией Rhiz и BafA1 в течение 48 ч при постоянной концентрации $C(\text{BafA1}) = 10 \text{ нМ}$ и различных концентрациях Rhiz. Жизнеспособность клеток была измерена с помощью МТТ-теста. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Для того чтобы подтвердить ингибирующий эффект Rhiz на аутофагию, была исследована кинетика формирования и деградации аутофагосом / аутолизосом. Для этой цели был произведён мониторинг уровня белка LC3B-I/II, в качестве маркера этого процесса. В итоге было показано, что в клетках, обработанных Rhiz, так же как и в клетках, обработанных такими известными ингибиторами поздних стадий аутофагии, как BafA1 и CQ, наблюдалось стабильное увеличение уровня экспрессии LC3B-II (Рис. 91А). В то же время в клетках, подвергнувшихся стимулам, приводящим к индукции аутофагии, таким как обработка рапамицином (Rapa) или голодание, наблюдалось устойчивое снижение экспрессии LC3B-II (Рис. 91Б). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что Rhiz способен ингибировать цитопротекторную аутофагию в клетках рака простаты человека, устойчивых к гормональной терапии [189].

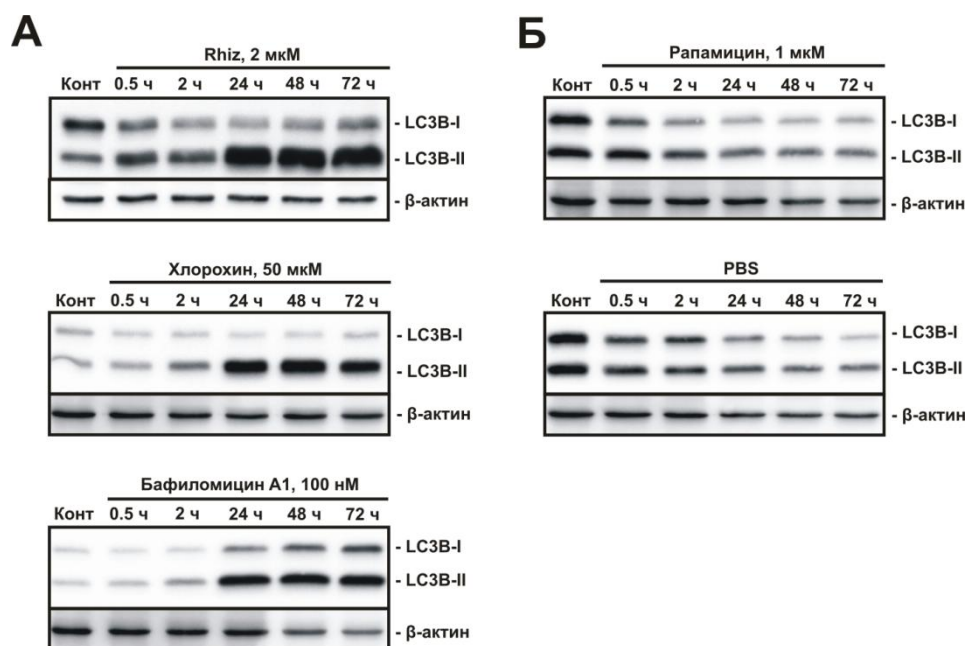


Рисунок 91. Вестерн-блоттинг анализ экспрессии белка LC3B-I/II в клетках PC-3, обработанных Rhiz, CQ, BafA1 (А), а также Рапа или 100% PBS (симуляция голодания) (Б) в течение 0.5–72 ч

3.5.1.4. Исследование эффекта Rhiz на потенциал-зависимые калиевые каналы

Известно, что калиевые каналы играют определённую роль в процессе метастазирования клеток рака простаты человека [315]. Поэтому был исследован эффект известных активаторов (открывателей) калиевых каналов – миноксидила (Minox) и диазоксида (Diaz) – на цитотоксическую активность Rhiz. Было показано, что оба вещества способны ингибировать цитотоксический эффект Rhiz в опухолевых клетках PC-3 и DU145 (Рис. 92А, Б) [189].

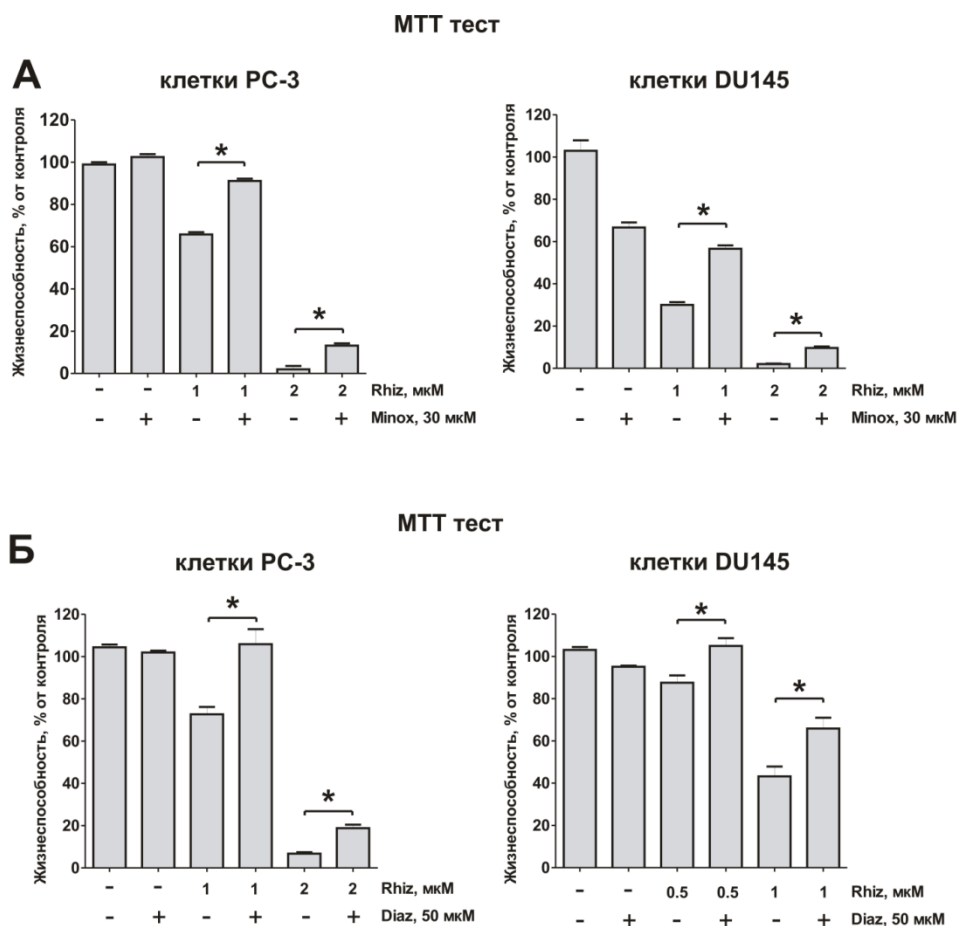


Рисунок 92. Исследование эффекта активаторов калиевых каналов – миноксидила (Minox, **А**) и диазоксидида (Diaz, **Б**) – на цитотоксическую активность Rhiz в опухолевых клетках PC-3 и DU145. Клетки были обработаны комбинацией Rhiz и миноксидила (**А**) и диазоксидида (**Б**) в течение 48 ч при постоянных молярных концентрациях $C(\text{Minox}) = 30$ мкМ или $C(\text{Diaz}) = 50$ мкМ и различных концентрациях Rhiz. Жизнеспособность клеток была измерена с помощью МТТ-теста. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Затем был исследован прямой эффект Rhiz на heag1 и Kv1.3 – потенциал-зависимые калиевые каналы, присутствующие в клетках рака простаты [315, 316], с использованием экспрессионной системы, основанной на ооцитах лягушки *Xenopus*. Было показано, что Rhiz в концентрации 10 мкМ быстро и обратимо индуцировал 50% ингибирование heag1-зависимого тока (Рис. 93А). Более высокие концентрации Rhiz были способны ингибировать Kv1.3-зависимый ток (Рис. 93Б) [189].

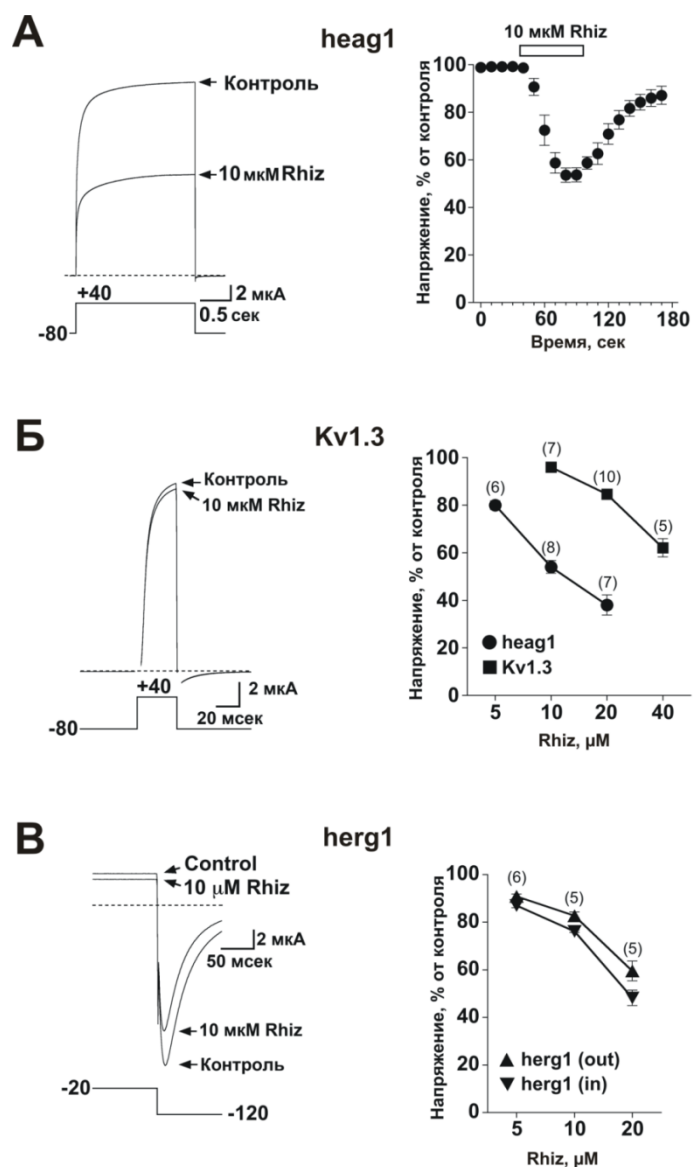


Рисунок 93. Эффект Rhiz на калиевые каналы, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*. Представлены токи, опосредованные каналами heag1 (A), Kv1.3 (Б) и herg1 (В) до и после добавления Rhiz в концентрации 10 μ M. Пунктирные линии представляют собой линии нулевого напряжения. Схема подачи импульсов показана под графиками. Зависимость напряжения от времени, а также обратимость ингибирования проходящего через данный канал тока показана для канала heag1 (A). Зависимость остаточного напряжения от концентрации Rhiz показана для каналов heag1 и Kv1.3 (A, Б), а также для канала herg1 (входящий и исходящий токи, В)

Более высокие концентрации Rhiz требовались, чтобы вызвать ингибирование herg1-зависимого тока (по сравнению с ингибированием heag1, рис. 93A, B). Известно, что herg1 также был найден в клетках рака простаты [317], однако его ингибирование является нежелательным явлением в кардиофармакологии [318]. В то же время следует отметить,

что ингибирование калиевого канала *haeg1*, экспрессированного в клетках млекопитающих, было сильнее (~80% ингибирования в течение 1 мин обработки веществом) по сравнению с ингибированием, наблюдаемым в экспрессионной системе ооцитов *Xenopus* (Рис. 94) [189].

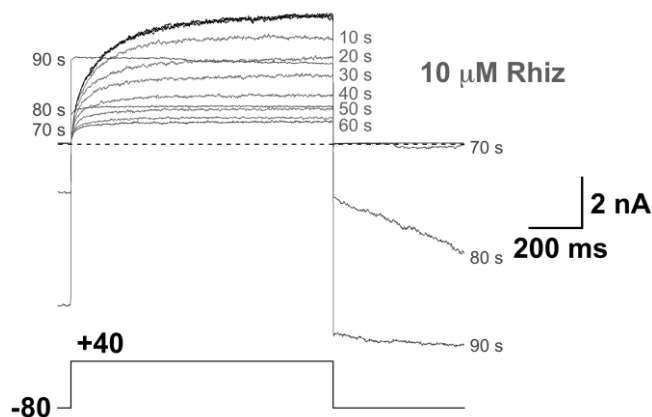


Рисунок 94. Эффект Rhiz на *haeg1*-зависимые токи в клетках CHO. Ответные токи на повторные деполяризационные импульсы были записаны с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) на модели трансфицированных клеток CHO, экспрессирующих канал *haeg1* (три черных линии представляют контроль, серые линии – раствор Rhiz, 10 мкМ). Указано время, прошедшее с момента введения раствора исследуемого вещества. В течение первых 60 сек после введения вещества наблюдалось ингибирование проходящего тока, однако через 60 сек наблюдалось отсутствие развития напряжения и, в итоге, потеря мембранной целостности (70 сек, 80 сек, 90 сек)

3.5.1.5. Эффект Rhiz на AR-сигналинг в клетках рака простаты

Была исследована способность Rhiz воздействовать на экспрессию AR-V7 (варианта сплайсинга 7 андрогенного рецептора, AR variant 7, AR-V7) и AR (андрогеновый рецептор полной длины, AR-full length, AR-FL) в клетках 22Rv1 и VCaP. Rhiz был способен вызывать снижение экспрессии AR-V7 в клетках VCaP и 22Rv1, в то время как экспрессия AR-FL не изменялась (Рис. 95) [189].

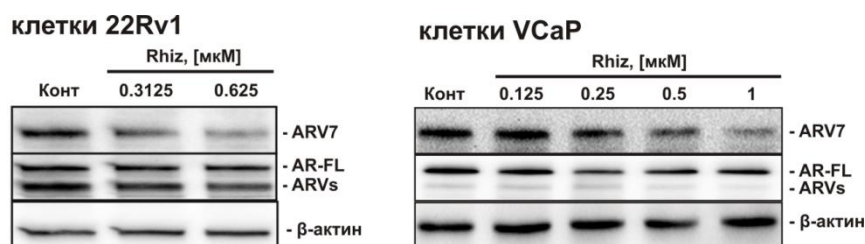


Рисунок 95. Эффект Rhiz на экспрессию AR-V7 и AR-FL в клетках 22Rv1 и VCaP. Уровни экспрессии были проанализированы с помощью метода Вестерн-блоттинга

Кроме того, было показано, что обработка клеток Rhiz приводит к снижению экспрессии PSA (простатического специфического антигена) и IGF-1 (инсулиноподобного фактора роста 1) – двух мишеней AR-рецептора, расположенных ниже по сигнальному каскаду – в клетках 22Rv1, VCaP и LNCaP (Рис. 96А, Б). Примечательно, что в клетках VCaP Rhiz индуцировал снижение уровня экспрессии IGF-1 (Рис. 96А, Б), хотя изменения уровня экспрессии PSA обнаружено не было (данные не показаны) [189].

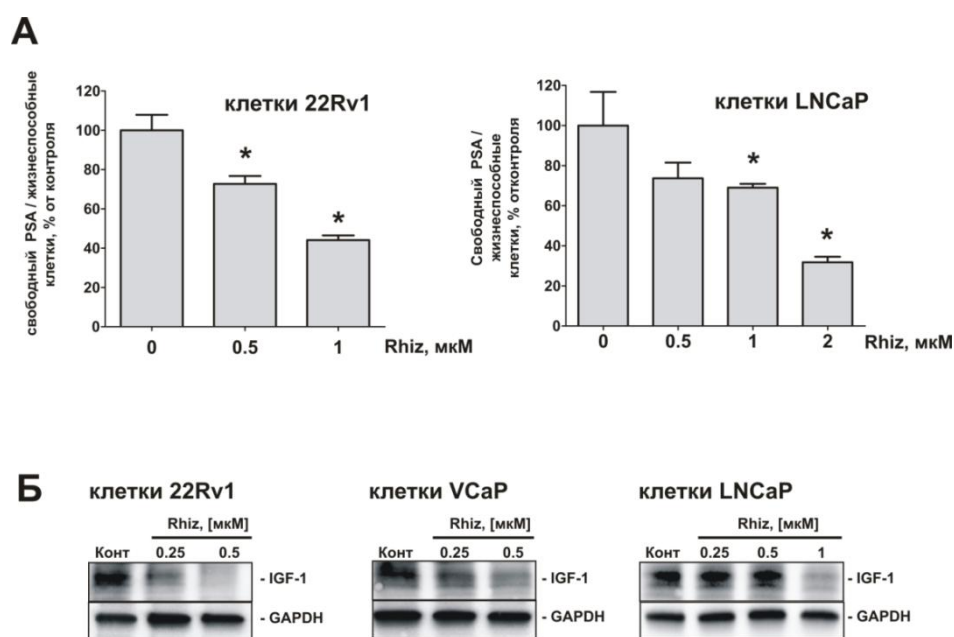


Рисунок 96. Эффект Rhiz на экспрессию PSA и IGF-1 в клетках 22Rv1, VCaP и LNCaP. Уровень экспрессии PSA (концентрация PSA в супернатанте культуральной среды) был измерен с помощью метода ИФА и нормализован к количеству жизнеспособных клеток в тех же образцах, измеренных методом автоматического счёта клеток с использованием красителя трипанового синего. Уровни экспрессии IGF-1 были проанализированы с помощью метода Вестерн-блоттинга. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.5.1.6. Исследование эффекта Rhiz в комбинации с доцетакселем и кабазитакселем, а также с энзалутамидом при действии на AR-V7-положительные клеткам

Далее был исследован эффект Rhiz в комбинации со стандартными химиотерапевтическими препаратами, применяемыми в терапии рака простаты. Было показано, что Rhiz способен возвращать AR-V7-положительным клеткам (22Rv1 и VCaP) чувствительность к энзалутамиду (Рис. 97) [189].

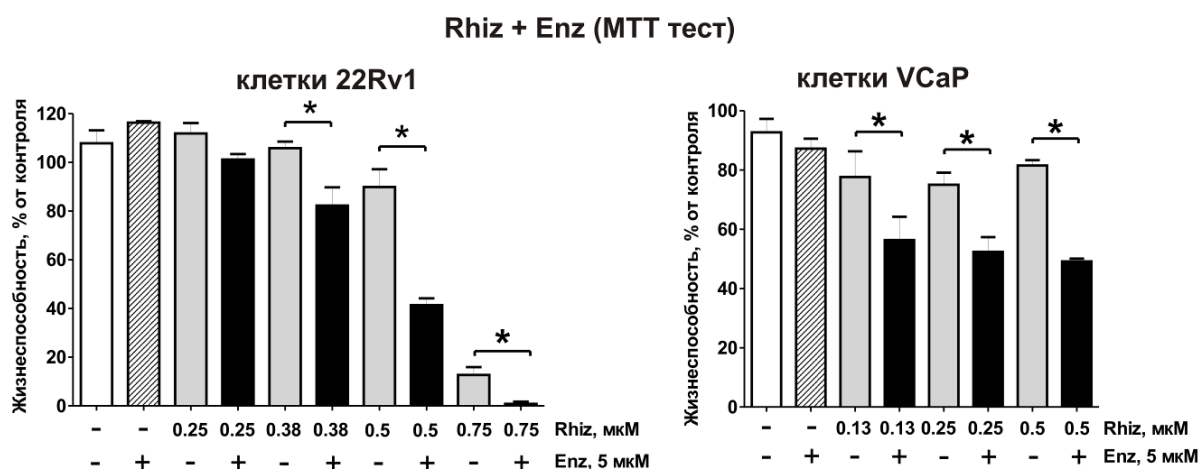


Рисунок 97. Эффект Rhiz на AR-V7-положительные клетки в его комбинации с энзалутамидом (Enza). Клетки 22Rv1 и VCaP были обработаны Rhiz, Enza или их комбинацией в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток была измерена с помощью МТТ-теста. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Также было показано, что Rhiz проявляет аддитивный эффект (при высоких значениях эффекта (Fa, доля мёртвых клеток) при его комбинировании с доцетакселем и кабазитакселем (Рис. 98А, Б).

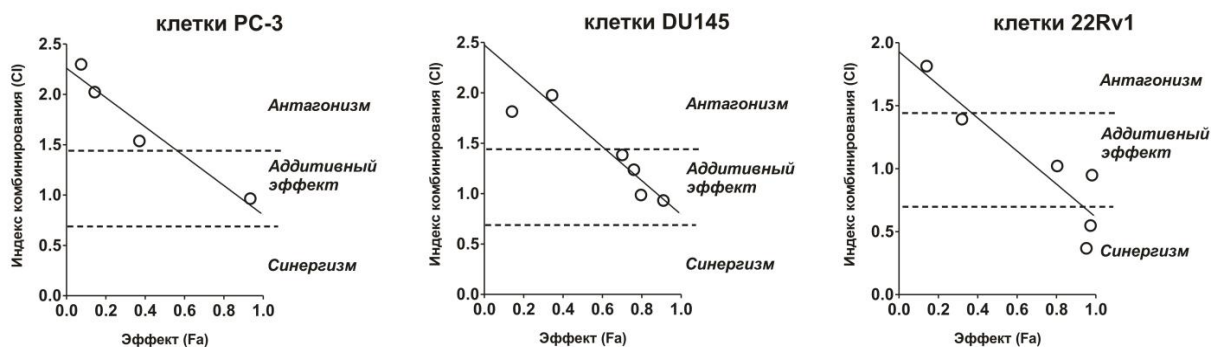
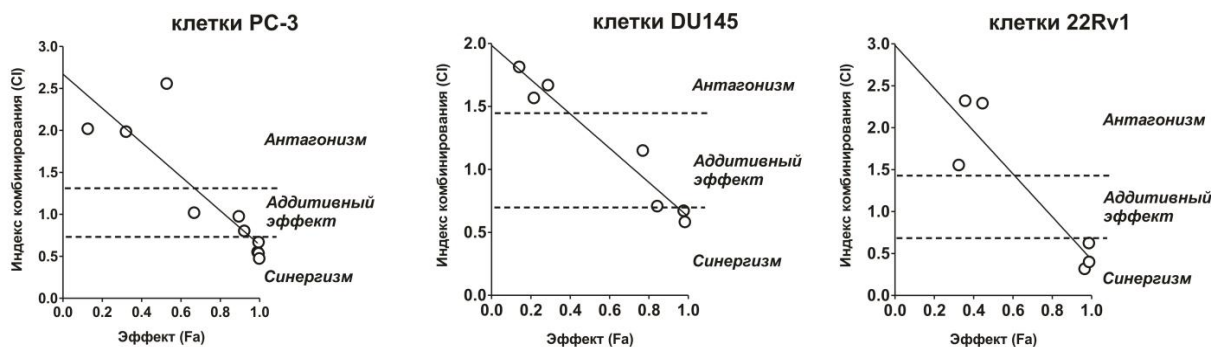
А**Rhiz + DOC (MTT тест)****Б****Rhiz + Caba (MTT тест)**

Рисунок 98. Эффект Rhiz на клетки PC-3 и DU145 в его комбинации с доцетакселем (DOC) и кабазитакселем (Caba). Клетки были обработаны индивидуальными веществами или их комбинациями в течение 48 ч при постоянном молярном соотношении ($C(\text{Rhiz}) : C(\text{DOC}) = 100 : 1$ (для клеток PC-3 и DU145) или $25 : 1$ (для клеток 22Rv1); $C(\text{Rhiz}) : C(\text{Caba}) = 25 : 1$ (для клеток PC-3) или $125 : 2$ (для клеток DU145 и 22Rv1)). Жизнеспособность клеток была измерена с помощью МТТ-теста. Индекс комбинирования (CI) был рассчитан с использованием программы CompuSyn 1.0.

3.5.2. Исследование эффекта Rhiz *in vivo***3.5.2.1. Подбор дозы Rhiz для испытаний *in vivo***

С помощью экстраполяции эффективной дозы Rhiz *in vitro* ($IC_{50} \sim 1.5$ мкмоль/л) на модель *in vivo* ($= 1.5$ мкмоль/кг) была рассчитана теоретическая эффективная концентрация в 0.8 мг/кг/день. Далее были проведены экспериментальные исследования по подбору эффективной дозы *in vivo*. Данные эксперименты были начаты с исследования вышеупомянутой рассчитанной концентрации, с последующим последовательным повышением дозы, в случае если не наблюдалось побочных эффектов при использовании предыдущей дозы. В результате было показано, что вплоть до 2.2 мг/кг/день не наблюдалось потери массы тела животных, в то время как при введении дозы в 2.4

мг/кг/день наблюдалась существенная и быстрая потеря массы (Рис. 99). Кроме того, следует отметить, что при последующем введении доз 2.2 мг/кг/день и 2.0 мг/кг/день сразу после интраперитонеального введения вещества были замечены слабые признаки недомогания, такие как замедленное движение животных. Таким образом, для дальнейших исследований эффектов *in vivo* была выбрана доза Rhiz в 1.8 мг/кг/день.

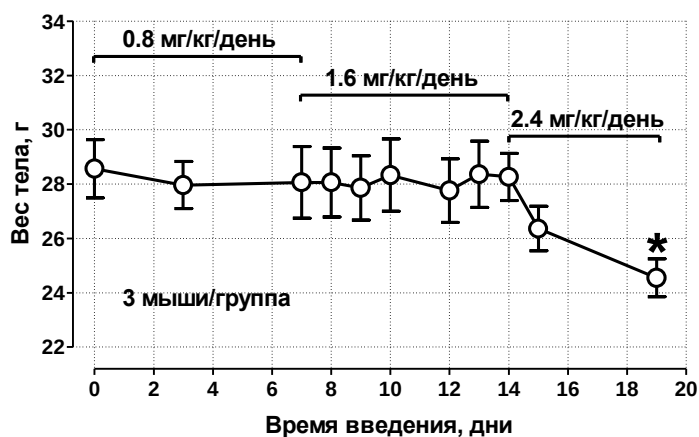


Рисунок 99. Подбор дозы Rhiz для испытаний *in vivo*. Раствор Rhiz в 0.9% NaCl вводили ежедневно интраперитонеально в объёме 10 мкл/г веса тела. Потеря массы тела наблюдалась при введении 2.4 мг/кг/день после 5 дней введения. * – статистически достоверное отличие от значения в момент времени $t = 0$ ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.5.2.2. Эффект на Rhiz рост первичных опухолей и индукцию апоптоза опухолевых клеток *in vivo*

Эффективность и токсичность Rhiz была исследована *in vivo* на моделях ксенографтов человеческих клеток рака простаты PC-3 и 22Rv1. Эксперименты были проведены с использованием хорошо переносимой дозы в 1.8 мг/кг/день при ежедневном интраперитонеальном введении Rhiz в растворе 0.9% NaCl в объёме 10 мкл на 1 г веса тела мыши. В результате было показано, что Rhiz был способен эффективно ингибировать рост опухолей, а также снижать конечную массу опухоли в обеих используемых моделях (Рис. 100) [189].

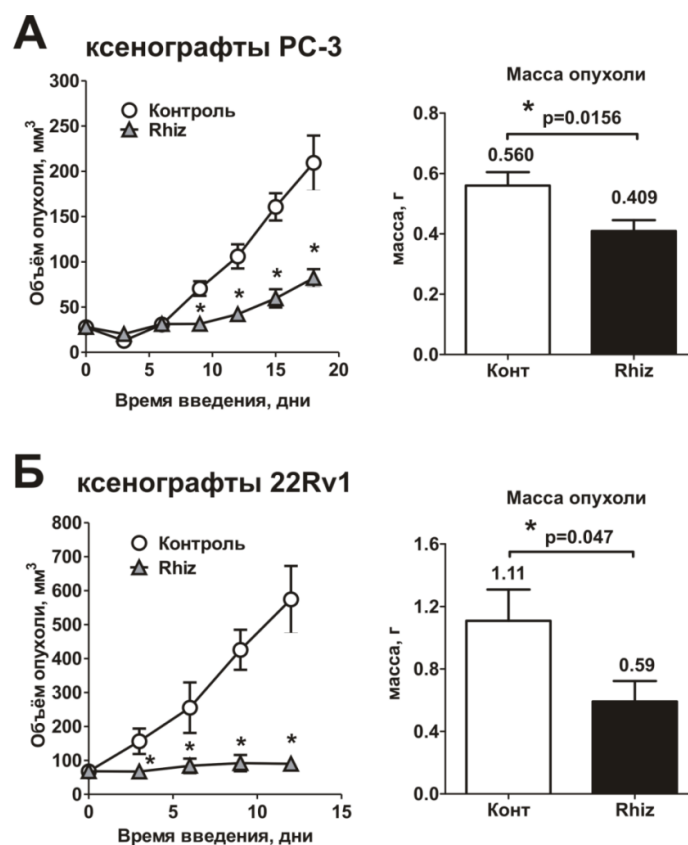


Рисунок 100. Рост привитых опухолей в животных линии NOD SCID, которым были подкожно привиты человеческие клетки рака простаты линий PC-3 (А) или 22Rv1 (Б), а также массы опухолей по окончании эксперимента. После того как опухоли достигли 50-60 мм³ животным начинали ежедневно вводили Rhiz или эквивалентный объём физиологического раствора. Растворы вводили интраперитонеально. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

В последующих экспериментах эффект Rhiz на индукцию апоптоза опухолевых клеток *in vitro* был подтверждён в экспериментах *in vivo*. Так, было показано, что в образцах опухолей, полученных из животных, которым вводили Rhiz, был существенно повышен процент мёртвых опухолевых клеток (определённых посредством количественной оценки некротических / апоптотических клеток с помощью гистологических методов, рис. 101) [189].

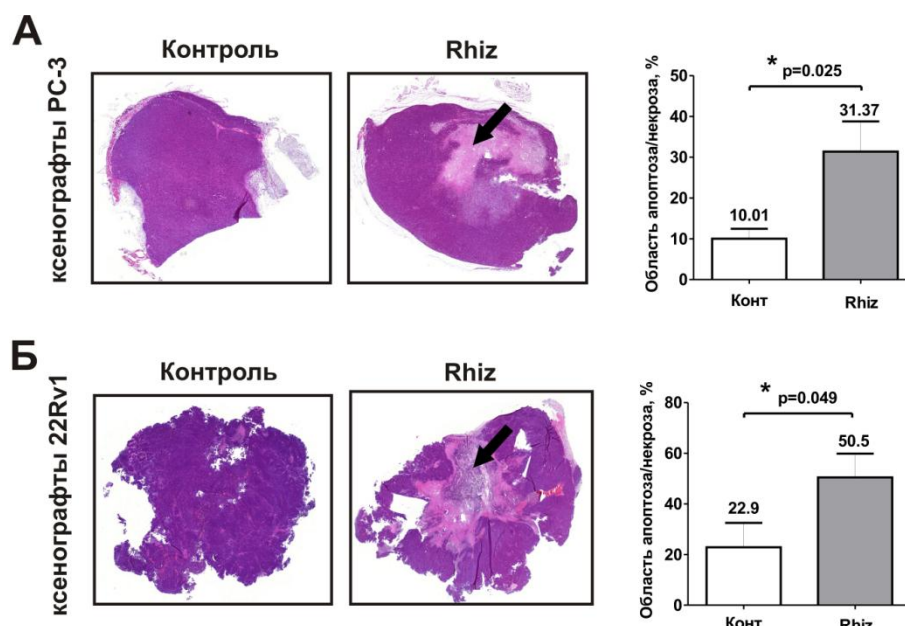


Рисунок 101. Исследование гибели опухолевых клеток *in vivo*. Гистологическое исследование опухолей, извлечённых из ксенографтов, которым были привиты клетки РС-3 (А) или 22Rv1 (Б), и окрашенных гематоксилином-эозином. Опухоли были извлечены по окончании эксперимента. Количественную оценку мертвых клеток (области показаны на рисунке стрелкой) проводили с помощью программы ImageJ. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, было показано, что уровень такого маркера апоптоза как активированная каспаза-3, был существенно повышен в опухолях, извлечённых из животных, которым вводили Rhiz (Рис. 102). Данное наблюдение свидетельствует в пользу того, что Rhiz индуцирует каспаза-3-зависимый апоптоз как *in vitro* (Рис. 103), так и *in vivo* (Рис. 102).

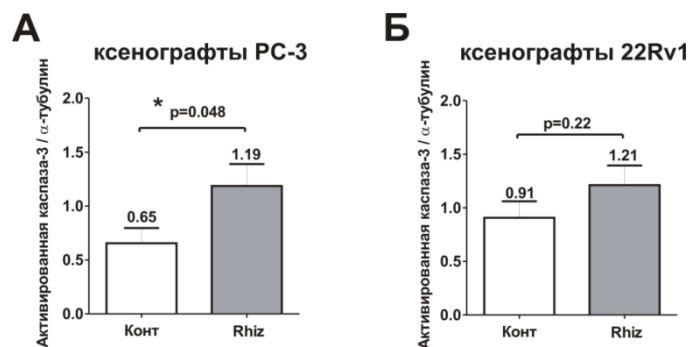


Рисунок 102. Исследование активации каспазы-3 в опухолевых клетках РС-3 (А) и DU145 (Б) *in vivo*. Уровни экспрессии активированной каспазы-3 были определены при

помощи Вестерн-блоттинга с использованием специфических антител. * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.5.2.3. Исследование побочных эффектов Rhiz *in vivo*

В целом, Rhiz был хорошо переносим животными в дозе 1.8 мг/кг/день. Не было замечено каких-либо изменений в поведении, а также разницы в массе тела животных между контрольной группой и группой, которой вводили Rhiz. Кроме того, у животных, которым вводили Rhiz, не наблюдалось видимых признаков боли или недомогания (Рис. 103) [189].

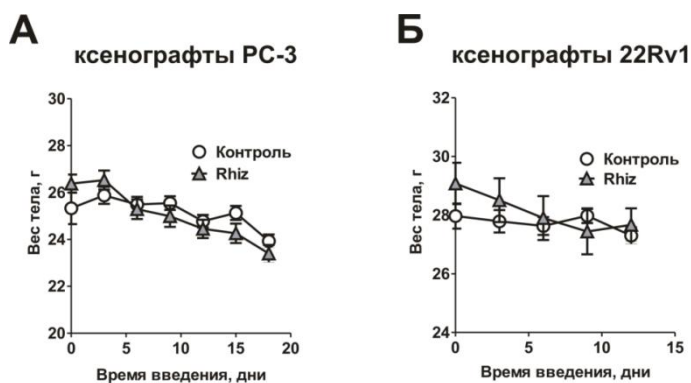


Рисунок 103. Исследование изменение массы тела животных, которым были привиты клетки PC-3 (А) или 22Rv1 (Б), при ежедневном введении им Rhiz или равного объёма физиологического раствора

Анализ крови животных, которым вводили Rhiz, показал, что уровень содержания тромбоцитов и гемоглобина был в пределах нормы и не отличался существенно от значений, представленных в контрольной группе (данные не показаны). В то же время наблюдалось значительное повышение концентрации белых кровяных клеток в крови животных, которым вводили Rhiz (Рис. 104А), при этом наблюдалось повышение содержания всех подклассов исследуемых лейкоцитов – моноцитов, нейтрофилов и лимфоцитов. Данное наблюдение может говорить о том, что Rhiz, возможно, обладает иммуностимулирующим эффектом *in vivo*, однако это предположение требует дальнейшей проверки. В соответствии с ним наблюдалось также увеличение массы селезёнки в обоих экспериментах (Рис. 104Б) [189].

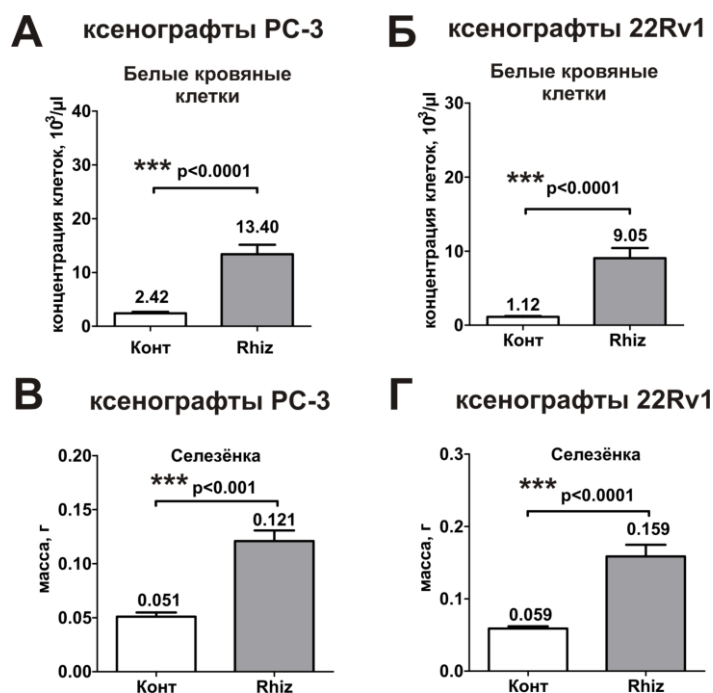


Рисунок 104. Измерение количества белых кровяных клеток (А, Б) и массы селезёнки у животных, которым были привиты опухолевые клетки РС-3 (А, В) или DU145 (Б, Г) и вводился плацебо (физиологический раствор) или раствор Rhiz. Статистически достоверное отличие от контроля: * – статистически достоверное отличие от контроля ($p \leq 0.001$, t-тест Стьюдента)

Кроме того, в одном из экспериментов наблюдалось небольшое снижение массы почек животных, входящих в группу, которой ежедневно вводили Rhiz (данные не показаны).

3.5.3. Обсуждение результатов исследования противоопухолевой активности Rhiz на моделях рака простаты человека

Ризохалинин (Rhiz) способен ингибировать рост и жизнеспособность клеток рака простаты человека, устойчивых к гормональной терапии, *in vitro* и *in vivo* благодаря своему уникальному профилю активности. Так, Rhiz обладает способностью преодолевать два основных механизма лекарственной устойчивости опухолевых клеток рака простаты – экспрессию транскрипционного варианта V7 андрогенового рецептора (AR-V7) и цитопротекторную аутофагию. Для того чтобы исследовать эффект соединения на различных моделях лекарственно-устойчивого рака простаты человека, противоопухолевый эффект Rhiz был изучен на клеточных линиях, являющихся как AR /

AR-V7-положительными, так и AR-отрицательными.

Согласно последним данным, многие противоопухолевые препараты, включая энзалутамид, способны индуцировать цитопротекторную аутофагию в клетках рака простаты, которая приводит к увеличению устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии [319]. При этом ингибиторы аутофагии показали терапевтическую эффективность на моделях рака простаты *in vitro* и *in vivo* [319]. В описанных выше экспериментах Rhiz проявил способность ингибировать аутофагию в клетках рака простаты, устойчивых к гормональной терапии.

Кроме того, Rhiz был способен преодолевать лекарственную устойчивость, вызванную присутствием AR-V7. Так, Rhiz проявил наибольшую противоопухолевую активность по отношению к клеткам с высоким уровнем экспрессии AR-V7. Дополнительно Rhiz был способен индуцировать снижение экспрессии данного белка. Более того, экспрессия PSA и IGF-1 – двух основных мишеней AR – значительно снижалась в обработанных Rhiz клетках 22Rv1 и LNCaP, что свидетельствовало в пользу того, что Rhiz также взаимодействует с белками AR-зависимого сигнального пути или же с самим андрогеновым рецептором (AR). При этом в клетках VCaP наблюдалось снижение экспрессии только для IGF-1, в то время как уровень экспрессии PSA значительно не менялся.

Цитотоксический эффект Rhiz был наиболее ярко выражен в клетках, экспрессирующих AR-V7. Данный факт говорил о том, что Rhiz был способен действовать независимо от наличия лиганд-связывающего домена андрогенового рецептора, но одновременно с этим, по всей вероятности, Rhiz способен воздействовать на AR-ассоциированный сигнальный путь. Примечательно, что Rhiz был способен возвращать чувствительность лекарственно-устойчивым AR-V7-положительным клеткам к энзалутамиду, а также усиливать цитотоксический эффект кабазитакселя и доцетакселя.

Более того, Rhiz был способен эффективно блокировать калиевые каналы. Так, ингибирование таких каналов, как *heag1*, *herg1* и *Kv1.3*, было обнаружено сразу же после введения в экспериментальную систему Rhiz, что свидетельствует о том, что Rhiz, возможно, связывается непосредственно с данными ионными каналами на молекулярном уровне. Для рака простаты человека было показано, что сверхэкспрессия калиевых каналов ассоциирована с высокой скоростью пролиферации опухолевых клеток [315, 320]. В подтверждение этого индуцируемый Rhiz апоптоз мог быть ингибирован соединениями, способными приводить к открытию калиевых каналов, такими как миноксидил и диазоксид. Кроме того, бафиломицин A1 был способен антагонизировать цитотоксический эффект Rhiz, предположительно, благодаря своей способности

выступать в качестве калиевого ионофора, обеспечивая транспорт ионов калия [321], а также благодаря способности ингибировать цитотоксичность других ингибиторов аутофагии [286].

Важно, что были проведены *in vivo* исследования эффективности и токсичности Rhiz. На первом этапе была подобрана доза Rhiz, которая хорошо переносилась экспериментальными животными. Вводимый в данной дозе Rhiz эффективно ингибировал рост устойчивых к гормональной терапии опухолей рака простаты человека *in vivo* без каких-либо явных побочных эффектов. В то же время было обнаружено увеличение массы селезёнки, а также повышенное содержание белых кровяных клеток в крови животных обеих экспериментальных групп, которым ежедневно вводили Rhiz, что может свидетельствовать об иммуностимулирующей активности вещества. Также в полном соответствии с данными *in vitro*, было показано, что Rhiz также способен стимулировать апоптоз опухолевых клеток *in vivo*.

Таким образом, Rhiz показал высокую *in vitro* и *in vivo* активность по отношению к AR-V7-положительным и -отрицательным клеткам рака простаты человека, устойчивым к гормональной терапии. Это соединение было способно преодолевать лекарственную устойчивость опухолевых клеток, а также возвращать чувствительность опухолевых клеток к энзалутамиду и усиливать цитотоксический эффект таксанов. Механизм действия Rhiz включает в себя индукцию каспаза-зависимого апоптоза, ингибирование цитопротекторной аутофагии, а также возможную иммуностимулирующую активность (Рис. 105). Дополнительно к этому, потенциал-зависимые калиевые каналы были определены как одна из молекулярных мишеней исследуемого соединения. Данная уникальная комбинация противоопухолевых свойств делает Rhiz перспективным кандидатом для создания на его основе препарата для лечения рака простаты, устойчивого к гормональной терапии. В свете высокой *in vivo* активности Rhiz, а также отсутствия серьёзных побочных эффектов дальнейшая разработка данного соединения и / или его производных как потенциальных противоопухолевых препаратов представляется довольно перспективной. Следующими этапами этого процесса могут стать разработка и оптимизация метода синтеза Rhiz или выделения его из природных источников, а также модификация структуры соединения с целью оптимизации его биохимических свойств [189].

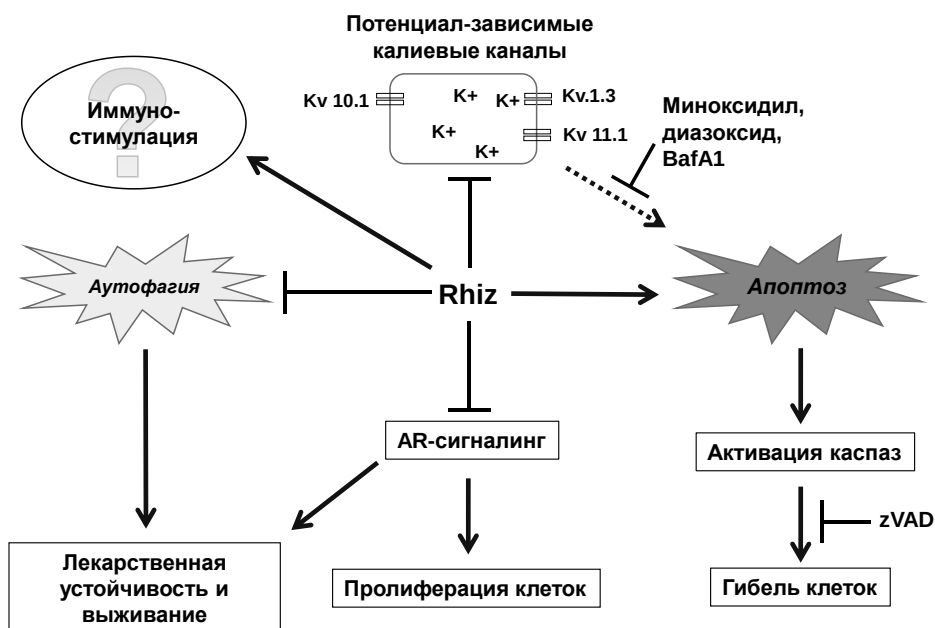


Рисунок 105. Схема предполагаемого механизма цитотоксического действия Rhiz в клетках рака простаты человека

3.5.4. Исследование эффекта Rhiz на протеом клеток рака простаты человека

3.5.4.1. Выявление белков, регулируемых под действием Rhiz на клетки PC-3

Далее нами был применён метод глобального протеомного скрининга с последующим биоинформатическим анализом полученных данных для установления других возможных молекулярных мишеней ризохалинина (Rhiz) в клетках рака простаты человека, устойчивых к гормональной терапии. С этой целью клетки PC-3 были обработаны 2 мкМ Rhiz в течение 48 ч. Профили белковой экспрессии клеток, обработанных Rhiz и контрольных клеток, были проанализированы с помощью 2D-PAGE и сравнены между собой. Протеомные 2D карты экспрессии белков представлены на рисунке 106. Цифровые картинки 2D-гелей были проанализированы с помощью программы Delta 2D с целью выявления регулируемых белков. Всего было идентифицировано 1226 белковых пятен, для 24 из них изменение уровня интенсивности оптической плотности составило ≥ 2 ($p < 0.05$, t-тест Стьюдента). Было идентифицировано понижение уровня экспрессии 9 белковых пятен (Рис. 106, табл. 10) и увеличение уровня экспрессии 15 белковых пятен (Рис. 106, табл. 10) под действием Rhiz на клетки PC-3. Все 24 пятна были вручную вырезаны из геля, окрашенного кумасси бриллиантовым синим, и подвергнуты трипсинолизу и идентификации методом тандемной масс-спектрометрии (Табл. 10)

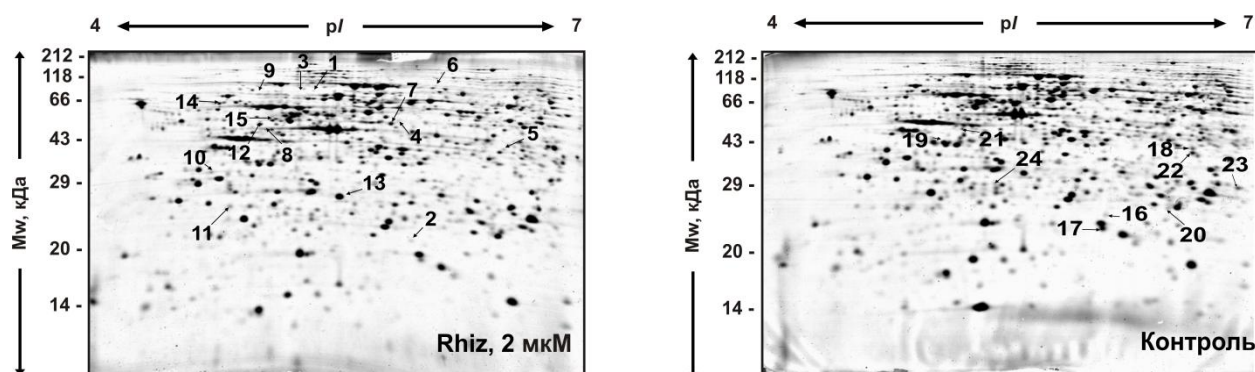


Рисунок 106. Результаты анализа методом 2D-PAGE белкового экстракта клеток РС-3, обработанных 2 мкМ Rhiz в течение 48 ч. На рисунке представлены фотографии 2D-гелей с регулируемыми белками (обозначены номерами), соответствующее описание которых представлено в таблице 10. Обозначенные белковые пятна показали статистически достоверное изменение интенсивности окраски в ≥ 2 раза ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Таблица 10. Белки, уровень экспрессии которых изменялся в клетках РС-3 при обработке их 2 мкМ Rhiz в течение 48 ч. Белки были идентифицированы методом MALDI-ToF-MS. Номера белков соответствуют номерам пятен, представленных на рисунке 106

Номер пятна на геле	Относительное изменение уровня экспрессии белка	Номер в базе Swiss-Prot	Название гена	Название белка	Теор. Mw (Да)	Теор. pI
1	25.06	P11021	GRP78_HUMAN	78 кДа глюкоза-регулируемый белок	72288	5.07
2	6.95	P37802	TAGL2_HUMAN	Трансгелин-2	22391	8.45
3	2.99	P55072	TERA_HUMAN	Переходная АТФаза эндоплазматического ретикулума	89322	5.14
4	2.98	P08238	HS90B_HUMAN	Белок теплового шока HSP 90-бета	83264	4.96
5	2.77	O00170	AIP_HUMAN	АН рецептор-взаимодействующий белок	37636	5.88
6	2.70	P38646	GRP75_HUMAN	Белок теплового шока 70 кДа белок 9	73600	6.16
7	2.39	Q92597	NDRG1_HUMAN	Белок NDRG1	42835	5.49
8	2.36	P60709	ACTB_HUMAN	Цитоплазматический актин 1	41737	5.29
9	2.32	Q13501	SQSTM_HUMAN	Секвестосома-1	47687	5.1
10	2.29	P01584	IL1B_HUMAN	Интерлейкин-1 бета	30748	5.91
11	2.26	P55327	TPD52_HUMAN	Опухолевый белок D52	24327	4.79
12	2.13	P11142	HSP7C_HUMAN	Конъюгат белка теплового шока 71 кДа	70898	5.37
13	2.08	Q14533	KRT81_HUMAN	Кератин, тип II кутикулярный Hb1	54928	5.4

14	2.08	P14625	ENPL_HUMAN	Эндоплазмин	92469	4.73
15	2.01	P08727	K1C19_HUMAN	Кератин, тип I цитоскелетный 19	44106	5.05
16	0.50	P33316	DUT_HUMAN	Митохондриальная дезоксиуридин 5'-трифосфат нуклеотидогидролаза	26563	7.96
17	0.48	P16949	STMN1_HUMAN	Статмин	17303	5.76
18	0.44	Q14847	LASP1_HUMAN	LIM и SH3 домен-содержащий белок 1	29717	6.61
19	0.43	P29692	EF1D_HUMAN	Фактор элонгации 1-дельта	31122	4.9
20	0.39	Q8TCA0	LRC20_HUMAN	Лейцин-богатый содержащий повторы белок 20	20500	6.55
21	0.36	P07910	HNRPC_HUMAN	Гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины C2/C2	33670	4.95
22	0.34	Q14847	LASP1_HUMAN	LIM и SH3 домен-содержащий белок 1	29717	6.61
23	0.25	P60174	TPIS_HUMAN	Триозафосфат изомеразы	30791	5.65
24	0.22	P07858	CATB_HUMAN	Катепсин Б	37800	6.3

3.5.4.2. Биоинформатический анализ полученных данных

Функциональный анализ, анализ возможных взаимодействий регулируемых белков, а также белков, предположительно участвующих в клеточном ответе на воздействие исследуемых веществ, был произведён с помощью программы IPA. Результаты анализа представлены на рисунке 107А, Б. С помощью данного анализа были предсказаны возможные функции белков, регулируемых под действием Rhiz на клетки. Затем данные белки были помещены в соответствующие функциональные категории (Рис. 107А). В результате, было предсказано, что клеточное движение должно быть ингибировано под действием вещества на клетки (6 из 9 процессов относящихся к данной функциональной категории имели отрицательное значение z-оценки, рис. 107А), что говорило о возможной антимигранторной активности Rhiz. Примечательно, что одновременно с этим была предсказана активация процессов, связанных с выживанием и пролиферацией клеток (Рис. 107А), и ингибирование процессов, связанных с клеточной гибелью (Рис. 107А). Более того, степень ингибирования двух процессов, связанных с клеточной гибелью, имела значение z-оценки < -2 (Рис. 107А), и, таким образом, было предсказано значительное и статистически достоверное подавление данных процессов.

Анализ возможных взаимодействий белков, регулируемых под действием Rhiz на клетки, а также белков, предположительно участвующих в клеточном ответе на воздействие исследуемого вещества, был также выполнен с помощью программы IPA (Рис. 107Б). Как следует из представленных данных, такие важные киназы, как ERK1/2, p38, JNK1/2, PI3K и Akt, а также процессы, в которых они принимают участие, могут быть

потенциальными мишенями или эффекторами, задействованными в реализации биологической активности исследуемого вещества.

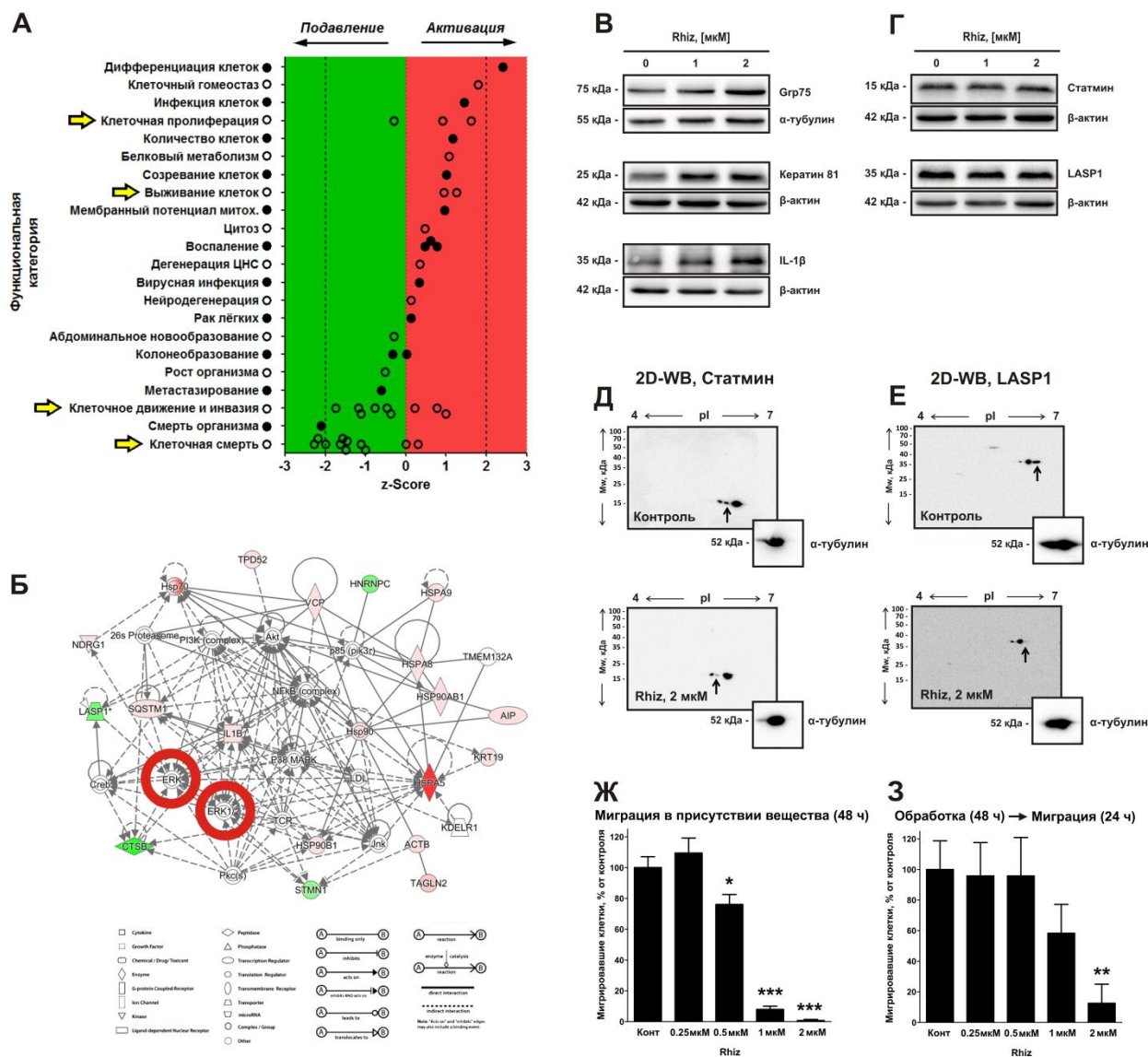


Рисунок 107. (А) Функциональный анализ белков, регулируемых под действием Rhiz на клетки PC-3, проведённый с использованием программы IPA и алгоритма z-оценки. Биологические процессы, для которых была предсказана активация, имеют z-оценку > 0 , для которых было предсказано их ингибирование – имеют z-оценку < 0 . (Б) Анализ предсказанных основных белок-белковых взаимодействий. Основная схема белок-белковых взаимодействий, предсказанных с использованием программы IPA. Представлены возможные взаимодействия белков, регулируемых под действием Rhiz (закрашенные фигуры: красные – белки, экспрессия которых увеличивается; зелёные – белки, экспрессия которых уменьшается) и предсказанных программой (но не открытых в проведённых нами 2D-PAGE экспериментах, незакрашенные фигуры). Пунктирными

линиями обозначены не прямые белок-белковые взаимодействия, сплошными линиями – прямые взаимодействия (согласно базам данных IPA). На рисунке приведены названия генов, соответствующих регулируемым белкам. Киназа ERK1/2 была предсказана как одна из молекул, возможно вовлечённых в клеточный ответ на действие Rhiz, и выделена красным кружком. (В, Г) 1D-Вестерн-блоттинг анализ белков Grp75, кератина 81, IL-1 β (В), а также статмина и LASP1 (Г). (Д, Е) 2D-Вестерн-блоттинг анализ изменений, происходящих со статмином и LASP1. Регулируемые белковые изоформы, открытые с помощью 2D-PAGE, обозначены стрелками. (Ж, З) Оценка антимиграторной активности Rhiz. Клетки были помещены в планшетные вставки в среде с пониженным содержанием FBS и содержащую Rhiz в течение 48 ч (Ж), либо обработаны Rhiz в течение 48 ч и затем помещены в планшетные вставки в среды с пониженным содержанием FBS (без Rhiz) и инкубированы в течение 24 ч (З)

3.5.4.3. Валидация регулируемых белков, открытых методом протеомики

Для подтверждения (валидации) регуляции открытых методом протеомики белков использовали метод одно- и двумерного Вестерн-блоттинга. Было проанализировано пять белковых пятен, выбранных из таблицы 10. Содержащиеся в них белки были идентифицированы как Grp75 (также известный как heat shock 70 kDa protein 9 или stress-70 protein, за экспрессию которого ответственен ген *HSPA9*), IL-1 β (ген *IL1B*), кератин 81 (ген *KRT81*), статмин (ген *STMN1*), и LASP1 (ген *LASP1*). Данные белки, помимо всего прочего, вовлечены в процессы миграции и инвазии опухолевых клеток, а также процессы метастазирования.

Далее, с использованием одномерного Вестерн-блоттинга было показано увеличение общего количества Grp75, кератина 81 и прекурсорной формы IL-1 β (Mw = 35 кДа) под действием Rhiz на опухолевые клетки PC-3 (Рис. 107В, табл. 10). Примечательно, что одномерный Вестерн-блоттинг не выявил значительных изменений в общем количестве статмина и LASP-1 (Рис. 107Г). Поэтому дальнейшую валидацию регуляции этих белков проводили с помощью 2D-Вестерн-блоттинга. Для каждого из белков было найдено, по меньшей мере, три белковых пятна, представляющих собой изоформы этих белков с разными значениями pI, но имеющих близкие значения Mw (Рис. 107Д, Е). Эти изоформы могли быть результатом возможной посттрансляционной модификации белков. Для статмина уменьшение интенсивности пятна с pI ~ 6.0 (среднее пятно) под действием Rhiz на клетки было подтверждено с использованием специфических антител (Рис. 107Д). Для белка LASP-1 также при помощи Вестерн-блоттинга было выявлено уменьшение

интенсивности пятна с $pI \sim 6.5$ (пятно, находящееся справа, рис. 107Е). Упомянутая выше посттрансляционная модификация могла быть фосфорилированием или ацетилированием белка, что могло приводить к наблюдаемым изменениям, однако подробное изучение данного процесса не входило в наши задачи.

3.5.4.4. Способность Rhiz ингибировать миграцию опухолевых клеток РС-3

Функциональный анализ регулируемых под действием Rhiz на клетки РС-3 белков выявил возможную способность Rhiz подавлять движение и инвазию опухолевых клеток (Рис.107А). Для доказательства данного предположения, мы провели эксперимент по исследованию ингибирования клеточной миграции с использованием непокрытых вставок (инсёртов) для 12-луночного планшета (Рис. 107Ж, Е). В результате было показано, что Rhiz был способен ингибировать миграцию клеток через поры мембраны в двух различных экспериментальных условиях. В первом эксперименте антимиграторная активность была детектирована после 48 ч культивирования клеток с веществом во время проведения эксперимента. Ингибирующая миграцию клеток активность Rhiz была обнаружена в нецитотоксических концентрациях порядка 0.5 мкМ (Рис. 107Ж), что ниже цитотоксических концентраций, значение которых было определено ранее как > 1 мкМ [189].

Во втором случае эффект вещества на миграцию клеток был исследован в течение 24 ч на клетках, предварительно обработанных Rhiz в течение 48 ч (Рис. 107Е). Для данного эксперимента были использованы только выжившие после обработки веществом клетки, что исключало уменьшение количества мигрировавших клеток вследствие цитотоксических или антипролиферативных эффектов соединения. В данном эксперименте Rhiz уменьшал миграцию клеток в концентрациях порядка 1 и 2 мкМ (Рис. 107Е).

3.5.4.5. Исследование цитопротекторной роли киназы ERK1/2 в клеточном ответе на действие Rhiz

Одновременно с проапоптотическим противоопухолевым эффектом Rhiz, который был показан нами ранее [189], IPA анализ предсказал активацию определённых цитопротекторных механизмов в ответ на воздействие Rhiz на клетки рака простаты человека (Рис. 107А). Известно, что киназа ERK1/2 может быть вовлечена как в проапоптотические, так и в цитопротекторные процессы и механизмы в различных типах

рака, включая рак простаты [322, 323]. Более того, IPA анализ предсказал вовлечение данной киназы в клеточный ответ на действие Rhiz (Рис. 107Б). По этой причине мы исследовали эффект обработки Rhiz на киназу ERK1/2 в четырёх различных линиях клеток рака простаты (LNCaP, PC-3, DU145 и VCaP) с помощью Вестерн-блоттинга (Рис. 108А).

Активация данной киназы была обнаружена во всех четырёх клеточных линиях после обработки их Rhiz в течение 48 ч (Рис. 108А). Для того чтобы более детально исследовать роль процесса активации ERK1/2 в реализации цитотоксического эффекта Rhiz, мы провели совместную обработку клеток Rhiz и ингибитором PD98059 (ингибитор киназы MEK1/2), и FR180204 (ингибитор киназы ERK1/2) (Рис. 108А-Г). Известно, что активированная киназа MEK1/2 прямо и избирательно фосфорилирует ERK1/2, обеспечивая сигнальную трансдукцию через путь RAS/RAF/MEK/ERK [323]. Вследствие этого ингибирование активности MEK1/2 ингибитором PD98059 ведёт к ингибированию фосфорилирования (а, следовательно, и активности) ERK1/2, что также было показано в наших экспериментах (Рис. 108А). В то же время ингибирование ферментативной активности ERK1/2 с помощью FR180204 происходит без подавления фосфорилирования данной киназы [324] (данные не показаны). Так, PD98059 был способен подавлять Rhiz-индуцируемую активацию киназы ERK1/2 в клетках LNCaP, PC-3, DU145 и VCaP (Рис. 108А), а совместная обработка клеток Rhiz и PD98059 или FR180204 вела к увеличению цитотоксической активности исследуемого морского природного соединения в соответствующих клетках (Рис. 108Б, В). Поскольку клетки VCaP были сами по себе чувствительны к данным ингибиторам, для исследования эффекта комбинированной обработки нами был использован метод Чоу-Талалая, который подтвердил синергический эффект Rhiz и каждого из ингибиторов, применяемых совместно (Рис. 108Г). Результаты данных экспериментов говорят о цитопротекторной роли активации ERK1/2 в клетках рака простаты в ответ на их обработку Rhiz. Таким образом, активация ERK1/2 может быть механизмом устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию исследуемого вещества.

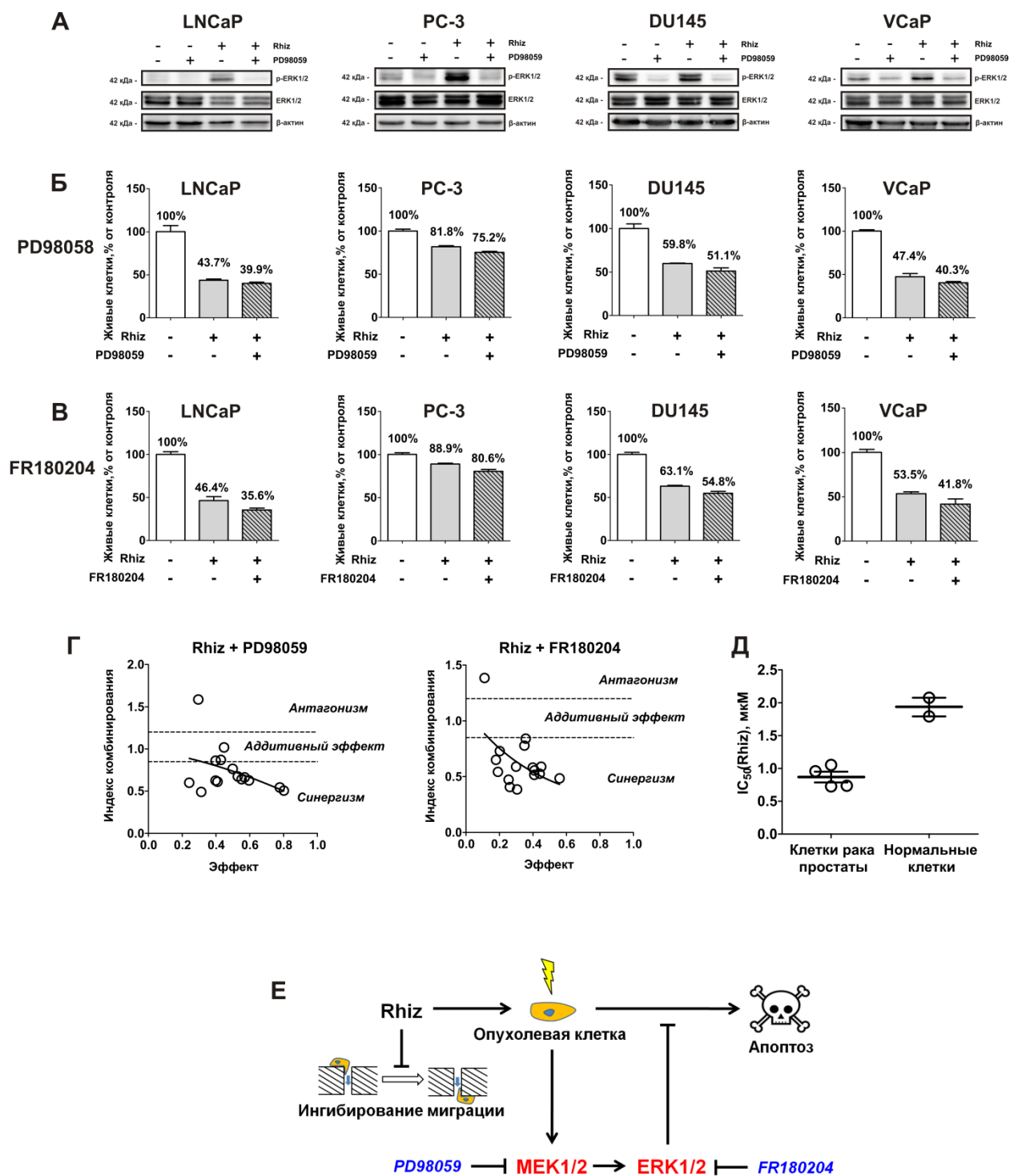


Рисунок 108. Исследование активации ERK1/2 в клетках рака простаты под действием Rhiz и её эффект на индукцию апоптоза. (А) Вестерн-блоттинг анализ активации ERK1/2 в обработанных Rhiz и/или PD98059 клетках LNCaP, PC-3, DU145 и VCaP в течение 48 ч. (Б, В) Анализ жизнеспособности клеток, обработанных Rhiz совместно с PD98059 (ингибитор MEK1/2) или FR180204 (ингибитор ERK1/2). Клетки были предварительно обработаны ингибиторами в течение 1 ч, а затем Rhiz в течение 48 ч. (Г) Эффект Rhiz в сочетании с PD98059 или FR180204 на клетки VCaP, исследованный методом Чоу-Талалая. Индекс комбинирования рассчитывали с помощью программы

CompuSyn 1.0. Жизнеспособность клеток была определена с помощью MTS-теста. (Д) IC₅₀ Rhiz на клетках рака простаты человека PC-3, DU145, VCaP и LNCaP или неопухолевых клетках JB6 Cl41 и MRC-9. (Е) Предполагаемый механизм действия Rhiz: одновременное ингибирование миграции опухолевых клеток, активация цитопротекторного сигнального пути MEK/ERK и индукция апоптоза

Дополнительно нами была исследована цитотоксическая активность изучаемого соединения не только на опухолевых клетках рака простаты, но и на двух линиях нормальных неопухолевых клеток (JB6 Cl41 и MRC-9). В результате было показано, что Rhiz проявляет более высокую цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам (Рис. 108Д).

3.5.4.6. Обсуждение результатов исследования эффекта Rhiz на протеом клеток рака простаты человека

Знания о механизме действия потенциальных лекарственных препаратов необходимы для их дальнейшего продвижения в клиническую практику, а также для предсказания возможных побочных эффектов. В данной главе диссертации с использованием методов протеомики был изучен механизм действия морского природного соединения Rhiz, для которого ранее была показана перспективная *in vitro* и *in vivo* активность на моделях рака простаты человека, в том числе и устойчивых к гормональной терапии [189, 325]. Нами было найдено несколько белков, претерпевающих изменения при обработке клеток Rhiz. Так, было выявлено уменьшение экспрессии специфических изоформ белков статмина и LASP1, а также увеличение экспрессии общего количества Grp75, кератина 81 и прекурсорной изоформы IL-1 β . Известно, что статмин и LASP1 принимают участие в процессах пролиферации, миграции и инвазии клеток рака простаты и сверхэкспрессированы во многих типах опухолевых клеток [326-328]. В клетках рака простаты снижение экспрессии статмина ассоциировано с индукцией апоптоза и увеличением чувствительности клеток к противоопухолевым препаратам [326, 329], в то время как IL-1 β проявляет свои проапоптотические функции как в опухолевых, так и в нормальных клетках [171, 294]. Известно, что профили экспрессии кератинов различны в опухолевых и нормальных клетках простаты [297]. Существует несколько работ, в которых показана роль кератинов в процессах инвазии опухолевых клеток, метастазировании опухоли и общем ответе на химиотерапию (обозрено в [298]), в то же время роль кератина 81, экспрессия которого увеличивалась в клетках рака простаты под

действием на них Rhiz, не выявлена. Шаперон Grp75 принимает участие в фолдинге белков, а также же в цитопротекторных процессах. Роль данного белка в развитии и терапии опухолевых заболеваний двоякая: с одной стороны, он может защищать опухолевые клетки от апоптоза, а с другой – презентовать опухолевую клетку иммунной системе организма, провоцируя тем самым иммуногенность опухоли [330, 331].

Анализ протеомных данных с помощью программы IPA определил возможное участие регулируемых белков в процессах, ассоциированных с ростом и развитием опухолей, таких как смерть и выживание опухолевых клеток, движение и инвазия, пролиферация и метастазирование. При этом было предсказано, что несколько процессов, отнесённых к функциональной категории «клеточное движение и инвазия», были подавляемыми при действии на клетки Rhiz. Поэтому мы предположили, что это соединение ингибирует миграцию клеток, что и было подтверждено в дальнейших экспериментах. Так, Rhiz был способен подавлять миграцию клеток рака простаты в своих нецитотоксических концентрациях, а также ингибировать миграцию клеток, переживших предварительную обработку веществом.

Мы определили несколько цитопротекторных механизмов, которые могут быть активированы вследствие обработки клеток Rhiz одновременно с проапоптотическими механизмами (Рис. 108Е). Так, IPA анализ предположил вовлечение киназы ERK1/2 в производимый Rhiz эффект. Сначала активация данной киназы под действием вещества на клетки была доказана с помощью Вестерн-блоттинга в нескольких линиях клеток рака простаты. Затем было показано, что ингибирование киназы MEK1/2, расположенной выше по сигнальному каскаду, или прямое ингибирование киназы ERK1/2 ведёт к увеличению цитотоксической активности исследуемого соединения (в клетках рака простаты как устойчивых, так и чувствительных к гормональной терапии). Таким образом, было установлено, что активация ERK1/2 является цитопротекторным фактором, а ингибирование данного процесса может увеличить противоопухолевый эффект Rhiz. Так, ранее было показано, что комбинация мультитаргетных препаратов со специфическими ингибиторами определённых сигнальных путей может приводить к существенному повышению эффективности терапии [332, 333]. На настоящий момент существует несколько ингибиторов RAF, MEK и ERK, уже используемых в клинической практике, либо находящихся на различных стадиях клинических испытаний [323, 333]. Таким образом, возможная комбинированная терапия Rhiz с ингибиторами сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK должна быть принята во внимание при дальнейших предклинических и клинических испытаниях препарата с целью повышения его цитотоксических противоопухолевых свойств.

Таким образом, способность Rhiz ингибировать миграцию опухолевых клеток была определена как дополнительный механизм его противоопухолевого действия. Было показано, что это соединение более активно в клетках рака простаты, чем в нормальных клетках. Было выявлено, что активация киназы ERK1/2 под действием вещества на клетки несёт цитопротекторную функцию, и, таким образом, может быть связана со снижением противоопухолевой активности вещества во время терапии. Сочетанная терапия с ингибиторами киназ MEK1/2 и/или ERK1/2 была более эффективна в экспериментах *in vitro*, и поэтому должна быть принята во внимание в дальнейших *in vivo* экспериментах.

3.5.5. Исследование активности синтетических производных ризохалина

Далее мы провели работы по оптимизации структуры Rhiz с целью исследования зависимости структура – активность в ряду полученных синтетических производных, а также улучшения противоопухолевых свойств этого соединения. Для полученных производных были определены такие важные биологические свойства, как цитотоксическая и антипролиферативная активность, способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток, способность ингибировать цитопротекторную аутофагию и сигналинг андрогенового рецептора.

Из ризохалина (**31**) – исходного природного соединения для получения ризохалинина (Rhiz) – с использованием реакций, представленных на рисунке 109, был получен ряд производных. Так, были проведены следующие модификации: 1) отщепление остатка сахара от молекулы ризохалина; 2) восстановление 18-кето группы до гидроксильной; и 3) последовательное восстановление и аминирование 18-кето группы. Агликон ризохалина – ризохалинин (Rhiz) – был получен из ризохалина [51] с помощью гидролиза как описано ранее [52] (Рис. 109). Производные **75–78** были получены из ризохалина и ризохалинина при помощи гидрирования (производные **75** и **76**) или восстановительного аминирования (производные **77** и **78**). Все вещества были очищены при помощи обращённофазовой колоночной флеш-хроматографии или обращённофазовой ВЭЖХ. Структуры соединений были установлены инструментальными методами с использованием ¹H ЯМР спектроскопии. Синтез, очистка и установление структур веществ были проведены к.х.н. Табакмахер К.М. и д.х.н. Макарьевой Т.Н.

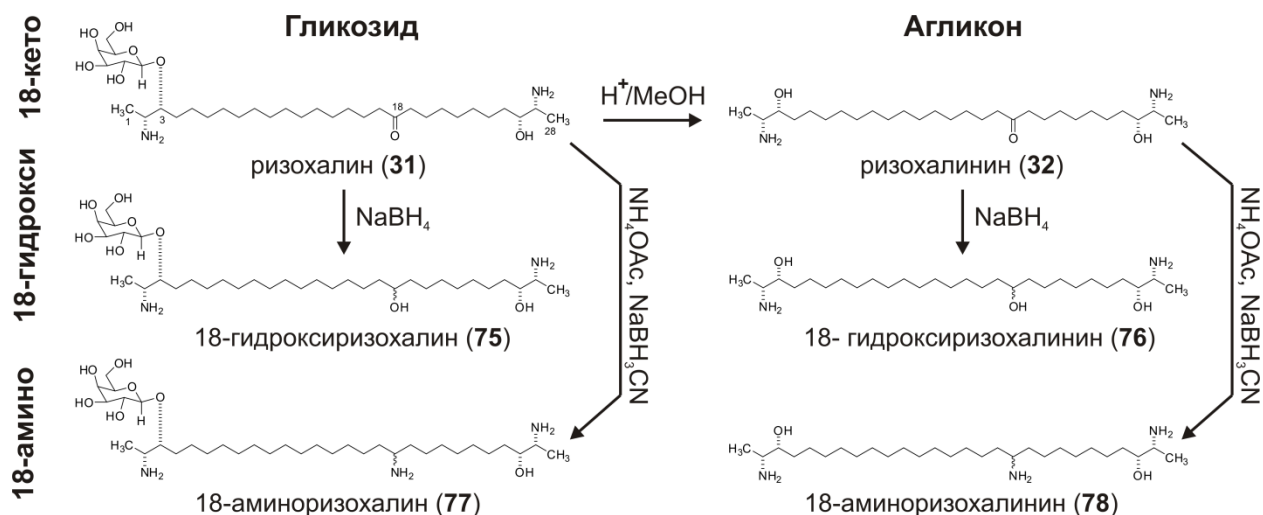


Рисунок 109. Структуры и схема получения производных **32** и **75–78** из ризохалина **31**

3.5.5.1. Исследование цитотоксической активности синтетических производных ризохалина

Мы исследовали цитотоксическую и антипролиферативную активность полученных соединений. Активность соединения была исследована на клетках рака простаты человека PC-3, DU145, LNCaP, 22Rv1 и VCaP. Примечательно, что все клеточные линии кроме LNCaP были устойчивыми к действию абиратерона и энзалутамида вследствие отсутствия экспрессии AR (линии PC-3 и DU145), либо вследствие экспрессии AR-V7 (линии 22Rv1 и VCaP). Все исследуемые соединения проявили цитотоксическую активность по отношению к данным клеточным линиям в микро- и наномолярных концентрациях. При этом, агликоны **32**, **76** и **78** проявили в 10 раз большую *in vitro* активность по сравнению с соответствующими гликозидами **31**, **75** и **77** (Рис. 110А, табл. 11).

Таблица 11. IC_{50} синтезированных производных по отношению к опухолевым клеткам рака простаты человека после 48 ч обработки. В таблице указаны значения $IC_{50} \pm SEM$

Вещество	IC_{50} , мкМ				
	PC-3	DU145	LNCaP	22Rv1	VCaP
Ризохалин (31)	16.55±1.37	10.75±1.48	7.88±2.4	7.37±0.69	5.81±0.23
Ризохалинин (32)	1.14±0.04	1.05±0.02	1.69±0.38	0.87±0.33	0.42±0.11
18-Гидроксиризохалин (75)	22.62±0.3	24.38±0.38	9.34±0.57	11±1.14	15.89±5.23
18-Гидроксиризохалинин (76)	2.72±0.13	2.13±0.19	3.55±0.45	1.77±0.99	0.61±0.08
18-Аминоризохалин (77)	46.57±13.78	19.29±13.08	8.97±2.47	14.21±5.09	18.59±3.46
18-Аминоризохалинин (78)	3.39±0.30	7.82±1.12	9.31±2.12	3.46±1.2	2.67±0.52

значительного эффекта на прогрессию клеточного цикла обнаружено не было (данные не показаны). Таким образом, противоопухолевый эффект Rhiz и его производных является скорее цитотоксическим, нежели чем антипролиферативным.

3.5.5.3. Проапоптотическая активность синтетических производных ризохалина

Далее мы исследовали проапоптотические эффекты полученных производных. В клетках линии РС-3, обработанных исследуемыми веществами, было обнаружено увеличение популяции клеток, находящихся в фазе суб-G1, что говорило о происходящей фрагментации ДНК (Рис. 111А). В дополнение к этому, в клетках, обработанных веществами в течение 48 ч, была обнаружена активация каспазы-3/7 (Рис. 111Б). В общем случае агликоны **32**, **76** и **78** были примерно в 10 раз более активны по сравнению с соответствующими гликозидами **31**, **75** и **77** (то есть имели меньшую IC₅₀). Поэтому для дальнейших экспериментов нами были выбраны концентрации агликонов **32**, **76** и **78** порядка 2 мкМ и гликозидов **31**, **75** и **77** порядка 20 мкМ. В полном соответствии с результатами экспериментов по исследованию цитотоксической активности было установлено, что 18-кетопроизводные проявляют наибольшую апоптоз-индуцирующую активность в пределах одного и того же структурного семейства, в то время как 18-аминопроизводные проявили наименьшую активность. Соответственно проапоптотическая активность агликонов **32**, **76** и **78** была намного сильнее, чем активность гликозидов **31**, **75** и **77** (Рис. 111А, Б).

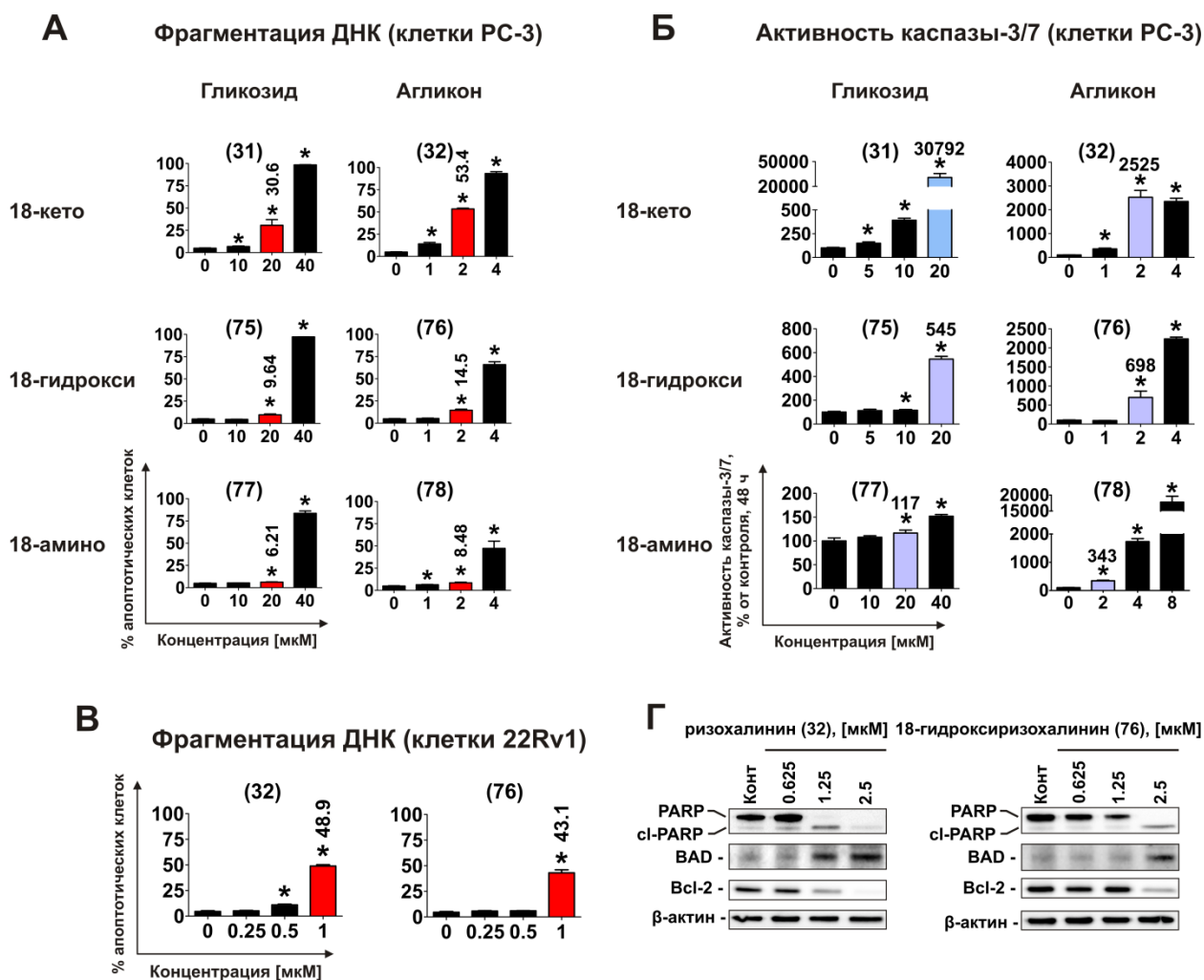


Рисунок 111. Проапоптотическая активность соединений **31**, **32** и **75-78** в клетках рака простаты человека. **(А)** Результаты исследования методом проточной цитометрии клеток РС-3, обработанных исследуемыми соединениями в течение 48 ч. Окрашивание ДНК с помощью PI было использовано для определения апоптотических (содержащих фрагментированную ДНК) клеток. Эффекты веществ затем были сравнены при 2 мкМ или 20 мкМ (соответствующие колонки выделены цветом). **(Б)** анализ активности каспазы-3/7 в клетках РС-3, обработанных веществами в течение 48 ч. Эффекты веществ затем были сравнены при 2 мкМ или 20 мкМ (соответствующие колонки выделены цветом). **(В)** Результаты исследования методом проточной цитометрии клеток 22Rv1, обработанных соединениями **32** и **76** в течение 48 ч. Эффекты веществ в концентрации 1 мкМ затем были сравнены (соответствующие колонки выделены цветом). **(Г)** Исследование изменений, происходящих с некоторыми про- и антиапоптотическими белками в клетках 22Rv1, обработанных соединениями **32** и **76** в течение 48 ч. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

Таким образом, ризохалинин (Rhiz, **32**) и 18-гидроксиризохалинин (**76**) показали наиболее сильную цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам человека, опосредованную через проапоптотические механизмы. Поэтому мы дополнительно исследовали проапоптотический эффект этих производных в устойчивых к гормональной терапии клетках 22Rv1. Как и в экспериментах с клетками PC-3, изучаемые вещества индуцировали фрагментацию ДНК клеток 22Rv1 (Рис. 111В). При этом стоит отметить, что проапоптотическое действие веществ было более сильным в клетках 22Rv1 по сравнению с клетками PC-3 (Рис. 111В). Кроме того мы изучали эффект этих двух соединений – **32** и **76** – на уровне экспрессии белков семейства Bcl-2, также играющих важную роль во многих про- и антиапоптотических процессах (Рис. 111Г). В результате было обнаружено увеличение экспрессии проапоптотического белка BAD и снижение экспрессии антиапоптотического Bcl-2 (Рис. 111Г), в то время как экспрессия Bax и Bcl-xL не менялась значительно (данные не показаны). Другой маркер апоптоза – расщеплённая PARP – был обнаружен в клетках, обработанных **32** и **76** (Рис. 111Г). Таким образом, результаты экспериментов свидетельствуют об апоптотическом характере индуцируемой веществами клеточной гибели, что прекрасно согласуется с ранее полученными данными об индуцируемом Rhiz каспаза-зависимом апоптозе [189].

3.5.5.4. Эффект синтетических производных ризохалина *in vitro* на аутофагию

Ранее нами было показано, что Rhiz ингибирует цитопротекторную аутофагию в опухолевых клетках и таким образом может вносить вклад в преодоление лекарственной устойчивости [189]. Поэтому мы далее исследовали эффект синтезированных производных на аутофагию в клетках рака простаты человека. Все шесть веществ увеличивали уровень белка LC3В-II в обработанных ими в течение 48 ч клетках PC-3, что свидетельствовало о способности ингибировать аутофагию (Рис. 112). Примечательно, что, в отличие от экспериментов по исследованию цитотоксических свойств, где наибольшую активность проявили 18-кетопроизводные, в настоящих экспериментах наиболее сильное ингибирующее действие на аутофагию оказывали 18-гидроксипроизводные (Рис. 112). При этом 18-аминопроизводные имели наиболее слабый эффект (Рис. 112).

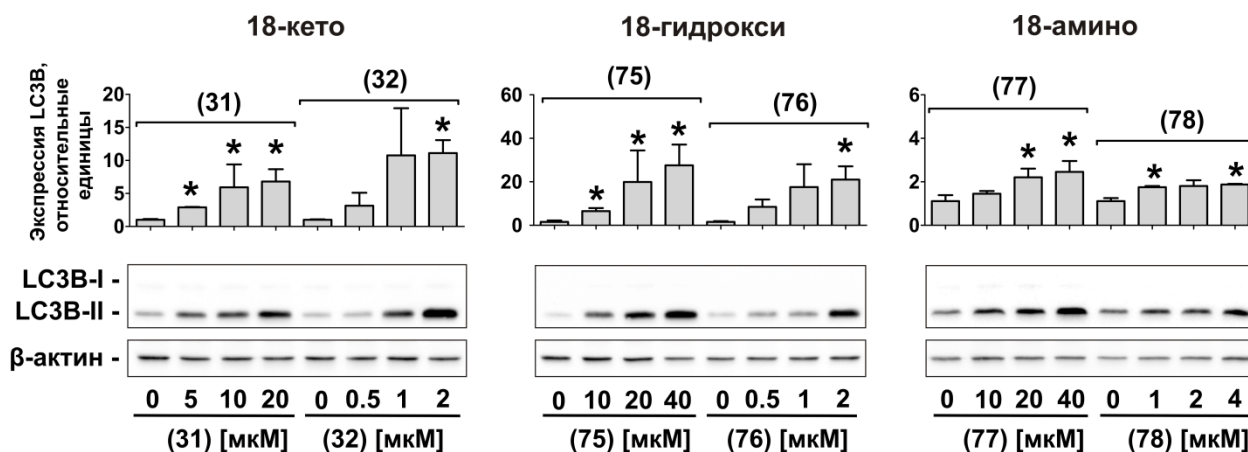


Рисунок 112. Вестерн-блоттинг анализ изменений уровней белков LC3B-I/II, происходящих клетках РС-3 под действием на них исследуемых веществ в течение 48 ч. Сигналы были оценены количественно с помощью программы Quantity One 4.6 и нормализованы к сигналу β-актина. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.5.5.5. Эффект синтетических производных ризохалина на сигналинг андрогенового рецептора *in vitro*

Известно, что экспрессия в клетках рака простаты варианта сплайсинга AR-V7 ведёт к автоактивации сигналинга андрогенового рецептора (AR-сигналинга), что обуславливает устойчивость таких клеток к препаратам энзалутамид и абиратерон как *in vitro*, так и *in vivo* [99, 293, 334]. В связи с этим мы исследовали эффект синтезированных производных на экспрессию AR-V7, а также AR-FL и AR-V7-зависимый сигналинг.

Ранее нами было показано, что Rhiz способен понижать уровень экспрессии PSA в клетках 22Rv1, не стимулированных 5α-дигидротестостероном (DHT) и экспрессируемого в клетках за счёт наличия AR-V7 [189]. В связи с этим нами было сделано предположение о способности Rhiz ингибировать AR-сигналинг [189]. Исследование эффекта синтезированных производных на те же биологические мишени выявило тот факт, что агликоны **32**, **76** и **78** ожидаемо подавляли экспрессию PSA в клетках 22Rv1, однако весьма неожиданно было установлено, что гликозиды **31**, **75** и **77** вызывают увеличение уровня экспрессии PSA (Рис. 113). Полученные данные свидетельствуют о важности удаления сахарного остатка из молекулы ризохалина для придания ей способности ингибировать AR-сигналинг.

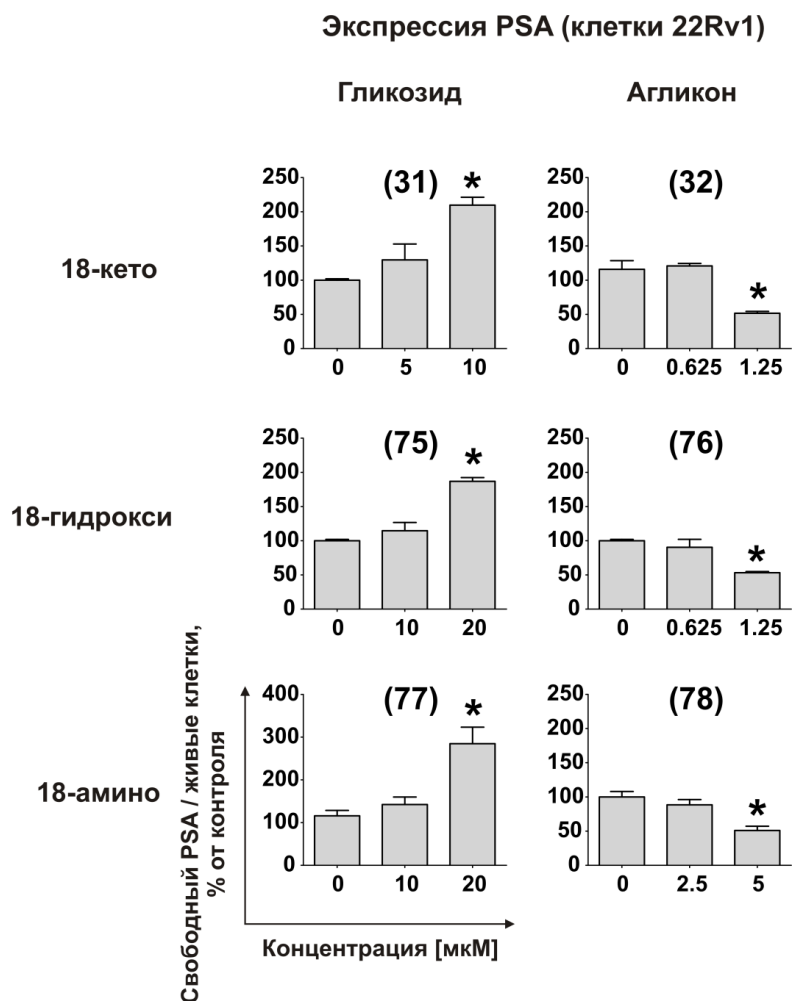


Рисунок 113. Эффект соединений **31, 32 75-78** на экспрессию PSA в клетках 22Rv1. Уровень экспрессии был определён с помощью метода ИФА и нормализован к количеству жизнеспособных клеток. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

На основании суммы данных о цитотоксической, антипролиферативной, проапоптотической активности, а также способности ингибировать аутофагию и AR-сигналинг, был сделан вывод, что ризохалинин (**32**) и 18-гидроксиризохалинин (**76**) являются наиболее перспективными в качестве потенциальных терапевтических молекул для лечения лекарственно-устойчивого рака простаты человека (Табл. 12). Способность ингибировать AR-сигналинг для этих двух соединений была исследована более подробно. Клетки 22Rv1 экспрессируют как AR-FL, так и AR-V7 (Рис. 114А), и поэтому являются устойчивыми к гормональной терапии, а также препаратам нового поколения, таким как абиратерон и энзалутамид [99, 334]. С помощью техники ПЦР в реальном времени (qPCR) мы исследовали эффект соединений **32** и **76** на экспрессию мРНК соответствующих генов,

контролируемых AR-V7 (гены *AKT1* и *UBE2C*) (Рис. 114Б) и AR-FL (гены *PSA*, *TMPRSS2* и *FKBP5*) (Рис. 114В). AR-сигналинг и экспрессия соответствующих генов были активированы с помощью обработки клеток 5 α -дигидротестостероном (DHT). В соответствии с данными, представленными на рисунке 113, оба соединения подавляли экспрессию мРНК соответствующей PSA, а также экспрессию двух других генов, контролируемых AR-FL: гены *TMPRSS2* и *FKBP5* (Рис. 114В). Ещё более важен был тот факт, что экспрессия генов *AKT1* и *UBE2C*, контролируемых AR-V7, также подавлялась под действием исследуемых соединений на клетки 22Rv1 (Рис. 114Б). Примечательно, что ризохалинин (**32**) и 18-гидроксиризохалинин (**76**) также ингибировали экспрессию AR-V7 на белковом уровне (Рис. 114Г), что может, по крайней мере отчасти, объяснить ингибирование AR-V7-зависимого сигналинга. В противоположность этому, уровни мРНК, соответствующих AR-V7 и AR-FL, не изменялись под воздействием на клетки веществ (Рис. 114Б, В). Таким образом, был сделан вывод, что ризохалинин (**32**) и 18-гидроксиризохалинин (**76**) способны подавлять как AR-FL-, так и AR-V7-зависимый сигналинг.

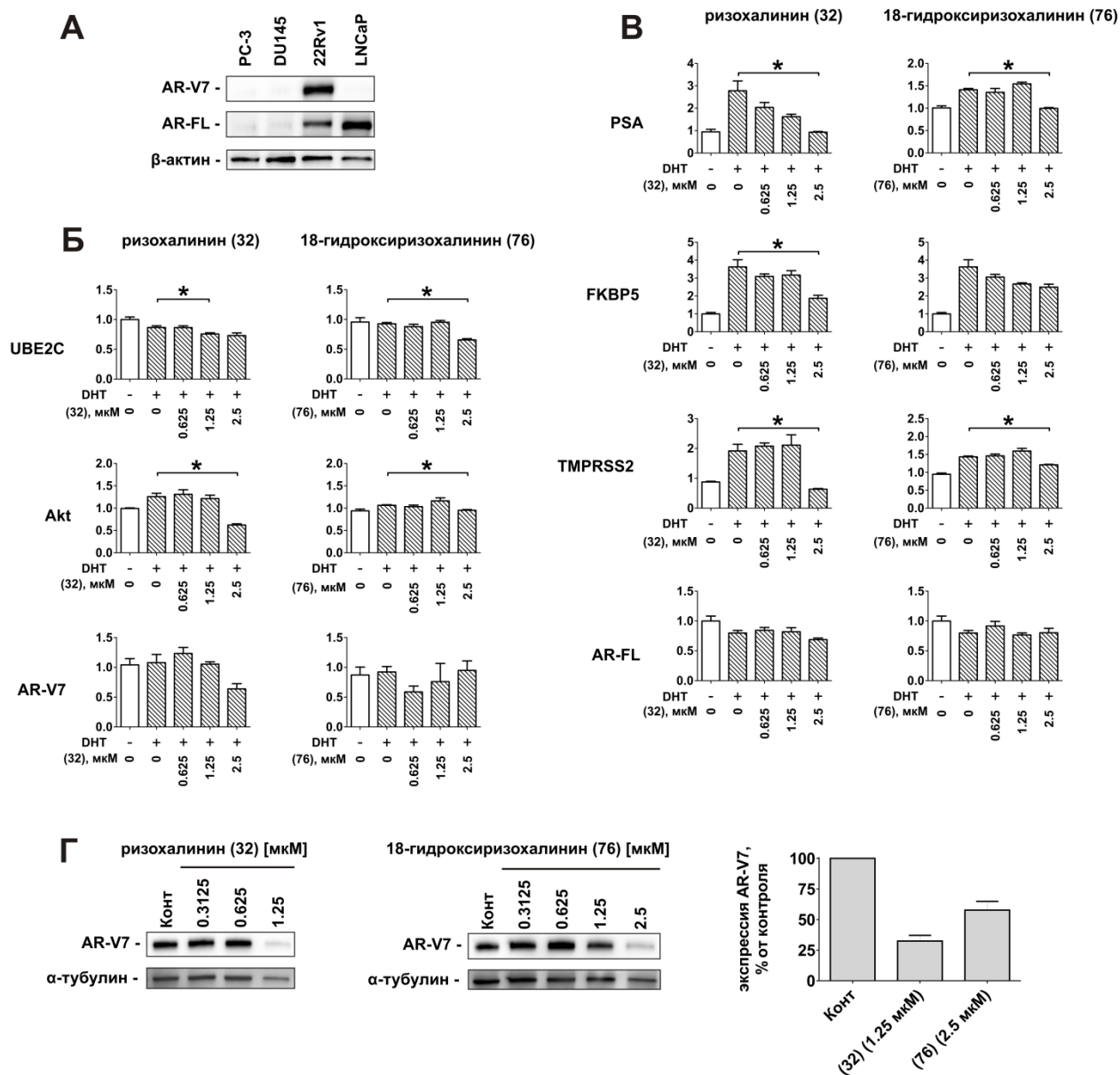


Рисунок 114. Эффект ризохалинина (32) и 18-гидроксиризохалинина (76) на экспрессию генов, контролируемых AR-FL и AR-V7. **(А)** Исследование экспрессии белковых форм AR-V7 и AR-FL в клетках рака простаты человека. **(Б, В)** Уровни экспрессии мРНК генов, контролируемых AR-V7 (**Б**) или AR-FL (**В**). Клетки были обработаны в течение 30 мин исследуемыми веществами в среде 0.1% FBS/RPMI, а затем 20 нМ DHT в течение 24 ч. **(Г)**, Уровни экспрессии AR-V7 в клетках 22Rv1, обработанных веществами 32 и 76 в течение 48 ч. Сигналы были оценены количественно с помощью программы Quantity One 4.6 и нормализованы к сигналу β-актина. * – статистически достоверное отличие значений от контроля ($p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента)

3.5.5.6. Обсуждение результатов исследования эффектов синтетических производных ризохалина *in vitro*

В результате проведённых нами экспериментов был сделан вывод о том, что синтетические производные ризохалина проявляют цитотоксическую активность по отношению к клеткам рака простаты человека, причём эта активность увеличивается в ряду 18-амино < 18-гидрокси < 18-кетопроизводные. В общем случае агликоны были примерно в 10 раз активнее по сравнению с соответствующими гликозидами. Элиминирование сахарного остатка является необходимым для способности соединений ингибировать AR-сигналинг, в то время как все соединения были способны ингибировать аутофагию. Ризохалинин (32) и 18-гидроксиризохалинин (76) были идентифицированы как наиболее перспективные производные (Табл. 12). Оба эти соединения ингибировали AR-FL- и AR-V7-зависимый сигналинг и индуцировали апоптоз опухолевых клеток. Ранее нами была показана высокая эффективность и низкая токсичность ризохалинина в *in vivo* экспериментах на моделях лекарственно-устойчивого рака простаты человека, в то время как 18-гидроксиризохалинин ещё не был испытан *in vivo*.

Таблица 12. Сводная таблица биологической активности исследуемых соединений 31, 32, 75–78

Биологическая активность*	Вещество					
	(31)	(32)	(75)	(76)	(77)	(78)
Цитотоксическая	++	+++	+	+++	+	++
Антипролиферативная	+	++	+	++	+	+
Проапоптотическая	++	+++	+	+++	+	++
Ингибирование аутофагии	++	++	+++	+++	+	+
Ингибирование AR-сигналинга	-	+++	-	+++	-	++

* “+++” – высокая; “++” – умеренная; “+” – низкая; “-” – нет активности.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1. Приборы и материалы

4.1.1. Приборы

Для упаривания водно-этанольных экстрактов использовали вакуумный роторный испаритель Buchi Rotavapor R-114. ИК-спектры записывали на спектрофотометре Bruker FT-IR Vektor 22 (Германия) в CHCl_3 , кювета из CaF_2 , 1.0 см. УФ-спектры получали на спектрофотометре UV-1601 (Shimadzu, Япония) в этаноле. Масс-спектры получали на приборах AMD-604S (AMDIpectra, Германия) а также на 4800 MALDI-ToF/ToF Analyzer (Applied Biosystems, США).

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР регистрировали на спектрометрах Bruker DPX-500 и Bruker Avance III-700 (Германия), используя в качестве растворителя DMSO-d_6 и CD_3OD . Спектры ^1H ЯМР снимали при 500 и 700 МГц, ^{13}C ЯМР при 250 и 350 МГц. Величины химических сдвигов приведены в системе δ в миллионных долях (м.д.) относительно сигнала Me_4Si в качестве внутреннего стандарта. Константы спин-спинового взаимодействия (J) приведены в герцах (Гц).

ВЭЖХ осуществляли на хроматографической системы Shimadzu LC-10A (Япония) с УФ-детектором, используя колонку с обращенной фазой ODS-UG-5A (250×4.6 мм).

Для определения интенсивности поглощения света растворами при длинах волн 492 и 690 нм использовали планшетный ридер-спектрофотометр μQuant (Bio-Tek Instruments, США) и Infinite® F200PRO reader (TECAN, Швейцария).

Клетки считали с помощью камеры Горяева (Россия) и инвертированного микроскопа Olympus CKX31 (Япония), а также Beckman Coulter Vi-CELL (Германия). Эксперименты с клеточными культурами проводили в стерильном боксе D-63450 Nanau (Германия). Эксперименты с использованием метода проточной цитометрии проводили с использованием прибора FACS Calibur (BD Biosciences, США).

В методе Вестерн-блоттинга комплекс белок-антитело обнаруживали на мембране с помощью ячейки Fusion SL со встроенной цифровой камерой (Pepqlab, Германия) для регистрации хемилюминесценции путём получения цифровой фотографии мембраны.

4.1.2. Реагенты

Для проведения экстракции и хроматографических экспериментов использовали очищенные перегонкой растворители: этанол (Россия), хлороформ производства НПК

Криохром (Россия), метанол производства Merck (Германия), а также дистиллированную воду. Для проведения биологических экспериментов использовали деионизированную воду.

Колоночную препаративную хроматографию проводили на силикагеле КСК (50–160 мкм, Сорбполимер, Россия) и полихrome-1 (Biolar, Латвия). Аналитическую ТСХ выполняли на пластинках Sorbfil с закрепленным на алюминиевой фольге слоем силикагеля СТХ-1А (5–17 мкм, Сорбполимер, Россия).

Для биологических экспериментов использовали цисплатин (раствор 1 мг/мл в воде), анизомицин, доцетаксель (10 мг/мл) производства NeoCorp (Германия); матригель производства BD Biosciences (США); эпидермальный фактор роста (EGF) производства Collaborative Research (США); NH_4Cl и кумасси бриллиантовый синий G 250 производства Carl Roth (Германия); D-люциферин, используемый при определении AP-1-, NF κ B- и p53-зависимой транскрипционной активности и Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent (MTS-реагент) для MTS-метода производства Promega (США); аннексин-V-FLUOS производства Roche (Германия) или аннексин-V-FITC производства BD Biosciences; пропидиум йодид (PI), МТТ-реагент, акридиновый оранжевый (АО) и колпептин производства Sigma (Германия); РНКазу А производства Sigma (Швеция); MG-132 производства Calbiochem (Германия); 3-метиладенин (3-МА) and z-VAD(OMe)-fmk (в тексте работы название используется как z-VAD-fmk или zVAD) производства Enzo Life Sciences (США); леупептин производства Serva (Германия), коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete Mini EDTA-free) производства Roche (Германия), TRITC-фаллоидин производства Invitrogen (Великобритания); энзалутамид и миноксидил производства Selleckchem (Германия); диазоксид производства R&D Systems (Германия); SP600125 (ингибитор JNK1/2), бафиломицин А1 и рапамицин производства LC Laboratories (США); кабазитаксель (10 мг/мл) производства Sanofi (Франция); пифитрин- α производства Cayman (США); PD98059 производства Merck Chemicals GmbH (Германия); FR180204 производства Adooq bioscience (США).

Сигнал комплекса белок-антитело в методе Вестерн-блоттинга детектировали с помощью системы Pierce[®] ECL-Detektions-Kit производства Thermo Scientific (США).

Для культивирования клеток использовали питательные среды RPMI-1640, MEM, DMEM и DMEM-GlutamaxTM-I производства Биолот (Россия) или Invitrogen (Великобритания); сыворотку крови эмбрионов крупного рогатого скота (FBS) производства Invitrogen (Великобритания); буферный раствор PBS, раствор пенициллин/стрептомицин (100х, 5000 ед/мл) и раствор трипсин-ЭДТА (0.25%) производства Invitrogen; питательную среду BME производства Sigma-Aldrich

(Великобритания); пенициллин/стрептомицин производства Bio-Whittaker (США); гентамицин-сульфат производства AppliChem (Германия); диметилсульфоксид производства Panreac (Испания); и L-глутамин производства Диаэм (Россия).

Использовали следующие специфические антитела против различных белков:

Антитела	Клональ- ность	Источник	Номер в каталоге	Разведение (для Вестерн- блотинга)	Производитель
anti- α -tubulin	моно	мышь	T5168	1:5000	Sigma-Aldrich
anti- β -actin HRP- conjugated	моно	мышь	sc-47778	1:5000	Santa Cruz
anti- β -actin	моно	мышь	CP01	1:10000	Calbiochem
anti-AIF	моно	кролик	#5318	1:1000	Cell Signaling
anti-apoE (pan)	моно	кролик	#13366	1:000	Cell Signaling
anti-AR	поли	кролик	sc-816	1:200	Santa Cruz
anti-AR-V7	моно	кролик	198394	1:1000	abcam
anti-Bad	моно	кролик	#9239	1:1000	Cell Signaling
anti-Bax	моно	кролик	#5023	1:1000	Cell Signaling
anti-Bcl-2	поли	кролик	#2876	1:1000	Cell Signaling
anti-Caspase-3	моно	кролик	#9665	1:1000	Cell Signaling
anti-Caspase-8	моно	мышь	#9746	1:1000	Cell Signaling
anti-Caspase-9	поли	кролик	sc-8355	1:200	Santa Cruz
anti-cleaved Caspase-3 PE-conjugated	моно	кролик	550821	1:50	BD Biosciences
anti-cathepsin B	поли	кролик	sc-13985	1:400	Santa Cruz
anti-cleaved Caspase-3	моно	кролик	#9664	1:1000	Cell Signaling
anti-cofilin-1	моно	кролик	#5175	1:1000	Cell Signaling
anti-CRABP1	моно	мышь	MA3-813	1:1000	Affinity Bio Reagents
anti-CRABP2	поли	коза	sc-10065	1:1000	SantaCruz
anti-CrkII	поли	кролик	#3492	1:1000	Cell Signaling
anti-eIF5A	моно	кролик	NB600-1077	1:10000	Novus Biochemicals
anti-enolase1	моно	мышь	ab54979	1:1000	abcam
anti-Grp75	моно	кролик	#3593	1:1000	Cell Signaling
anti-ERK	моно	мышь	#9107	1:2000	Cell Signaling
anti-GAPDH	моно	мышь	G041	1:10000	Millipore
anti-Grp75	моно	кролик	#3593	1:1000	Cell Signaling
anti-Hsp70	моно	мышь	ab61097-100	1:1000	abcam
anti-JNK	моно	кролик	#9258	1:1000	Cell Signaling
anti-IGF-1	моно	мышь	sc-74116	1:500	Santa Cruz
anti-IL-1 β	моно	мышь	#12242	1:1000	Cell Signaling
anti-Keratin 81	моно	мышь	sc-100929	1:500	Santa Cruz
anti-LASP1	поли	кролик	#8636	1:1000	Cell Signaling
anti-LC3B-I/II	поли	кролик	#2775	1:1000	Cell Signaling
anti-mTOR	моно	кролик	#2983	1:1000	Cell Signaling
anti-nucleolin	моно	мышь	#39541	1:1000	Active Motif
anti-p21 Waf1/Cip1	моно	кролик	#2947	1:1000	Cell Signaling
anti-p38	моно	кролик	#9212	1:1000	Cell Signaling
anti-p53	моно	мышь	#2524	1:1000	Cell Signaling
anti-PAK1	поли	кролик	#2602	1:1000	Cell Signaling
anti-PARP	поли	кролик	#9542	1:1000	Cell Signaling
anti-phospho-ERK	моно	кролик	#4377	1:1000	Cell Signaling
anti-phospho-JNK	моно	кролик	#4668	1:1000	Cell Signaling
anti-phospho-mTOR	моно	кролик	#5536	1:1000	Cell Signaling

anti-phospho-p38	моно	кролик	#4511	1:1000	Cell Signaling
anti-PTEN	моно	мышь	04-035	1:1000	Millipore
anti-SQSTM/p62	поли	кролик	#5114	1:1000	Cell Signaling
anti-Stathmin	поли	кролик	#3352	1:1000	Cell Signaling
anti-Survivin	поли	кролик	NB500-201	1:1000	Novus
anti-vimentin	поли	кролик	#3932	1:1000	Cell Signaling
anti-rabbit IgG-Alexa Fluor® 488		овца	#4412	1:1000	Cell Signaling
anti-goat IgG-HRP		кролик	#31433	1:10000	Thermo Scientific
anti-mouse IgG-HRP		овца	NXA931	1:10000	GE Healthcare
anti-rabbit IgG-HRP		коза	#7074	1:5000	Cell Signaling
anti-rat IgG-HRP		кролик	ab6734-1	1:5000	abcam

Для ПЦР в реальном времени использовали следующие специфические праймеры:

Название гена	тип	Т.Г. [°C]	Последовательность нуклеотидов
AR-V7	прямой	70	5'-CCA TCT TGT CGT CTT CGG AAA TGT TA-3'
	обратный		5'-TTT GAA TGA GGC AAG TCA GCC TTT CT-3'
AR-FL	прямой	61	5'-CAGTGGATGGGCTGAAAAAT-3'
	обратный		5'-GGAGCTTGGTGAGCTGGTAG-3'
PSA	прямой	64	5'-CAT CAG GAA CAA AAG CGT GA-3'
	обратный		5'-ATA TCG TAG AGC GGG TGT GG-3'
FKBP5	прямой	61	5'-AGGAGGGAAGAGTCCCAGTG-3'
	обратный		5'-TGGAAGCTACTGGTTTTTC-3'
TMPRSS2	прямой	64	5'-CAGGAGTGTACGGAATGTGATGGT-3'
	обратный		5'-GATTAGCCGTCTGCCCTCATTTGT-3'
UBE2C	прямой	57	5'-TGGTCTGCCCTGTATGATGT-3'
	обратный		5'-AAAAGCTGTGGGGTTTTTC-3'
AKT1	прямой	62	5'-TGGACTACCTGCACTCGGAGAA-3'
	обратный		5'-GTGCCGCAAAGGTCTTCATGG-3'
GAPDH	прямой	56	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA-3'
	обратный		5'-GAG GCA GGG ATG ATG TTC-3'

Т.Г. – температура гибридизации (отжига) праймеров

4.1.3. Клеточные культуры

Мышиные эпителиальные клетки JB6 P⁺ Cl41 и их стабильные трансфектанты JB6-Luc AP-1, JB6-Luc NFκB и JB6-Luc p53 (PG-13) были любезно предоставлены доктором Зиганом Донгом (Хормеловский институт, США).

Опухолевые клетки человека HeLa (рак шейки матки), THP-1 (лейкемия, моноциты), HL-60 (лейкемия, промиелоциты), SK-MEL-28 (меланома), MDA-MB-231 (рак молочной железы), PC-3, DU145, 22Rv1 и VCaP (рак простаты, устойчивый к гормональной терапии), LNCaP (рак простаты, чувствительный к гормональной терапии), клетки RT112, RT4, HT-1197, TCC-SUP, 486p и T24 (рак мочевого пузыря), MRC-5 и MRC-9 (нормальные фибробласты человека), HEK 293T (нормальные клетки почки эмбриона человека) и HUVEC (нормальные клетки сосудистого эндотелия человека) получили из коллекции ATCC (США).

Клетки NCCIT (герминальные опухолевые клетки), а также клеточные линии BL-2, CA46, EB1, DG-75, Namalwa и Raji (лимфома Бёркитта) получили из коллекции DSMZ (Германия).

Клетки Ramos и Daudi (лимфома Бёркитта) были любезно предоставлены профессором Кляйном (Стокгольм, Швеция).

Клетки TCam-2 и 2102EP (герминальные опухолевые клетки) были любезно предоставлены профессором Лооидженга (Роттердам, Нидерланды).

Цисплатин-устойчивые опухолевые линии NCCIT-R и 2102EP-R (цисплатин-устойчивые линии герминальных опухолевых клеток), были сгенерированы в Лаборатории Экспериментальной Онкологии (Университетская Клиника Гамбург-Эппендорф, Гамбург, Германия), как описано ранее [86, 221].

Клетки выращивали в инкубаторе Sanyo MCO-15AC (Япония) в суспензии для неприкреплённых (линии THP-1, HL-60, BL-2, CA46, EB1, DG-75, Namalwa и Raji, Ramos и Daudi) или в монослое для прикреплённых клеток (все остальные клеточные линии) при 37°C и в атмосфере 5% CO₂. Подлинность используемых клеточных линий была подтверждена коммерческим сервисом, предоставляемым компанией Multiplexion (Хайдельберг, Германия) или DSMZ (Брайуншвайг, Германия).

Для клеток линий JB6 P⁺ Cl41 и их стабильных трансфектантов JB6-Лус AP-1, JB6-Лус NFκB и JB6-Лус p53 (PG-13) использовали питательную среду 5% FBS/MEM, содержащую 5% (v/v) FBS, 2 mM L-глутамина и 15 мкг/мл гентамицин сульфата.

Для клеток линий SK-MEL-28 использовали питательную среду 10% FBS/MEM, содержащую 10% (v/v) FBS, 2 mM L-глутамина и 15 мкг/мл гентамицин сульфата.

Для клеток линий PC-3, DU145, 22Rv1, HeLa, THP-1, HL-60, TCam-2, RT112, RT4, 486p, T24, BL-2, CA46, EB1, DG-75, Namalwa, Raji, Ramos и Daudi использовали питательную среду 10% FBS/RPMI-GlutamaxTM-I, содержащую 10% (v/v) FBS и 1% раствора пенициллин/стрептомицина (конечная концентрация 50 ед/мл). Клетки PC-3 и DU145 являются устойчивыми к гормональной терапии.

Для клеток линий LNCaP использовали питательную среду 10% FBS/RPMI-GlutamaxTM-I, содержащую 10% (v/v) FBS, 1% раствора пенициллин/стрептомицина (конечная концентрация 50 ед/мл) и 1 mM пирувата натрия. Клетки LNCaP являются чувствительными к гормональной терапии.

Для клеток линии MDA-MB-231 использовали питательную среду DMEM, содержащую 10% (v/v) FBS, 2 mM L-глутамина и 15 мкг/мл гентамицина.

Для клеток линий MRC-9, VCaP, HT-1197 и HEK 293T использовали среду 10% FBS/DMEM-GlutamaxTM-I, содержащую 10% (v/v) FBS и 1% раствора пенициллин/стрептомицина (конечная концентрация 50 ед/мл).

Для клеток линий NCCIT, NCCIT-R, 2102EP и 2102EP-R использовали среду 10% FBS/DMEM F12, содержащую 10% (v/v) FBS и 1% раствора пенициллин/стрептомицина (конечная концентрация 50 ед/мл) и 2 mM L-глутамина.

Для клеток линии MRC-5 использовали среду 10% FBS/MEM-GlutamaxTM-I, содержащую 10% (v/v) FBS и 1% раствора пенициллин/стрептомицина (конечная концентрация 50 ед/мл) и 1 mM пирувата натрия.

Для клеток линии HUVEC (пассаж 15) использовали среду Clonetics[®] EGMTM-2 SingleQuots[®] (Lonza, США), содержащую 10% (v/v) FBS.

Для экспериментов по определению канцеропреventивной активности методом мягкого агара использовали питательную среду 10% FBS/BME, содержащую 10% (v/v) FBS, 15 мкг/мл гентамицин сульфата и 2 mM L-глутамина (концентрации указаны после разбавления раствором агара в воде).

4.1.4. Выделение исследуемых веществ

4.1.4.1. Общая информация

Микаламид А был выделен из асцидии *Polysincraton* sp., как описано ниже. Фрондозид А был выделен из кукумарии *Cucumaria okhotensis* и любезно предоставлен д.х.н. Калининым В.И., д.х.н. Авиловым С.А. и к.х.н. Сильченко А.С. Ризохалинин (агликон ризохалина) и другие полусинтетические производные были получены из ризохалина путем кислотного гидролиза, гидрирования или восстановительного аминирования и любезно предоставлен д.х.н. Макарьевой Т.Н. и к.х.н. Табакмахер К.М.; в свою очередь, ризохалин был выделен из морской губки *Rhizochalina incrustata* д.х.н. Макарьевой Т.Н. Монанхоцидин А, монанхоцидин В, монанхомикалин С, птиломикалин А, пульхранин А, урупоцидин А, монанхомикалин В и нормонанхоцидин D были выделены из морской губки *Monanchora pulchra* и любезно предоставлены д.х.н. Макарьевой Т.Н., к.х.н. Гузий А.Г. и к.х.н. Табакмахер К.М.

4.1.4.2. Сбор биологического материала и выделение микаламида А

Асцидию *Polysincraton* sp. собирали драгированием во время 36 научного рейса НИС «Академик Опарин» на глубине 166–200 м (август 2008 г., 46°18'30"N, 150°15'30"E)

в бухте Натальи острова Уруп (Курильские острова), Охотское море, Российская Федерация. Видовое определение проводил н.с. ТИБОХ ДВО РАН Гребнев Б.Б. Образцы хранятся в коллекции морских беспозвоночных ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток).

Животный материал (асцидия *Polysincraton* sp., 1000 г, сырой вес) замораживали немедленно после сбора. Содержащиеся в образце вещества экстрагировали 2 л EtOH. Этанольные экстракты упаривали *in vacuo*, и далее сухой остаток экстрагировали с помощью CHCl_3 (2×200 мл). Хлороформенные экстракты упаривали *in vacuo* и сухой остаток (5 г) разделяли на колонке с силилагелем (150×40 мм). Фракции последовательно элюировали с колонки с помощью 2000 мл EtOAc/н-гексан (1:1) и 500 мл $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:4). Фракцию веществ, элюированную $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, упаривали *in vacuo*, и сухой остаток (260 мг) разделяли методом простой колоночной хроматографии на колонке с сорбентом YMC*GEL ODS-A (90×25 мм) с использованием смеси EtOH/H₂O (7:3) в качестве элюента. Фракции, содержащие микаламид А (контроль содержания целевого вещества проводили с использованием метода ТСХ) собирали, упаривали *in vacuo*, и сухой остаток разделяли методом ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) на полупрепаративной колонке Diasfer-110-C18 с помощью смеси EtOH/H₂O (1:1) в качестве элюента. Фракцию, содержащую микаламид А, определяли как основной пик на хроматограмме (5.2 мг, 0.00052% от сырого веса животного). Структуру полученного известного соединения, микаламида А, устанавливали путём сравнения полученных спектральных данных с данными, опубликованными в литературе [6, 7].

4.2. Стандартные методики для определения биологической активности веществ

4.2.1. Растворы веществ, используемые в экспериментах по исследованию биологической активности

Для проведения биологических экспериментов микаламид А растворяли в 50% EtOH/H₂O. Все остальные исследуемые вещества растворяли в 100% ДМСО. Вещества хранили при -20°C без доступа света. Во время экспериментов раствор исследуемого вещества добавляли в клеточную среду, так, чтобы объём растворителя был $\leq 0.5\%$ от объёма среды. Во все образцы (лунки планшета, чашки Петри, культуральные бутылочки и др.) добавляли определённый объём используемого растворителя, так, чтобы концентрация растворителя во всех образцах была одинакова.

4.2.2. Определение цитотоксической активности веществ методом MTS или MTT

Для определения цитотоксической активности веществ использовали стандартные МТТ- или МТS- методы [335]. Методы основаны на способности живых клеток перерабатывать МТТ-реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) или МТS-реагент (5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4,5-диметилтиазолил)-3-(4-сульфофенил) тетразолий, внутренняя соль; желтая окраска, $\lambda_{\max} = 382$ нм) в формазан (красная окраска, $\lambda_{\max} = 492$ нм). Количество образующегося формазана, которое затем определяется спектрофотометрически, находится в прямой зависимости от количества живых клеток.

Клетки высевали в 96-луночный планшет (6×10^3 – 20×10^3 клеток/лунку) и инкубировали в течение ночи в соответствующей клеточной среде в объеме 100 мкл/лунку для прикрепленных или 50 мкл/лунку для неприкрепленных клеток. Далее клеточную среду заменяли на свежую (100 мкл), содержащую различные концентрации исследуемых веществ, для прикрепленных клеток; либо 50 мкл свежей клеточной среды, содержащей соответствующие концентрации исследуемых веществ, добавляли в каждую из лунок до конечного объема 100 мкл/лунку (для неприкрепленных клеток), после чего клетки инкубировали в течение 22 часов. Затем 20 мкл раствора МТS-реагента или 10 мкл МТТ-реагента добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 ч. Степень трансформации МТS-реагента в формазан измеряли спектрофотометрически при $\lambda = 492$ нм и $\lambda = 690$ нм (фон) с помощью спектрофотометра μ Quant. В случае использования МТТ-реагента после 2 ч инкубации клеточную среду удаляли, планшеты сушили в течение ночи при комнатной температуре, затем образовавшиеся кристаллы растворяли в 50 мкл/лунку ДМСО, и интенсивность окраски измеряли спектрофотометрически при $\lambda = 570$ нм и $\lambda = 630$ нм (фон) с помощью спектрофотометра Infinite® F200PRO reader. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили измерения шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов. После вычитания фонового поглощения для вычисления количества живых клеток, оставшихся в экспериментальных лунках, использовали выраженное в процентах отношение интенсивности поглощения лунок без клеток в экспериментальных лунках к аналогичным показателям в контрольных лунках, где клетки не обрабатывали исследуемыми веществами. Результат представлен как концентрация вещества, способная ингибировать количество жизнеспособных клеток на 50% по сравнению с контролем (inhibition concentration, IC_{50}).

4.2.3. Определение способности веществ влиять на пролиферацию клеток (метод с использованием красителя трипанового синего)

Определение способности веществ ингибировать клеточный рост проводили с использованием красителя трипанового синего, а также прибора для подсчёта клеток Beckman Coulter Vi-CELL (Германия). Для этого клетки высевали в 6-луночный планшет (2×10^5 клеток/лунку) и инкубировали в течение ночи. Затем клеточную среду заменяли свежей порцией, содержащей определённые концентрации исследуемых веществ в объёме 2 мл/лунку, и клетки инкубировали в течение указанного времени. Затем клеточную среду отделяли, клетки промывали 0.5 мл PBS и трипсинизировали 0.5 мл раствора трипсин-ЭДТА. Для каждой лунки объединяли клеточную среду, фракцию PBS после промывки и фракцию клеток после трипсинизации. Количество живых (трипановый синий-отрицательных) и мёртвых (трипановый синий-положительных) клеток в объединённых фракциях для каждой из лунок определяли с помощью счетчика клеток Beckman Coulter Vi-CELL путём подсчёта количества окрашенных и неокрашенных трипановым синим клеток. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов. Для вычисления результатов эксперимента использовали выраженное в процентах отношение количества клеток (только живых или вместе взятых живых и мёртвых) в экспериментальных лунках к аналогичным показателям в контрольных лунках, где клетки не обрабатывали исследуемыми веществами.

Для определения жизнеспособности неприкрепленных клеток лимфомы Бёркитта клетки высевали в 12-луночный планшет (5×10^4 клеток на лунку в 3 мл среды) и сразу же обрабатывали исследуемыми веществами. Для измерения жизнеспособности клетки ресуспендировали, через промежутки, равные 48, 72 и 96 ч, из каждой лунки отбирали аликвоту 0.5 мл и анализировали ее с помощью счетчика клеток Beckman Coulter Vi-CELL с использованием окрашивания клеток красителем трипановым синим.

4.2.4. Определение канцеропреентивной активности веществ

Эксперименты по изучению канцеропреентивного эффекта исследуемых веществ проводили в шестилуночных планшетах с использованием неприкрепленных JB6 P⁺ Cl41 клеток в слое мягкого агара [123, 125]. Метод основан на способности мышинных эпителиальных JB6 P⁺ Cl41 клеток претерпевать злокачественную трансформацию под действием эпидермального фактора роста (EGF) в качестве промотора и образовывать

колонии в мягком агаре. Клетки, не обработанные EGF, колоний в мягком агаре не образуют.

Клетки (8×10^3 клеток/мл) обрабатывали указанными концентрациями исследуемых веществ в 1 мл 0.33% раствора агара в среде 10% FBS/BME, содержащей 10 нг/мл EGF. Эту клеточную суспензию помещали в лунку 6-луночного планшета поверх 3 мл 0.5% раствора агара в среде BME, также содержащего 10 нг/мл EGF и такие же исследуемые вещества в тех же концентрациях, как и верхний слой наносимого агара. В качестве положительного контроля использовали JB6 P⁺ Cl41 клетки, обработанные 10 нг/мл EGF описанным выше способом, в качестве отрицательного – необработанные. Для исследования действия каждой концентрации вещества отводили три лунки шестилуночного планшета. Планшеты с клетками инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение семи дней. Затем колонии клеток считали с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX31. Каждый эксперимент повторяли 2 раза. Результат представлен как INCC₅₀ – концентрация вещества, способная уменьшать количество образующихся колоний на 50% по сравнению с контролем. Для вычисления результатов эксперимента использовали выраженное в процентах отношение количества колоний клеток в экспериментальных лунках к количеству колоний в контрольных лунках, где клетки не обрабатывали исследуемыми веществами.

4.2.5. Определение способности веществ ингибировать колониобразование опухолевых клеток в мягком агаре

Эксперименты по изучению способности исследуемых веществ ингибировать колониобразование опухолевых клеток в мягком агаре проводили в шестилуночных планшетах с использованием неприкрепленных опухолевых клеток в слое мягкого агара по той же методике, которая была описана выше (см. 4.2.4.), но без добавления EGF.

4.2.6. Определение способности веществ ингибировать формирование и рост колоний опухолевых клеток на твёрдой подложке

Клетки высевали в чашки Петри (диаметр 10 см; 1×10^6 клеток/чашку) и инкубировали в течение ночи. Затем клеточную среду заменяли свежей порцией, содержащей определённые концентрации исследуемых веществ в объёме 10 мл/чашку, и клетки инкубировали в течение 48 ч. Далее клетки открепляли с помощью трипсина и определяли их жизнеспособность с путём подсчёта при помощи камера Горяева с

предварительным окрашиванием нежизнеспособных клеток трипановым синим. Затем 100 живых клеток помещали в каждую из лунок 6-луночного планшета в 2 мл свежей клеточной среды и инкубировали в течение 14 дней. Далее выросшие колонии фиксировали с помощью 100% MeOH в течение 25 мин при RT, промывали с помощью PBS, высушивали на воздухе и окрашивали по методу Романовского-Гимзе (25 мин при RT). Лунки промывали dH₂O, сушили при RT в течение 30 мин, и далее количество колоний было подсчитано вручную невооружённым глазом. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили подсчет колоний в шести экспериментальных образцах из двух независимых экспериментов.

4.2.7. Люциферазный метод определения AP-1-, NFκB- и p53-зависимой транскрипционной активности

Для определения эффекта исследуемых веществ на AP-1-, NFκB- и p53-зависимую транскрипционную активность использовали генетически измененные линии JB6 Cl41 клеток: JB6-Luc AP-1, JB6-Luc NFκB и JB6-Luc p53 (PG-13), со стабильной экспрессией люциферазного репортерного гена, контролируемой соответственно AP-1, NFκB или p53 промоторной ДНК последовательностью. Клетки (6×10^3), суспендированные в 100 мкл 10% FBS/MEM, добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшеты с клетками инкубировали в течение ночи, а затем клеточную среду в каждой лунке заменяли свежей порцией (100 мкл/лунку), содержащей различные концентрации исследуемых веществ. Планшеты инкубировали в течение определённого времени, после чего клеточную среду удаляли, а клетки лизировали в течение 1 часа при комнатной температуре путём добавления в каждую лунку 100 мкл лизирующего буферного раствора (0.1 М калий-фосфатный буфер (90.8 мМ K₂HPO₄, 9.2 мМ KH₂PO₄, pH 7.8), 1% Тритон X-100, 1 мМ ДТТ, 2 мМ ЭДТА). Затем 30 мкл лизата из каждой лунки переносили в планшет для люминесцентного анализа, и измеряли люциферазную активность измеряли после добавления в каждую лунку 100 мкл люциферазного буферного раствора (1 мМ D-люциферин (pH = 6.1–6.5), 40 мМ Tris-Base, 2.14 мМ (MgCO₃)₄×Mg(OH)₂ 5H₂O, 5.34 мМ MgSO₄×7H₂O, 66.6 мМ ДТТ, 1.06 мМ АТФ, 0.54 мМ кофенмент А, 0.2 мМ ЭДТА (pH = 7.8)) с помощью люминесцентного ридера Luminoscan Ascent Type 392 (Labsystems, Финляндия). Для вычисления транскрипционной активности использовали выраженное в процентах отношение интенсивности люминесцентного свечения в экспериментальных лунках планшета к интенсивности свечения в контрольных лунках, где клетки не

обрабатывали исследуемыми веществами. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

4.2.8. Приготовление белковых экстрактов для 1D- и 2D-Вестерн-блоттинга, а также 2D-PAGE

Для приготовления экстрактов белков для двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (2D-PAGE), двумерного (2D-Вестерн-блоттинг) и одномерного Вестерн-блоттинга прикрепленные клетки высевали в культуральные бутылки (2×10^6 клеток/бутылку) или чашки Петри (диаметр 10 см; 1×10^6 клеток/чашку) и инкубировали в течение ночи. Затем клеточную среду заменяли свежей порцией, содержащей определенные концентрации исследуемых веществ в объеме 30 мл/бутылку или 10 мл/чашку, и клетки инкубировали в течение указанного времени. Для неприкрепленных клеток обработка веществом проводилось непосредственно после посева клеток.

Клетки собирали с помощью скребка (для прикрепленных клеток) или посредством ресуспендирования (для неприкрепленных клеток), центрифугировали в течение 5 мин при 453 g, промывали 3 раза охлажденным PBS и центрифугировали в тех же условиях. Для 2D-PAGE и 2D-Вестерн-блоттинга клетки лизировали добавлением 450 мкл 2D-PAGE-лизирующего буферного раствора (9 М мочевины, 4% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) 2,3-дигидроксипропан, 1% (w/v) ДТТ, 0.01% (w/v) бромфеноловый синий) с последующим инкубированием в течение 20 минут при комнатной температуре. Для Вестерн-блоттинга клетки лизировали добавлением 100 мкл лизисного буферного раствора (0.88% (w/v) NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 1% (v/v) NP-40, 0.25% (w/v) холат натрия, 1 mM фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 1 mM Na_3VO_4 , 1 таблетка/10 мл Complete-Proteaseinhibitoren (леупептин/апротенин, Roche, Германия)) в течение 20 мин на льду. Лизаты инкубировали при -20°C в течение ночи, а затем центрифугировали 10 мин при 11170 g. Супернатант хранили в пробирках на 1.5 мл при -80°C . Концентрацию белка в супернатантах определили по методу Бредфорд.

4.2.9. Определение концентрации белка (метод Бредфорд)

Концентрацию белков в экстрактах клеток определяли по методу Бредфорд [336]. Метод основан на способности кислого раствора кумасси бриллиантового синего G-250

образовывать с белками окрашенный комплекс, при этом интенсивность развивающейся окраски раствора находится в прямой зависимости от концентрации белка.

Растворы BSA с различной известной концентрацией белка в пределах 0–10 мкг/мл использовали как стандарты для калибровки прибора, лизирующий буферный раствор для Вестерн-блоттинга использовали в качестве бланка. В кювету для измерения оптической плотности раствора добавляли 3 мкл раствора стандарта, бланка или исследуемого образца, затем добавляли 27 мкл 0.01 М раствора HCl и 870 мкл раствора реактива Бредфорда (Bradford-solution, Protein Assay Reagent, Bio-Rad, Германия; перед использованием раствор пропускали через фильтр 0.22 мкм и разбавляли dH₂O 1:4). Растворы инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в темноте, после чего их оптическую плотность измеряли с помощью фотометра Beckman DU 530 (США) при $\lambda = 595$ нм.

4.2.10. Вестерн-блоттинг

Для разделения белков по молекулярным массам использовали электрофорез в SDS-полиакриламидном геле, проводимый при помощи системы Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США). Белковые экстракты разбавляли с помощью буферного раствора для Вестерн-блоттинга, а затем смешивали с загрузочным буферным раствором (20% (v/v) глицерин, 1% (w/v) ДТТ, 20% (w/v) SDS, 20% (v/v) 1 М Tris/HCl pH 6.7, 0.01% (w/v) бромфеноловый синий) в соотношении 3:1. Конечная концентрация белка составляла 1–1.5 мкг/мл. Образцы нагревали до 99°C в течение 5 мин и помещали на лёд. Для приготовления SDS-содержащих полиакриламидных гелей, с концентрацией акриламида 10–15% и толщиной 1.5 мм, разделяющий гель (10–15% (w/v) акриламид, 25% (v/v) 1.5 М Tris/HCl (pH 8.8), 0.1 % (w/v) SDS, 0.05% (w/v) персульфат аммония (APS), 0.1% (v/v) TEMED) заливали первым в пространство между стёкол и сверху покрывали слоем 100% метанола. После полимеризации геля (~20 мин) метанол удаляли, верхнюю поверхность геля промывали дистиллированной водой и заливали концентрирующий гель (4% (w/v) акриламид, 25% (v/v) 0.5 М Tris/HCl (pH 6.8), 0.1 % (w/v) SDS, 0.05% (w/v) персульфат аммония (APS), 0.1% (v/v) TEMED). Сверху в гель вставляли гребень для создания предназначенных для загрузки белка ячеек. После того как концентрирующий гель полимеризовался, гребень удаляли, а гель помещали в камеру для электрофореза Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, США). Для отдельных экспериментов использовали готовые полиакриламидные градиентные гели, купленные у фирмы Bio-Rad. Камеру наполняли буферным раствором для разделения белков в полиакриламидном геле (0.96 М глицин,

0.12 M Tris-Base, 17.3 mM SDS). Маркер (Spectra multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas, Финляндия; 10 мкл/ячейку), а также исследуемые образцы белковых экстрактов (20 мкл/ячейку) загружали в созданные в концентрирующем геле ячейки. Затем камеру для электрофореза подключали к блоку питания. Электрофорез проводили при комнатной температуре, первые 30 мин при 80 V, и далее при 120 V до необходимой степени разделения белков, контролируемой по маркеру.

Разделённые с помощью SDS-PAGE белки переносили с геля на PVDF-мембрану (0.2 мкм, Millipore, США) для последующего детектирования при помощи специфических антител. Перенос белков осуществляли полусухим методом с использованием ячейки для переноса Trans-Blot SD SemiDry Transfer Cell (Bio-Rad, США). Мембрану подготавливали к переносу белков последовательным вымачиванием в 100% метаноле (15 сек), dH₂O (2 мин) и охлаждённом буферном растворе для переноса (5 мин; 0.6% (w/v) Tris-Base, 0.3% (w/v) глицин, 0.04% (w/v) SDS, 20% (v/v) MeOH). Гель и бумажные прокладки также инкубировали в охлаждённом буферном растворе для переноса (15 мин). Затем элементы собирали вместе в следующем порядке (от анода к катоду): бумажная прокладка для переноса, PVDF-мембрана, полиакриламидный гель, бумажная прокладка для переноса. Далее ячейку для переноса закрывали и подключали к блоку питания. Перенос проводили в течение 1 ч при 20 V.

Далее мембрану блокировали 10 мл раствора 5% (w/v) обезжиренного сухого молока в буферном растворе TBST (0.05% (v/v) Tween-20, 50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 7.6), в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану промывали TBST (10 мл, 3×5 мин) и помещали в 10 мл раствора первичных антител в блокирующем буферном растворе, представляющем собой раствор обезжиренного сухого молока или BSA в TBST, в зависимости от рекомендаций компании-производителя антител. Мембрану инкубировали в растворе первичных антител в течение ночи при +4°C на шейкере. Затем мембрану промывали TBST (10 мл, 3×5 мин), помещали в 10 мл раствора соответствующих вторичных антител, разведённых в рекомендованной компанией-производителем концентрации в TBST, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембрану промывали раствором TBST (10 мл, 3×5 мин). Комплекс белок–антитело обнаруживали на мембране с помощью хемилюминесценции после обработки мембраны системой Pierce® ECL-Detektions-Kit (Thermo Scientific, США). Принцип работы системы основан на способности связанной со вторичными антителами пероксидазы хрена катализировать разложение субстрата люминола, что приводит к хемилюминесценции. Определение проводили в соответствии с рекомендациями компании-производителя. Вкратце: мембрану инкубировали со смесью реагентов А и В

(соотношение 1 : 1, 2 мл на мембрану) в течение 1 мин. После чего мембрану помещали между двух пластиковых плёнок и далее в ячейку Fusion SL со встроенной цифровой камерой (Reqlab, Германия) для регистрации хемилюминесценции путём получения цифровой фотографии мембраны.

4.2.11. Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле (2D-PAGE)

Аликвоты белковых экстрактов, содержащие по 1 мг белка, разбавляли с помощью 2D-PAGE-лизисного буферного раствора до объёма 450 мкл, затем загружали на иммобилизованные pH-градиентные (IPG) полоски Immobiline Dry Strip (pH 4–7, 24 см, GE Healthcare Bio-sciences, Швеция). IPG полоски инкубировали в течение ночи при комнатной температуре для регидратации (впитывания раствора белка в гель). Далее IPG полоски подвергали изоэлектрическому фокусированию (IEF) на ячейке Protean IEF (Bio-Rad, Германия). Разделение белков в первом измерении (изоэлектрическая фокусировка) проводили последовательно в 4 стадии: 1) 4 ч при 250 В; 2) 15 кВ/ч при 10 кВ («линейная фокусировка»); 3) 99 кВ/ч при 10 кВ («быстрая фокусировка»); 4) 12 ч при 500 В. После стадии IEF IPG полоски хранили при -80°C.

Для подготовки IPG полосок к условиям двумерного электрофореза их последовательно обрабатывали растворами 1% (w/v) ДТТ в мочевином буферном растворе (6 М мочевины, 4% (w/v) SDS, 50 мМ Tris/HCl (pH 8.8)) в течение 15 мин при комнатной температуре и далее раствором 4.8% йодацетамида в мочевином буферном растворе (4.8% (w/v) йодацетамид, 4% (w/v) SDS, 50 мМ Tris/HCl (pH 8.8)) в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем каждую из IPG полосок загружали на приготовленные с помощью камеры PROTEAN Plus Multi-Casting Chamber (BIO-RAD, Германия) SDS-полиакриламидные гели (15% (w/v) акриламид, 0.375 М Tris/HCl (pH 8.8), 4% (v/v) глицерин, 0.1% (w/v) APS, 0.05% (v/v) TEMED; параметры геля 27 см×21 см×0.15 см). Маркер (Roti[®]-Mark Standard, Roth, Германия) в количестве 8 мкл наносили на фильтровальную бумагу 0.5 см², которую затем помещали на гель рядом с IPG полоской и заливали горячим 0.6% (w/v) раствором агарозы в dH₂O, содержащей 0.001% (w/v) бромфенолового синего в качестве красителя. Разделение белков во втором измерении проводили методом электрофореза с использованием камеры Protean Plus (Bio-Rad, Германия), а также буферного раствора для разделения белков в полиакриламидном геле (0.96 М глицин, 0.12 М Tris-Base, 17.3 мМ SDS) при 120 В в течение ~14 ч при температуре 20°C до момента выхода синей окраски бромфенолового синего. После этого гели извлекали и окрашивали коллоидным раствором кумасси бриллиантового синего G-

250 (0.13 % (w/v) кумасси бриллиантовый синий G-250, 3.6% (v/v) H₂SO₄, 1.44 М NaOH, 20.3% (w/v) CCl₃COOH; 400 мл/гель) в течение ночи. Затем гели отмывали с помощью dH₂O в течение 48 ч, заменяя воду через каждые 2 ч в течение первых 12 ч, а затем через каждые 12 ч. При этом краситель вымывался из геля, но не из окрашенных белковых пятен. Эксперименты повторяли три раза.

4.2.12. Анализ рисунков 2D-гелей

Изображения полученных 2D-гелей переводили в электронный формат с использованием сканера GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, США). Далее их анализировали с помощью компьютерной программы Delta 2D 4.0 (Decodon, Германия). Количественный анализ выполняли с использованием показателя отношения оптической плотности соответствующих белковых пятен экстрактов клеток, обработанных исследуемым веществом, к контрольным клеткам. Существенным считали изменение интенсивности окраски в 2 и более раза (значение доверительной вероятности $p \leq 0.05$, t-тест Стьюдента).

4.2.13. Идентификация белков методом масс-спектрометрии

Исследуемые белковые пятна вручную вырезали из гелей и переносили в 96-луночный планшет. Дальнейшую подготовку образцов, снятие масс-спектров и идентификацию белков проводила доктор Симона Фенц (Отдел медицинской биохимии и молекулярной биологии Университета Грайфсвальда, Грайфсвальд, Германия). Вкратце: расщепление трипсином с последующим переносом аликвот растворов белков на MALDI-мишени выполнено автоматически на приборе Ettan Spot Handling Workstation (Amersham-Biosciences, Швеция), с использованием незначительно модифицированного стандартного протокола. Расщепление белков трипсином выполняли, как описано ранее [337]. MALDI-MS измерение белковых образцов проводили на приборе 4800 MALDI-ToF/ToFTM Analyzer (Applied Biosystems, США). Спектры записывали в рефлексном режиме в области масс от 0.8 до 4 кДа с фокусировкой масс на 2 кДа. Дополнительно для пяти наиболее интенсивных пиков MS спектров выполняли MALDI-MS/MS анализ после вычитания пиков, соответствующих фону или трипсиновым фрагментам. Сравнение полученных MS и MS/MS данных с представленной в базах данных информацией осуществляли с помощью программы GPS Explorer, Ver. 3.6 (Applied Biosystems, США). Для идентификации белков использовали базу данных SwissProt v56.1.

4.2.14. Двумерный Вестерн-блоттинг (2D-Вестерн-блоттинг)

Двумерный Вестерн-блоттинг (2D-Вестерн-блоттинг) использовали с целью подтверждения результатов 2D-PAGE. Аликвоты белковых экстрактов, содержащие по 30 мкг белка, разбавляли с помощью 2D-PAGE-лизисного буферного раствора до объема 125 мкл, а затем загружали на иммобилизованные pH-градиентные (IPG) полоски Immobiline Dry Strip (pH 4–7, 7 см, GE Healthcare Bio-sciences, Швеция). IPG полоски инкубировали в течение ночи при комнатной температуре для регидратации (впитывания раствора белка в гель). Далее IPG полоски подвергали изоэлектрическому фокусированию (IEF) с использованием ячейки Protean IEF (Bio-Rad, Германия). Разделение белков в первом измерении (изоэлектрическая фокусировка) проводили последовательно в 4 стадии: 1) 30 мин при 500 В; 2) 5 кВ/ч при 5 кВ («линейная фокусировка»); 3) 5 кВ/ч при 5 кВ («быстрая фокусировка»); 4) 2 ч при 500 В. После стадии IEF, IPG полоски хранили при -80°C.

Далее IPG полоски обрабатывали последовательно растворами 1% (w/v) ДТТ и 4.8% йодацетамида в мочевином буферном растворе, как описано для 2D-PAGE экспериментов (см. 4.2.11.) и загружали на SDS-полиакриламидные гели, содержащие 15% акриламида и приготовленные, как описано для Вестерн-блоттинга (см. 4.2.10.), но без концентрирующего геля. Маркер (Spectra multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas, Финляндия) в количестве 8 мкл наносили на фильтровальную бумагу 0.5 см², помещали на гель рядом с IPG полоской и заливали 0.6% раствором агарозы в dH₂O, содержащей 0.001% (w/v) бромфенолового синего в качестве красителя. Разделение белков проводили в камере для электрофореза Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, США) в буферном растворе для разделения белков в полиакриламидном геле (см. 4.2.10.). Электрофорез проводили ~3 ч при 65 V при комнатной температуре до необходимой степени разделения белков, контролируемой по маркеру. Последующий перенос белков на мембрану, блокирование мембраны, инкубирование с первичными и вторичными антителами, а также детектирование сигнала выполняли так же, как описано для Вестерн-блоттинга (см. 4.2.10.).

Полиакриламидные гели после стадии переноса окрашивали коллоидным раствором кумасси бриллиантового синего G-250 (20 мл/гель) с последующей отмывкой dH₂O, как описано для 2D-PAGE (см. 4.2.11.). После отмывки гели сканировали с помощью сканера GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, США). Цифровые картинки

гелей использовали в качестве контроля загрузки одинакового количества белка для метода 2D-Вестерн-блоттинга.

Относительную оптическую плотность сигналов белковых пятен количественно анализировали с помощью программы Bio 1D 15.01 (Vilber Lourmat, Франция). Все эксперименты проводили трижды.

4.2.15. Анализ экспрессии простатического специфического антигена (PSA)

Клетки рака простаты человека высевали в 6-луночный планшет (0.4×10^6 клеток/лунка) и инкубировали в течение ночи. Затем среду заменяли на свежую (2 мл/лунку), содержащую исследуемое вещество в определённых концентрациях. После 48 ч инкубации из каждой лунки отбирали аликвоты объёмом 100 мкл, центрифугировали (1500 rpm, 5 мин) и измеряли экспрессию внеклеточного PSA в супернатанте с помощью метода ИФА и набора ProStatusTM PSA Free-/Total DELFIA[®] Kit (PerkinElmer, Финляндия). Жизнеспособность клеток в соответствующих лунках каждого из образцов определяли с помощью автоматического счётчика клеток Beckman Coulter Vi-CELL непосредственно после отбора аликвот для ИФА. Концентрацию PSA нормализовали к количеству жизнеспособных клеток в соответствующей лунке. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

4.2.16. Исследование синергического, аддитивного или антагонистического эффекта веществ при их комбинировании

Исследование синергического, аддитивного или антагонистического эффекта на цитотоксические/антипролиферативные свойства веществ при их комбинации проводили с помощью метода Чоу-Талалая [178]. Данные о жизнеспособности/количестве живых клеток после обработки веществами получали при помощи MTT / MTS метода исследования цитотоксической активности или метода автоматического подсчёта клеток с использованием трипанового синего для индивидуальных веществ, а также их комбинаций в постоянном или непостоянном молярном соотношении. Индекс комбинирования (CI) рассчитывали с помощью компьютерной программы ComboSyn v.1.0. (ComboSyn, Inc., США). Синергизм определяли как состояние, в котором $CI < 0.85$; антагонизм – как состояние, в котором $CI > 1.2$; аддитивный эффект – как состояние, в

котором $CI = 0.85 \sim 1.2$. Все эксперименты проводили в трипликате и повторяли, по крайней мере, три раза.

4.2.17. Исследование антагонистического эффекта SP600125 (ингибитора JNK1/2)

Для исследования антагонистического эффекта SP600125 на цитотоксическую активность алкалоидов морской губки *Monanchora pulchra* клетки обрабатывали индивидуальными веществами или их комбинацией при непостоянном молярном соотношении. Данные зависимости эффекта от концентрации получали по методу Чоу-Талалая (см. 2.12.) и обрабатывали с помощью программы CompuSyn v.1.0. (ComboSyn, Inc., США). Клетки предварительно обрабатывали SP600125 в концентрации 20 мкМ и 40 мкМ в течение 1 ч в объеме среды 50 мкл/лунку. Затем добавляли свежую среду в объеме 50 мкл/лунку до конечного объема 100 мкл/лунку. Эффект индивидуальных веществ и их комбинаций измеряли с помощью метода МТТ после 48 ч инкубации. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили измерения для шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

4.2.18. Окрашивание одномерных SDS-полиакриламидных гелей красителем кумасси бриллиантовым синим G 250

Белки разделяли методом электрофореза в одномерном SDS-полиакриламидном геле, как описано ранее (см. 4.2.10.). Для загрузки белков использовали буферный раствор для приготовления образцов, не содержащий красителя. Гель разрезали на 2 части. Первая содержала белки молекулярной массой более 15 кДа, а вторая – белки молекулярной массой менее 15 кДа. Белки, содержащиеся в первой части геля, переносили на PVDF-мембрану и детектировали при помощи антител. Белки, содержащиеся во второй части, после инкубирования в буферном растворе для трансфера в течение 5 мин, подвергали окрашиванию красителем кумасси бриллиантовым синим G 250 (см. 4.2.11.) без предварительного переноса белков.

4.2.19. Исследование белков, содержащихся в образцах 1 и 2, методом масс-спектрометрии (см. 3.3.1.3.)

Белковые пятна номер 1 и 2 извлекали из геля вручную и подвергали трипсинолизу. Масс-спектрометрию и идентификацию проводили, как описано выше (см. 4.2.13.) [338]. Раствор пептидов анализировали с использованием системы Proxeon nano-LC с приставкой nano-ESI (Proxeon, Дания), соединённой с LTQ-Orbitrap-MS (ThermoElectron, Германия). Для идентификации белков использовали алгоритм Sequest rel. 27.11 (Sorcerer built 4.05, Sage-N Research Inc., США) с использованием поиска по базе Swiss-Prot rel. 2013_10 (поиск ограничивали белками, экспрессируемыми в *Homo sapiens*). Ферментативную специфичность считали полностью триптической. Допустимая ошибка для полной молекулы была 10 ppm, для фрагмента – 1 Да.

4.2.20. Определение активированной каспазы-3 с помощью FACS

Опухолевые NCCIT-R клетки, содержащие активированную каспазу-3, определяли методом FACS с использованием специфических PE-связанных антител. Клетки NCCIT-R высевали в 6-луночные планшеты (2×10^5 клеток/лунку в 2 мл/лунку) и инкубировали в течение ночи. Затем среду заменяли на свежую, содержащую исследуемые вещества в определённой концентрации. После 48 ч обработки клетки собирали с помощью раствора трипсина-ЭДТА, дважды промывали холодным PBS и фиксировали 2% (w/v) параформальдегидом (PFA) (pH 7.4) в течение 10 мин при 37°C. Далее клетки инкубировали на льду в течение 1 мин, центрифугировали в течение 5 мин при $453 \times g$, ресуспендировали в 1 мл 90% (v/v) MeOH и инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Далее добавляли 0.5 мл 0.5% (v/v) BSA/PBS, осаждали клетки центрифугированием (10 мин при $453 \times g$), ресуспендировали в 50 мкМ 0.5% BSA/PBS и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее к образцам добавляли 1 мкл раствора PE-связанных антител, специфичных к активированной каспазе-3; 1 мкл PE-связанного изотипического контроля; или 1 мкл PBS. Образцы инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре в темноте. После этого клетки ресуспендировали в 0.5 мл 0.5% BSA/PBS, центрифугировали (10 мин при $453 \times g$), ресуспендировали в 0.3 мл PBS, и количество клеток, содержащих активированную каспазу-3, измеряли с помощью проточного цитометра FACS Calibur (BD Bioscience, США). Результаты анализа обсчитывали с помощью компьютерной программы BD Bioscience Cell Quest Pro software

(BD Bioscience, США). Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

Применяемый для фиксации раствор параформальдегида готовили следующим образом: 40 г PFA растворили в 700 мл H₂O, затем при перемешивании добавили 25 мл 1 М NaOH и инкубировали при комнатной температуре 2 ч без перемешивания. Затем последовательно добавили 25 мл 1 М HCl при перемешивании и 9.55 г PBS Dulbecco (без Ca²⁺/Mg²⁺), далее pH довели до 7.4 добавлением NaOH или HCl. Объем раствора довели до 1 л.

4.2.21. Окрашивание лизосом красителем акридиновым оранжевым

Опухолевые NCCIT-R клетки инкубировали в 8-луночной камере со стеклянной подложкой (5×10⁴ клеток/лунку в 0.5 мл среды) в течение ночи. Далее среду заменяли на свежую, содержащую различные концентрации исследуемых веществ, после чего клетки инкубировали в течение 60 мин при 37 °С. Затем клетки промывали PBS, добавляли раствор акридинового оранжевого в PBS (0.5 мкг/мл), выдерживали в течение 15 мин при 37°С, покрывали реагентом ProLong® Gold (Life Technologies, США), содержащим в своём составе DAPI, и далее немедленно анализировали флуоресценцию с помощью микроскопа AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision40 V4.8 (Carl Zeiss Imaging Solutions, Германия). Интенсивность флуоресценции по красному каналу была измерена с помощью программы ImageJ (NIH, США). Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

4.2.22. Измерение выхода катепсина В в межклеточное пространство

Клетки NCCIT-R инкубировали в 6-луночном планшете (2×10⁵ клеток/лунку) в течение ночи, затем клеточную среду заменяли на свежую, содержащую исследуемое вещество. После инкубации в течение 48 ч клетки иммобилизовали на стеклянной подложке с использованием цитоспин-метода и сушили в течение ночи при RT. Далее клетки фиксировали при помощи 2% (w/v) PFA/PBS, промывали PBS и пермеабilizировали с помощью 0.1% (v/v) раствора Triton X-100 в 2% (v/v) растворе нормальной овечьей сыворотки в PBS в течение 30 минут. Далее образцы промывали PBS и инкубировали с раствором анти-катепсин В антител (разведение 1:400 в буферном растворе 0.1% (w/v) NaN₃, 0.2% (w/v) BSA в PBS, pH 7.4) в течение ночи при 4°С. Далее

образцы промывали PBS и инкубировали со вторичными anti-rabbit антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 в PBS, в течение 1 ч при RT. Образцы промывали PBS, покрывали реагентом ProLong® Gold (Life Technologies, США), содержащим в своём составе DAPI, и флуоресценцию немедленно анализировали с помощью микроскопа AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision40 V4.8 (Carl Zeiss Imaging Solutions, Германия). Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

4.2.23. Клеточное фракционирование

Клеточное фракционирование позволяет разделить различные клеточные органеллы и таким образом далее выделить и проанализировать белки каждой из фракций. Для того чтобы разделить цитозольную (C), митохондриальную (M) и ядерную (N) фракции, использовали набор Cell Fractionation Kit ab109719 (abcam, США). Клетки CA46 помещали в культуральные пластиковые бутылки (15×10^6 клеток на бутылку в 20 мл среды) и обрабатывали исследуемым веществом в течение 48 ч. Далее образцы центрифугировали в течение 5 мин при $300 \times g$ при RT, и клетки ресуспендировали в 3 мл буферного раствора A, дополнительно содержащего коктейль ингибиторов протеаз cOmplete Mini EDTA-free (1 таблетка на 10 мл, Roche, Германия). Аликвоту 0.5 мл отбирали из каждого образца и клетки отделяли от супернатанта центрифугированием (5 мин, $300 \times g$, RT). Далее клетки лизировали в 70 мкл лизисного буферного раствора (см. 4.2.7.), и таким образом получали общий клеточный белковый лизат (W).

Далее подсчитывали количество клеток в контрольном образце и отбирали аликвоту, содержащую 15×10^6 клеток, для дальнейшего анализа. Далее аликвоты точно такого же объёма (т.е. равные объёму контрольного образца, содержащего 15×10^6 клеток) отбирали из каждого из экспериментальных образцов. Клетки отделяли от супернатанта центрифугированием (5 мин, $300 \times g$, RT) и подвергали дальнейшим стадиям клеточного фракционирования согласно рекомендациям производителя, в результате чего получали цитоплазматическую (C), митохондриальную (M) и ядерную (N) фракции.

Концентрацию белков в общем клеточном белковом лизате (W) определяли с помощью метода Бредфорд (см. 4.2.9.). Для анализа цитоплазматической (C), митохондриальной (M) и ядерной (N) фракций с помощью Вестерн-блоттинга образцы загружали на гель в объёмах, обратно пропорциональных концентрациям белков в общем клеточном белковом лизате (W) соответствующего образца. Примечание: ядерная (N)

фракция была гомогенизирована с использованием набора QIAshredder kit (QUIAGEN, Германия). Цитоплазматическая (С) и митохондриальная (М) фракции были сконцентрированы с использованием микроколонок Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter device (Cat. No. UFC203024, Merck, Германия).

4.2.24. Полимеразно-цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ)

Уровень экспрессии генов анализировали с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ, qPCR). Клетки высевали в чашку Петри (2×10^6 в мл среды, диаметр чашки $\varnothing$ 6 см) и инкубировали в течение ночи. Далее клетки были либо а) обработаны исследуемыми веществами как при подготовке образцов для Вестерн-блоттинга (см. 4.2.8.), либо б) клеточная среда была заменена на среду с пониженным содержанием FBS (0.1% FBS/RPMI), и после 24 ч голодания клетки были обработаны исследуемыми веществами в течение 30 мин, а затем совместно исследуемыми веществами и 20 нМ ДНТ в течение ещё 24 ч. Далее клетки были собраны с помощью скребка и гомогенизированы с использованием набора QIAshredder (Cat. # 79654, QUIAGEN, Германия). Общая РНК была выделена с использованием набора PureLink® RNA Mini Kit (Cat. # 12183018A, Invitrogen, США). Затем объём раствора РНК был доведён до 30 мкл, и концентрация РНК была измерена с помощью спектрофотометра NanoDrop (PeqLab, Германия). РНК была транскрибирована в кДНК при помощи набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Cat. # K1642, Thermo Scientific, Vilnius, Литва). ПЦР в реальном времени была проведена с помощью смеси 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix Optimized for Roche LightCycler 480 (Cat. # KK4609, KAPA biosystems, США) согласно рекомендациям производителя. Для каждой реакции было использовано 2 пмоль каждого из праймеров и 20 нг кДНК. Для реакции использовались специфические праймеры, синтезированные компанией Eurofins MWG-Biotech AG (Германия). Последовательности нуклеотидов в праймерах, а также температуры гибридизации (отжига) приведены в разделе 4.1.2. Условия проводимых ПЦР: 30 сек 95 °С, 40 циклов по 15 сек 95 °С, 5 сек Т.Г., и 26 сек 72 °С (измерение флуоресценции). Анализ кривых плавления (10 сек 95 °С, 60 сек 65 °С и 1 сек 97 °С) был проведён непосредственно после ПЦР. Относительный уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывали с помощью $2^{-\Delta\Delta CT}$ -метода. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

4.2.25. Метод проточной цитометрии для исследования способности веществ индуцировать апоптоз

Для оценки способности исследуемых веществ индуцировать апоптоз использовали метод проточной цитофлюориметрии с двойным окрашиванием обработанных веществом клеток аннексином-V-FLUOS (Roche, Германия) и пропидиум йодидом (PI) (Sigma, Германия) [209].

Клетки высевали в 6-луночный планшет и инкубировали в течение ночи. Затем клеточную среду заменяли на свежую (2 мл/лунку) с определённым содержанием исследуемого вещества, и клетки инкубировали в течение указанного времени. Далее клеточную среду отделяли, клетки промывали 0.5 мл PBS и трипсинизировали 0.5 мл раствора трипсин-ЭДТА. Для каждой лунки объединяли клеточную среду, фракцию PBS после промывки и фракцию клеток после трипсинизации и центрифугировали при 220 g. Клетки промывали 5 мл охлаждённого PBS с последующим центрифугированием в тех же условиях. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 0.1 мл раствора 2% (v/v) аннексина-V-FLUOS и 0.1% (w/v) PI в инкубационном буфере (0.01 М HEPES/NaOH (pH 7.4), 0.14 М NaCl, 5 мМ CaCl₂) и инкубировали на льду в темноте в течение 15 мин. Затем к каждой пробе добавляли 0.4 мл инкубационного буферного раствора и анализировали клетки на проточном цитометре FACS Calibur (BD Bioscience, США). Результат анализировали с помощью программы Cell Quest Pro (BD Bioscience, США). Клетки, окрашенные аннексином-V-FLUOS, считали апоптотическими. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

4.2.26. Метод проточной цитометрии для исследования влияния веществ на клеточный цикл

Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью окрашивания ДНК пропидиум йодидом (PI). Клетки рассеивали в 6-луночный планшет, обрабатывали исследуемым веществом, собирали и промывали, как описано выше (см. 4.2.25.) [339]. Затем клетки ресуспендировали в EtOH (1 мл/образец) и инкубировали в течение ночи при -20°C. Далее добавляли PBS (0.5 мл/образец), перемешивали и центрифугировали в течение 5 мин при 453×g. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 0.2 мл раствора 0.002% (w/v) PI и 0.02% (w/v) РНКазы А (Roth, Германия) в PBS и инкубировали в течение 30 мин на льду в темноте. Затем добавляли 0.2

мл PBS и анализировали на проточном цитометре. Результат анализировали с помощью программы Cell Quest Pro. Вывод о распределении клеток по фазам клеточного цикла делали на основании различной интенсивности окраски ДНК клеток пропидиум йодидом. Апоптотическими считали клетки, находящиеся в суб-G₁ фазе клеточного цикла. Для каждой концентрации исследуемого вещества проводили анализ шести экспериментальных образцов из двух независимых экспериментов.

4.2.27. Исследование эффекта вещества на клеточную миграцию

Эксперимент проводили в непокрытых клеточных вставках – инсёртах – Greiner bio-one ThinCert™ 24. Дно этих инсёртов сделано из пористой мембраны. Опухолевые клетки способны мигрировать через эти поры (ø 8 мкм). Соответствующие клетки высевали в инсёрты (15×10^3 клеток в 100 мкл на инсёрт) в среде с пониженным (0.1%) содержанием FBS, содержащей исследуемое вещество в определённых концентрациях. Вставки помещали в лунки 24-луночного планшета, содержащие клеточную среду с точно такими же концентрациями FBS и исследуемого вещества (800 мкл/лунку). После 48 ч инкубации клетки, мигрировавшие через поры на внешнюю сторону мембраны, фиксировали метанолом и окрашивали в соответствии с Diff-quick протоколом. Немигрировавшие клетки осторожно удаляли с внутренней поверхности мембраны при помощи ватного тампона, затем инсёрты сушили в течение ночи при RT. Микрофотографии клеток получали при помощи микроскопа Axiovert 25 microscope и камеры AxioCam MR (Carl Zeiss, Германия). Количество мигрировавших клеток подсчитывали с помощью программы ImageJ (NIH, США). Полученные результаты представлены в виде количества клеток (на одно поле зрения микроскопа), являющегося усредненным от девяти значений, полученных с использованием одной и той же пористой мембраны. Данные представлены в процентах от контроля. Эксперимент проводили дважды.

4.2.28. Биоинформатический анализ протеомных данных

Построение карт белок-белковых взаимодействий производили с использованием алгоритма IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity Systems, США, www.ingenuity.com). Алгоритм основан на данных об известных белок-белковых взаимодействиях, описанных в научной литературе. Список белков, уровень экспрессии которых изменялся под действием исследуемых веществ (данные получали методом 2D-PAGE), загружали в

программу IPA с целью построения возможных путей и механизмов биологического действия вещества, а также предсказания возможных белок-белковых взаимодействий. Проводимый общий анализ показывает наиболее важные прямые и не прямые взаимодействия белков, регулируемых под действием исследуемых веществ на клетки, а также предсказанных с помощью IPA белков, возможно, также участвующих в механизмах биологического ответа клетки на воздействие веществ.

Для предсказания релевантных биологических процессов, участвующих в клеточном ответе на действие исследуемого вещества на опухолевые клетки, списки регулируемых белков анализировали с использованием алгоритмов программы IPA. Алгоритм z-оценки применяли для определения биологических функций, которые могли быть активированы (z-оценка > 0) или супрессированы (z-оценка < 0) под действием на клетки исследуемого вещества. Согласно протоколам программы IPA, только процесс, имеющий z-оценку > 2 либо < -2 , является достоверно регулируемым. Коэффициент p рассчитывали с помощью программы IPA с использованием точного теста Фишера. Полученные значения p были < 0.05 для всех представленных биологических процессов.

Для классификации регулируемых под действием исследуемых веществ белков по их молекулярным функциям, а также по участию в различных биологических процессах была использована классификационная система PANTHER Classification System v7.1 (Paul Thomas, США, <http://www.pantherdb.org/>) [340].

Кроме того, анализ и классификацию регулируемых генов проводили с использованием платформы MetaCore™ (Thomson Reuters, США, <https://portal.genego.com/>).

4.2.29. Подавление экспрессии гена p53 посредством трансфекции с использованием малых интерферирующих РНК (siRNA)

Подавление экспрессии p53 было осуществлено с помощью трансфекции клеток siRNA с использованием трансфекционного реагента Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen). Клетки RT112 высевали в 6-луночные планшеты (1×10^5 клеток на лунку в 2 мл) в среде 10%FBS/RPMI без добавления антибиотика и инкубировали в течение ночи. Далее приготовили растворы (а) и (б): (а) 20 мкл раствора siRNA + 230 мкл среды Opti-MEM; (б) 7.5 мкл реагента Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent + 242.5 мкл среды Opti-MEM. Растворы инкубировали в течение 5 мин, затем смешивали между собой и инкубировали ещё в течение 20 мин. Среду в лунках 6-луночного планшета заменяли 2 мл свежей среды 10%FBS/RPMI без добавления

антибиотика, и затем 0.5 мл раствора (а) + (б) добавляли в каждую из лунок по каплям, равномерно распределяя раствор по всей площади лунки. После 72 ч инкубирования среду удаляли из лунок, клетки промывали с помощью PBS и добавляли свежую 10%FBS/RPMI (без добавления антибиотика, 2 мл/лунку), содержащую исследуемое вещество. Далее клетки либо немедленно собирали и лизировали для последующего анализа методом Вестерн-блоттинга, либо инкубировали в течение ещё 48 ч с исследуемым веществом и далее анализировали с помощью методов проточной цитометрии.

Дуплексная siRNA была куплена у фирмы Eurofins Genomics (Germany). Последовательности используемых в экспериментах siRNA (5'→3'): p53 siRNA (NM_000546_Val): GACUCCAGUGGUAUAUCUAC(dTdT); control siRNA (Non Specific Control 47% GC): AGGUAGUGUAAUCGCCUUG(dTdT).

4.2.30. Световая микроскопия

Микрофотографии клеток получали с использованием микроскопа Axiovert 25 и цифровой камеры AxioCam MRc camera (Carl Zeiss, Германия) при увеличении×100.

4.2.31. Иммуноцитохимический метод и флуоресцентная микроскопия

Клетки преинкубировали в течение ночи в 8-луночной стеклянной камере (5×10^4 клеток/лунку в 0.5 мл среды) и далее обрабатывали исследуемым веществом в течение 48 ч. Затем клетки промывали PBS, фиксировали при помощи 2% (w/v) PFA/PBS в течение 20 мин при комнатной температуре, снова промывали PBS и пермеабелизировали с помощью 0.1% (v/v) раствора Triton X-100 в 2% (v/v) растворе нормальной овечьей сыворотки в PBS в течение 30 минут. Далее образцы промывали PBS и инкубировали с раствором соответствующих первичных антител (в буферном растворе 0.1% (w/v) NaN_3 , 0.2% (w/v) BSA в PBS, pH 7.4) в течение ночи при 4°C. Далее образцы промывали PBS и инкубировали со вторичными anti-rabbit антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 или FITC в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. В экспериментах по исследованию структуры актина клетки окрашивали фаллоидином, конъюгированным с TRITC в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы промывали PBS, покрывали реагентом ProLong® Gold (Life Technologies, США), содержащим DAPI, и немедленно анализировали с помощью микроскопа AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision40 V4.8 (Carl Zeiss Imaging Solutions, Германия).

Для неприкреплённых клеток сначала проводили их обработку исследуемым веществом, как при подготовке образцов для Вестерн-блоттинга, а затем клетки иммобилизовали на стеклянной подложке с использованием цитоспин-метода и высушивали в течение ночи при RT. Дальнейшую фиксацию, пермеабиллизацию и окрашивание антителами проводили, как описано выше для неприкреплённых клеток.

4.2.32. Электронная микроскопия

Для исследования клеток при помощи электронной микроскопии обработанные исследуемым веществом клетки собирали с помощью трипсина, промывали PBS, фиксировали с использованием глутаральдегида и иммобилизовали с помощью набора Araldite 502/Embed 812 Kit (EMS, США). Затем подготавливали полутонкие и ультратонкие секции, которые далее анализировали с помощью электронного микроскопа EM 906 (Carl Zeiss, Германия) с использованием различного увеличения. Анализ образцов и получение микрофотографий было осуществлено профессором Керстин Аманн (Университетская Клиника Эрлагена, Эрлаген, Германия).

4.2.33. Модели подкожных мышечных ксенографтов

Для экспериментов *in vivo* использовали самцов мышей *Mus musculus* NOD SCID (имеющих тяжёлый комбинированный иммунодефицит) в возрасте 8–12 недель и весом 20–25 г. Животные были куплены у Charles River Laboratories (США). Клетки рака простаты человека ксенотрансплантировали животным подкожно под левую лопатку. Трансплантацию проводили в 200 мкл смеси матригеля и среды RPMI (не содержащей ни антибиотиков ни FBS) в соотношении 1:1 (для клеток PC-3 и DU145) или 2:1 (для клеток 22Rv1) в количестве 1×10^6 (для клеток PC-3) или 2×10^6 (для клеток DU145 и 22Rv1) на одно животное. Когда опухоль достигала 50–60 мм³, животных рандомизировали, относя к одной из двух групп – контрольной или экспериментальной (10 животных на группу). Животным в экспериментальной группе вводили внутривенно раствор исследуемого вещества в 0.9% растворе NaCl. Животным, отнесённым к контрольной группе, вводили 0.9% раствор NaCl. Растворы вводили из расчёта 10 мкл на 1 г веса животного. Эксперименты проводили в виварии Университетской Клиники Гамбург-Эппендорф, где животные содержались в особых стерильных условиях. Уход за животными осуществлялся специально обученным персоналом. Данные эксперименты были одобрены

местным комитетом по защите животных, номера проектов: No. G13/45 для *in vivo* экспериментов с FrA и No. G33/15 для *in vivo* экспериментов с Rhiz.

В ходе экспериментов *in vivo* регулярно проводили мониторинг поведенческих признаков животных (приём воды и пищи, движение, взаимодействие с другими животными) а также признаков боли и недомогания (потеря веса, взъерошенный мех, состояние глаз, вялость, атаксия (нарушение согласованности движений различных мышц), затрудненное дыхание, гипотермия).

4.2.34. Оценка роста опухолей и формирования метастазов

Объём опухоли рассчитывали по формуле $V = \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{высота} \times 0.5236$ [341]. Когда объём опухоли превышал 2000 мм³ или образовывалась видимая язва, то животное подвергали временной анестезии и умерщвляли при помощи метода цервикальной дислокации. Затем целиком извлечённые легкие животного гомогенизировали при помощи тканевого дезинтегратора TissueLyser II (Qiagen, Германия), и далее ДНК выделяли при помощи набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия). Костный мозг собирали при помощи промывания левой бедренной кости животного 1 мл 0.9% раствора NaCl. Также собирали 200 мкл периферической крови каждого из животных. ДНК из образцов костного мозга и крови выделяли при помощи набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия).

Правое лёгкое каждого животного фиксировали в нейтральном буферном растворе формалина в течение 2 дней. После этого, образец нарезают на кусочки толщиной 1 мм, и полученные секции помещали в агар, а затем в парафин и далее нарезают на секции толщиной 5 мкм. Для дальнейших экспериментов брали каждую десятую секцию. Далее, 10 секций (полученных из средней части блока) окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). Число лёгочных метастазов на секцию подсчитывали с использованием светового микроскопа. Человеческие опухолевые клетки определяли морфологически по их большому, базофильному и полиморфному ядру, которые были хорошо отличимы от мышечных клеток, имеющих более мелкие ядра. Анализ осуществляли два независимых экспериментатора.

4.2.35. Оценка количества диссеминированных опухолевых клеток, а также циркулирующих опухолевых клеток при помощи *Alu*-ПЦР

Количественная оценка диссеминированных опухолевых клеток в лёгких, костном мозгу и крови животных была основана на определении наличия характерных и специфических для человеческих клеток *Alu*-последовательностей в пуле выделенной из мышинных тканей ДНК. Известно, что *Alu*-последовательности присутствуют в ДНК человека, но не мыши.

Концентрацию общей ДНК в образцах определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop (PepLab, Германия). Далее концентрацию ДНК нормализовывали посредством разбавления до концентрации 30 нг/мкл при помощи АЕ-буферного раствора (Qiagen, США). Концентрация ДНК в выделенных из крови образцах была примерно 10 нг/мкл и не требовала нормализации. ПЦР в реальном времени проводили с использованием специфических *Alu*-праймеров. 2 мкл общей ДНК (т.е. 60 нг ДНК, выделенной из лёгких или костного мозга, или 20 нг ДНК, выделенной из крови) использовали для каждой ПЦР реакции и разбавляли до общего объёма 10 мкл, которые содержали 1×SYBR Green I Master mix including Taq DNA polymerase, Taq ПЦР буферный раствор, смесь dNTP, 1 ммоль/л MgCl₂ (SABiosciences, США) и 10 пмоль специфических *Alu*-праймеров. Для ПЦР использовали прибор LightCycler 480 (Roche, Германия). Прямой *Alu*-праймер (TGG CTC ACG CCT GTA ATC CCA) и обратный *Alu*-праймер (GCC ACT ACG CCC GGC TAA TTT) были синтезированы фирмой MWG-Biotech AG (Германия). Параметры ПЦР: 10 мин 95 °C, далее 50 циклов 5 сек 95 °C, 5 сек 67 °C и 20 сек 72 °C (измерение флуоресценции). Анализ кривых плавления (1 сек 95 °C, 1 сек 65 °C и 0 сек 95 °C) осуществляли непосредственно после ПЦР. Количественную оценку диссеминированных опухолевых клеток в лёгких, костном мозге и крови животных проводили с помощью стандартных кривых, построенных с использованием ДНК, выращенных *in vitro* клеток PC-3, DU145 и 22Rv1 (кривые были построены с использованием концентраций ДНК, соответствующих количествам от 1 до 1×10⁶ клеток/мл). Кроме того, в эксперимент также был включён контроль геномной мышинной ДНК, а также другие внутренние контроли ПЦР. Порог детекции сигнала определяли с использованием выделенной из соответствующей ткани (лёгкого, костного мозга или крови) ДНК из пяти «здоровых» животных того же возраста и пола, не подвергнутых ксенотрансплантации опухолевых клеток человека и которым также не вводили исследуемое вещество. Каждую ПЦР проводили в дубликate, все эксперименты были повторены, по крайней мере, дважды.

4.2.36. Анализ крови животных

Образцы крови (100 мкл), полученные после умерщвления животных, анализировали с помощью автоматического ветеринарного анализатора крови HemaVet 950FS (Drew Scientific, Франция) в соответствии с рекомендациями производителя.

4.2.37. Статистическая обработка полученных данных

Стандартное отклонение значений от среднего ($\pm SD$), а также стандартную ошибку среднего ($\pm SEM$) рассчитывали с помощью программ Excel Microsoft Office 2003 (Microsoft, США) и GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, США). Линейные регрессии и соответствующие им уравнения, на основании которых вычисляли IC_{50} и $INCC_{50}$ получали с помощью программы Statistica 6.0 (Statsoft, США). Достоверность отличия полученных значений от контрольного (значение параметра p , определённое методом t-тест Стьюдента) оценивали с помощью программы GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, США).

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Морские беспозвоночные продолжают оставаться одним из наиболее богатых источников биологически активных соединений. Данный факт связывают с особенностями биохимии вторичного обмена таких организмов, который определяется, помимо всего прочего, специфическими условиями их среды обитания: солёностью и рН морской воды, недостатком некоторых макро- и микроэлементов, повышенным давлением, часто пониженными стабильными температурами, отсутствием или недостатком света, а также другими факторами. С другой стороны, «малоподвижный» образ жизни морских беспозвоночных предопределяет необходимость продуцировать ими защитные химические вещества, которые могут не только играть определённые экологические и физиологические роли, но и выполнять другие биологические функции. Вторичные метаболиты этих животных часто обладают биологической, в том числе, противоопухолевой активностью и могут взаимодействовать в клетке как с одной, так и несколькими молекулярными мишенями. Четыре противоопухолевых препарата, разработанные на основе морских природных соединений, уже введены в клиническую практику, а другие находятся на различных стадиях клинических испытаний.

В процессе выполнения настоящей работы была изучена большая серия низкомолекулярных метаболитов, выделенных из некоторых морских беспозвоночных. В результате были идентифицированы два соединения, фрондозид А и ризохалинин, проявляющие достоверное противоопухолевое действие в условиях экспериментов *in vivo* на бестимусных мышах, которым были привиты опухоли человека. Было показано, что данные два вещества не обладают выраженными побочными эффектами при систематическом введении их животным. Таким образом, они являются перспективными для дальнейшего исследования в качестве потенциальных кандидатов для создания на их основе противоопухолевых препаратов.

Многие исследованные в настоящей работе морские природные соединения обладали комплексным противоопухолевым действием и одновременно действовали на несколько молекулярных мишеней. Например, фрондозид А и ризохалинин одновременно индуцировали апоптоз опухолевых клеток и, предположительно, стимулировали иммунитет, а также ингибировали несколько механизмов лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Похожая картина наблюдалась и для других исследованных веществ.

Кроме того, были обнаружены несколько неожиданных особенностей молекулярного действия изучаемых соединений на опухолевые клетки, открывающих дополнительные перспективы для их дальнейшего изучения и применения в различных областях онкологии, молекулярной биологии и биохимии. Найденные эффекты не всегда

были непосредственно связаны с прямым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, однако они могут быть интересны с точки зрения клеточной биологии и биохимии. К таким находкам относится, например, ярко выраженная способность пульхранина А и микаламида А ингибировать транскрипционную активность онкогенного фактора AP-1 (а также NFκB для микаламида А) в нецитотоксических концентрациях. Для тритерпенового гликозида фрондозид А был открыт новый механизм его цитотоксического действия – способность влиять на проницаемость митохондриальных мембран, вызывая транслокацию апоптоз-индуцирующего фактора из митохондрий в ядро. Кроме того, впервые были получены прямые доказательства способности данного соединения индуцировать p53-независимый апоптоз опухолевых клеток. Для алкалоида монанхоцидина А было выяснено, что механизм его действия не является апоптотическим, а напротив заключается в стимуляции довольно редкого процесса цитотоксической аутофагии опухолевых клеток и пермеабиллизации лизосомных мембран. Помимо этого, для ризохалинина была открыта способность ингибировать транспорт ионов через калиевые каналы и ингибировать экспрессию варианта сплайсинга андрогенового рецептора V7 (AR-V7), ответственного за устойчивость рака простаты к новому поколению противоопухолевых препаратов. Более того, для ряда исследуемых соединений была показана их способность усиливать действие уже используемых в клинической практике противоопухолевых препаратов.

Ещё одной важной находкой, сделанной, при выполнении данной работы, стало выявление способности некоторых из исследуемых веществ модулировать аутофагию опухолевых клеток. Помимо монанхоцидина А, который индуцировал цитотоксическую аутофагию, для фрондозид А и ризохалинина была показана способность ингибировать цитопротекторную аутофагию опухолевых клеток. Аутофагия является намного менее изученным процессом по сравнению с апоптозом, и в то же время она может открыть большие перспективы в вопросах преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Более того, интерес мировой общественности к аутофагии начал расти не более чем 10 лет назад, а уже в 2016 году привёл к получению Нобелевской премии по физиологии и медицине за «открытия в области аутофагии клеток». Полученные нами результаты показывают перспективность поиска модуляторов данного биологического процесса среди вторичных метаболитов морских беспозвоночных. На момент написания настоящей диссертации соискатель являлся автором наибольшего количества работ в области исследования аутофагии и её модуляторов среди российских учёных.

Таким образом, настоящая диссертационная работа создаёт основу для дальнейших исследований морских природных соединений как потенциальных хемопревентивных и

терапевтических противоопухолевых препаратов, а также биохимических инструментов и возможных лекарственных препаратов для лечения других заболеваний.

6. ВЫВОДЫ

1. Спиртовой экстракт асидии *Polysincraton* sp. содержит микаламид А. Микаламид А обладает канцеропревентивными свойствами, способен подавлять транскрипционную активность ядерных факторов AP-1 и NFκB, а также индуцировать p53-независимый апоптоз.

2. Гуанидиновый алкалоид монанхоцидин А из губки *Monanchora pulchra* индуцирует цитотоксическую аутофагию и увеличивает проницаемость лизосомных мембран, а также ингибирует миграцию и лекарственную устойчивость опухолевых клеток. Противоопухолевое действие монанхоцидина А может включать регулирование внутриклеточных уровней экспрессии и активности белков аполипопротеина Е, виментина и eIF5A.

3. Новые гуанидиновые алкалоиды морского происхождения – монанхоцидины А и В, монанхомикалины В и С, птиломикалин А, пульхранин А, урупацидин А и нормонанхоцидин D, выделенные из губки *Monanchora pulchra*, токсичны для опухолевых клеток. Исследованы зависимости «структура – активность» в этом ряду соединений, а для некоторых из них показаны канцеропревентивные свойства. Птиломикалин А-подобные соединения активируют киназы JNK1/2 и ERK1/2, а также транскрипционную активность ядерного фактора AP-1, индуцируя p53-независимую программируемую клеточную смерть. Пульхранин А ингибирует транскрипционную активность фактора AP-1 и активирует киназу JNK1/2, приводя к p53-независимой смерти опухолевых клеток. Урупацидин А вызывает активацию киназ JNK1/2 и ERK1/2 и индуцирует p53- и каспаза-независимую клеточную гибель.

4. Тритерпеновый гликозид фрондозид А проявляет высокую эффективность и низкую токсичность при исследовании на моделях лекарственно-устойчивого рака простаты человека *in vitro* и *in vivo*. Механизм его противоопухолевого действия включает индукцию апоптоза опухолевых клеток вместе с одновременным ингибированием прогрессии клеточного цикла и цитопротекторной аутофагии. В клетках лимфомы Бёркитта и уротелиальной карциномы человека фрондозид А индуцирует каспаза- и p53-независимый апоптоз *in vitro*, ингибирует цитопротекторную аутофагию и усиливает цитотоксические эффекты цисплатина и гемцитабина. Он увеличивает проницаемость митохондриальных мембран опухолевых клеток и вызывает транслокацию апоптогенной формы AIF в ядро.

5. Ризохалинин – агликон биполярного сфинголипида ризохалина – проявляет высокую эффективность и низкую токсичность при исследовании на моделях лекарственно-устойчивого рака простаты человека *in vitro* и *in vivo*. Механизм его

противоопухолевого действия включает индукцию каспаза-зависимого апоптоза, ингибирование цитопротекторной аутофагии, и, возможно, иммуностимуляцию. Потенциал-зависимые калиевые каналы являются одной из молекулярных мишеней ризохалинина. Ризохалинин и 18-гидроксиризохалинин являются наиболее активными соединениями в ряду полученных производных ризохалина и способны ингибировать AR-FL- и AR-V7-зависимый сигналинг, а элиминирование моносахаридного остатка от молекулы исходного ризохалина является необходимым для реализации данного свойства.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mosey R. A., Floreancig P. E. Isolation, biological activity, synthesis, and medicinal chemistry of the pederin/mycalamide family of natural products // *Natural Product Reports*. 2012. V. 29. P. 980-995.
2. Cardani C., Ghiringhelli D., Mondelli R., Quilico A. The structure of pederin // *Tetrahedron Letters*. 1965. V. 6. P. 2537-2545.
3. Furusaki A., Watanabé T., Matsumoto T., Yanagiya M. The crystal and molecular structure of pederin di-p-bromobenzoate // *Tetrahedron Letters*. 1968. V. 9. P. 6301-6304.
4. Brega A., Falaschi A., De Carli L., Pavan M. Studies on the mechanism of action of pederine // *Journal of Cell Biology*. 1968. V. 36. P. 485-96.
5. Sakemi S., Ichiba T., Kohmoto S., Saucy G. et al. Isolation and structure elucidation of onnamide A, a new bioactive metabolite of a marine sponge, *Theonella* sp // *Journal of the American Chemical Society*. 1988. V. 110. P. 4851-4853.
6. Perry N. B., Blunt J. W., Munro M. H. G., Pannell L. K. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus *Mycale* // *Journal of the American Chemical Society*. 1988. V. 110. P. 4850-4851.
7. Perry N. B., Blunt J. W., Munro M. H. G., Thompson A. M. Antiviral and antitumor agents from a New Zealand sponge, *Mycale* sp. 2. Structures and solution conformations of mycalamides A and B // *Journal of Organic Chemistry*. 1990. V. 55. P. 223-227.
8. Simpson J. S., Garson M. J., Blunt J. W., Munro M. H. G. et al. Mycalamides C and D, cytotoxic compounds from the marine sponge *Stylinos* n. species // *Journal of Natural Products*. 2000. V. 63. P. 704-706.
9. Pettit G. R., Xu J. P., Chapuis J. C., Pettit R. K. et al. Antineoplastic agents. 520. Isolation and structure of irciniastatins A and B from the Indo-Pacific marine sponge *Ircinia ramosa* // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004. V. 47. P. 1149-1152.
10. Cichewicz R. H., Valeriote F. A., Crews P. Psymberin, a potent sponge-derived cytotoxin from *Psammocinia* distantly related to the pederin family // *Org Lett*. 2004. V. 6. P. 1951-1954.
11. Burres N. S., Clement J. J. Antitumor activity and mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide A and B and onnamide // *Cancer Research*. 1989. V. 49. P. 2935-2940.
12. Nishimura S., Matsunaga S., Yoshida M., Hirota H. et al. 13-Deoxytedanolide, a marine sponge-derived antitumor macrolide, binds to the 60S large ribosomal subunit // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2005. V. 13. P. 449-54.

13. Gurel G., Blaha G., Steitz T. A., Moore P. B. Structures of triacetyloleandomycin and mycalamide A bind to the large ribosomal subunit of *Haloarcula marismortui* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009. V. 53. P. 5010-5014.
14. Lee K. H., Nishimura S., Matsunaga S., Fusetani N. et al. Inhibition of protein synthesis and activation of stress-activated protein kinases by onnamide A and theopederin B, antitumor marine natural products // *Cancer Science*. 2005. V. 96. P. 357-364.
15. Chinen T., Nagumo Y., Watanabe T., Imaizumi T. et al. Irciniastatin A induces JNK activation that is involved in caspase-8-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway // *Toxicology Letters*. 2010. V. 199. P. 341-346.
16. Ogawara H., Higashi K., Uchino K., Perry N. B. Change of ras-transformed NRK-cells back to normal morphology by mycalamides A and B, antitumor agents from a marine sponge // *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1991. V. 39. P. 2152-2154.
17. Hood K. A., West L. M., Northcote P. T., Berridge M. V. et al. Induction of apoptosis by the marine sponge (*Mycale*) metabolites, mycalamide A and pateamine // *Apoptosis*. 2001. V. 6. P. 207-219.
18. Venturi V., Davies C., Singh A. J., Matthews J. H. et al. The protein synthesis inhibitors mycalamides A and E have limited susceptibility toward the drug efflux network // *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2012. V. 26. P. 94-100.
19. Guzii A. G., Makarieva T. N., Denisenko V. A., Dmitrenok P. S. et al. Monanchocidin: A new apoptosis-inducing polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* // *Organic Letters*. 2010. V. 12. P. 4292-4295.
20. Makarieva T. N., Tabakmaher K. M., Guzii A. G., Denisenko V. A. et al. Monanchocidins B-E: Polycyclic guanidine alkaloids with potent antileukemic activities from the sponge *Monanchora pulchra* // *Journal of Natural Products*. 2011. V. 74. P. 1952-1958.
21. Makarieva T. N., Tabakmaher K. M., Guzii A. G., Denisenko V. A. et al. Monanchomycalins A and B, unusual guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora pulchra* // *Tetrahedron Letters*. 2012. V. 53. P. 4228-4231.
22. Guzii A. G., Makarieva T. N., Korolkova Y. V., Andreev Y. A. et al. Pulchranin A, isolated from the Far-Eastern marine sponge, *Monanchora pulchra*: the first marine non-peptide inhibitor of TRPV-1 channels // *Tetrahedron Letters*. 2013. V. 54. P. 1247-1250.
23. Makarieva T. N., Ogurtsova E. K., Korolkova Y. V., Andreev Y. A. et al. Pulchranins B and C, new acyclic guanidine alkaloids from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra* // *Natural Products Communications*. 2013. V. 8. P. 1229-1232.

24. Tabakmakher K. M., Denisenko V. A., Guzii A. G., Dmitrenok P. S. et al. Monanchomycalin C, a new pentacyclic guanidine alkaloid from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra* // *Natural Products Communicatipons*. 2013. V. 8. P. 1399-1402.
25. Makarieva T. N., Ogurtsova E. K., Denisenko V. A., Dmitrenok P. S. et al. Urupocidin A: a new, inducing iNOS expression bicyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora pulchra* // *Organic Letters*. 2014. V. 16. P. 4292-4295.
26. Tabakmakher K. M., Makarieva T. N., Denisenko V. A., Guzii A. G. et al. Normonanchocidins A, B and D, new pentacyclic guanidine alkaloids from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra* // *Natural Product Communications*. 2015. V. 10. P. 913-916.
27. Tabakmakher K. M., Makarieva T. N., Shubina L. K., Denisenko V. A. et al. Monanchoxymycalins A and B, new hybrid pentacyclic guanidine alkaloids from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra* // *Natural Product Communications*. 2016. V. 11. P. 1817-1820.
28. Rubiolo J. A., Ternon E., Lopez-Alonso H., Thomas O. P. et al. Crambescidin-816 acts as a fungicidal with more potency than crambescidin-800 and-830, inducing cell cycle arrest, increased cell size and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* // *Marine Drugs*. 2013. V. 11. P. 4419-4434.
29. Aoki S., Kong D., Matsui K., Kobayashi M. Erythroid differentiation in K562 chronic myelogenous cells induced by crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid // *Anticancer Research*. 2004. V. 24. P. 2325-2330.
30. Ottinger S., Kloppel A., Rausch V., Liu L. et al. Targeting of pancreatic and prostate cancer stem cell characteristics by *Crambe crambe* marine sponge extract // *International Journal of Cancer*. 2012. V. 130. P. 1671-1681.
31. Kelly M. S. Echinoderms: their culture and bioactive compounds // *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 2005. V. 39. P. 139-165.
32. Aminin D., Menchinskaya E., Pisliagin E., Silchenko A. et al. Anticancer Activity of Sea Cucumber Triterpene Glycosides // *Marine Drugs*. 2015. V. 13. P. 1202-1223.
33. Van Dyck S., Caulier G., Todesco M., Gerbaux P. et al. The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish // *Journal of Experimental Biology*. 2011. V. 214. P. 1347-1356.
34. Silchenko A. S., Avilov S. A., Kalinin V. I., Kalinovskiy A. I. et al. Constituents of the sea cucumber *Cucumaria okhotensis*. Structures of okhotosides B1-B3 and cytotoxic activities of some glycosides from this species // *Journal of Natural Products*. 2008. V. 71. P. 351-356.

35. Stonik V. A., Elyakov G. B. Secondary metabolites from Echinoderms as chemotaxonomic markers // *Bioorganic Marine Chemistry* / Scheuer P. J. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988. P. 43-86.
36. Kalinin V. I., Prokofieva N. G., Likhatskaya G. N., Shentsova E. B. et al. Hemolytic activity of triterpene glycosides from the Dendrochirotida order Holothurian // *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine* / Waller G. R., Yamasaki K. Boston, MA: Springer US, 1996. P. 557-564.
37. Janakiram N., Mohammed A., Rao C. Sea cucumbers metabolites as potent anti-cancer agents // *Marine Drugs*. 2015. V. 13. P. 2909-2923.
38. Girard M., Bélanger J., ApSimon J. W., Garneau F.-X. et al. Frondoside A. A novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumaria frondosa* // *Canadian Journal of Chemistry*. 1990. V. 68. P. 11-18.
39. Janakiram N. B., Mohammed A., Zhang Y., Choi C. I. et al. Chemopreventive effects of Frondanol A5, a *Cucumaria frondosa* extract, against rat colon carcinogenesis and inhibition of human colon cancer cell growth // *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010. V. 3. P. 82-91.
40. Janakiram N. B., Mohammed A., Bryant T., Lightfoot S. et al. Improved innate immune responses by frondanol A5, a sea cucumber extract, prevent intestinal tumorigenesis // *Cancer Prevention Research*. 2015. V. 8. P. 327-337.
41. Roginsky A. B., Ding X. Z., Woodward C., Ujiki M. B. et al. Anti-pancreatic cancer effects of a polar extract from the edible sea cucumber, *Cucumaria frondosa* // *Pancreas*. 2010. V. 39. P. 646-652.
42. Li X., Roginsky A. B., Ding X. Z., Woodward C. et al. Review of the apoptosis pathways in pancreatic cancer and the anti-apoptotic effects of the novel sea cucumber compound, Frondoside A // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. V. 1138. P. 181-198.
43. Al Shemali J., Mensah-Brown E., Parekh K., Thomas S. A. et al. Frondoside A enhances the antiproliferative effects of gemcitabine in pancreatic cancer // *European Journal of Cancer*. 2014. V. 50. P. 1391-1398.
44. Al Shemali J., Parekh K. A., Newman R. A., Hellman B. et al. Pharmacokinetics in mouse and comparative effects of frondosides in pancreatic cancer // *Marine Drugs*. 2016. V. 14.
45. Jin J. O., Shastina V. V., Shin S. W., Xu Q. et al. Differential effects of triterpene glycosides, frondoside A and cucumarioside A2-2 isolated from sea cucumbers on caspase activation and apoptosis of human leukemia cells // *FEBS Letters*. 2009. V. 583. P. 697-702.

46. Al Marzouqi N., Iratni R., Nemmar A., Arafat K. et al. Frondoside A inhibits human breast cancer cell survival, migration, invasion and the growth of breast tumor xenografts // *European Journal of Pharmacology*. 2011. V. 668. P. 25-34.
47. Ma X., Kundu N., Collin P. D., Goloubeva O. et al. Frondoside A inhibits breast cancer metastasis and antagonizes prostaglandin E receptors EP4 and EP2 // *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012. V. 132. P. 1001-1008.
48. Attoub S., Arafat K., Gelaude A., Al Sultan M. A. et al. Frondoside A suppressive effects on lung cancer survival, tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e53087.
49. Menchinskaya E. S., Aminin D. L., Avilov S. A., Silchenko A. S. et al. Inhibition of tumor cells multidrug resistance by cucumarioside A2-2, frondoside A and their complexes with cholesterol // *Natural Products Communications*. 2013. V. 8. P. 1377-1380.
50. Pruett S. T., Bushnev A., Hagedorn K., Adiga M. et al. Thematic review series: Sphingolipids - Biodiversity of sphingoid bases ("sphingosines") and related amino alcohols // *Journal of Lipid Research*. 2008. V. 49. P. 1621-1639.
51. Makarieva T. N., Denisenko V. A., Stonik V. A., Milgrom Y. M. et al. Rhizochalin, a novel secondary metabolite of mixed biosynthesis from the sponge *Rhizochalina incrustata* // *Tetrahedron Letters*. 1989. V. 30. P. 6581-6584.
52. Molinski T. F., Makarieva T. N., Stonik V. A. (-)-Rhizochalin is a dimeric enantiomorphous (2R)-sphingolipid: absolute configuration of pseudo-C(2v)-symmetric bis-2-amino-3-alkanols by CD // *Angewandte Chemie. International Ed. In English*. 2000. V. 39. P. 4076-4079.
53. Makarieva T. N., Guzii A. G., Denisenko V. A., Dmitrenok P. S. et al. Rhizochalin A, a novel two-headed sphingolipid from the sponge *Rhizochalina incrustata* // *Journal of Natural Products*. 2005. V. 68. P. 255-257.
54. Makarieva T. N., Zakharenko A. M., Denisenko V. A., Dmitrenok P. S. et al. Rhizochalinin A, a new antileukemic two-headed sphingolipid from the sponge *Rhizochalina incrustata* // *Chemistry of Natural Compounds*. 2007. V. 43. P. 468-469.
55. Makarieva T. N., Dmitrenok P. S., Zakharenko A. M., Denisenko V. A. et al. Rhizochalins C and D from the sponge *Rhizochalina incrustata*. A rare threo-sphingolipid and a facile method for determination of the carbonyl position in alpha,omega-bifunctionalized ketosphingolipids // *Journal of Natural Products*. 2007. V. 70. P. 1991-1998.
56. Makarieva T. N., Guzii A. G., Denisenko V. A., Dmitrenok P. S. et al. New two-headed sphingolipid-like compounds from the marine sponge *Oceanapia* sp // *Russian Chemical Bulletin*. 2008. V. 57. P. 669-673.

57. Makarieva T. N., Zakharenko A. M., Dmitrenok P. S., Guzii A. G. et al. Isorhizochalin: a minor unprecedented bipolar sphingolipid of stereodivergent biogenesis from the *Rhizochalina incrustata* // *Lipids*. 2009. V. 44. P. 1155-1162.
58. Fedorov S. N., Makarieva T. N., Guzii A. G., Shubina L. K. et al. Marine two-headed sphingolipid-like compound rhizochalin inhibits EGF-induced transformation of JB6 P+ Cl41 cells // *Lipids*. 2009. V. 44. P. 777-785.
59. Ko J., Molinski T. F. D-Glucosamine-derived synthons for assembly of L-threo-sphingoid bases. Total synthesis of rhizochalalin C // *The Journal of Organic Chemistry*. 2013. V. 78. P. 498-505.
60. Jin J. O., Shastina V., Park J. I., Han J. Y. et al. Differential induction of apoptosis of leukemic cells by rhizochalin, two headed sphingolipids from sponge and its derivatives // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2009. V. 32. P. 955-962.
61. Nicholas G. M., Li R., MacMillan J. B., Molinski T. F. Antifungal activity of bifunctional sphingolipids. Intramolecular synergism within long-chain alpha, omega-bis-aminoalcohols // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2002. V. 12. P. 2159-2162.
62. Zhou B.-N., Mattern M. P., Johnson R. K., Kingston D. G. I. Structure and stereochemistry of a novel bioactive sphingolipid from a *Calyx* sp // *Tetrahedron*. 2001. V. 57. P. 9549-9554.
63. Nicholas G. M., Hong T. W., Molinski T. F., Lerch M. L. et al. Oceanapiside, an antifungal bis-alpha, omega-amino alcohol glycoside from the marine sponge *Oceanapia phillipensis* // *Journal of Natural Products*. 1999. V. 62. P. 1678-1681.
64. Nicholas G. M., Molinski T. F. Enantiodivergent biosynthesis of the dimeric sphingolipid oceanapiside from the marine sponge *Oceanapia phillipensis*. Determination of remote stereochemistry // *Journal of the American Chemical Society*. 2000. V. 122. P. 4011-4019.
65. Kong F., Faulkner D. J. Leucettamols A and B, two antimicrobial lipids from the calcareous sponge *Leucetta microraphis* // *The Journal of Organic Chemistry*. 1993. V. 58. P. 970-971.
66. Willis R. H., de Vries D. J. BRS1, a C30 bis-amino, bis-hydroxy polyunsaturated lipid from an Australian calcareous sponge that inhibits protein kinase C // *Toxicon*. 1997. V. 35. P. 1125-1129.
67. Jayatilake G. S., Baker B. J., McClintock J. B. Rhapsamine, a cytotoxin from the antarctic sponge *Leucetta leptorhaphis* // *Tetrahedron Letters*. 1997. V. 38. P. 7507-7510.

68. Khanal P., Kang B. S., Yun H. J., Cho H. G. et al. Aglycon of rhizochalin from the *Rhizochalina incrustata* induces apoptosis via activation of AMP-activated protein kinase in HT-29 colon cancer cells // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2011. V. 34. P. 1553-1558.
69. Popov A. M., Makarieva T. N., Fedoreev S. A., Stonik V. A. Antitumor and cytotoxic activity of small-molecule metabolites from marine tropical sponges // *Tumor chemotherapy in USSR*. 1991. P. 61-66.
70. Popov A. M., Makaryeva T. N., Stonik V. A. Membrane activity of rhizochaline isolated from *Rhizochalina incrustata* // *Biofizika*. 1990. V. 35. P. 883-884.
71. Tsukamoto S., Takeuchi T., Rotinsulu H., Mangindaan R. E. P. et al. Leucettamol A: A new inhibitor of Ubc13-Uev1A interaction isolated from a marine sponge, *Leucetta aff. microrhaphis* // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008. V. 18. P. 6319-6320.
72. Kunwar P. S., Lehmann R. Developmental biology - Germ-cell attraction // *Nature*. 2003. V. 421. P. 226-227.
73. Clark A. T. Establishment and differentiation of human embryonic stem cell derived germ cells // *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 2007. V. 63. P. 77-86.
74. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M. et al. Chapter 20. Germ cells and fertilization // *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition / Science N. Y. G. New York, 2002. P. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21049/>.
75. Honecker F., Oosterhuis J. W., Mayer F., Hartmann J. T. et al. New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors // *World Journal of Urology*. 2004. V. 22. P. 15-24.
76. Ulbright T. M. Germ cell neoplasms of the testis // *American Journal of Surgical Pathology*. 1993. V. 17. P. 1075-1091.
77. Gilbert D., Rapley E., Shipley J. Testicular germ cell tumours: predisposition genes and the male germ cell niche // *Nature Reviews Cancer*. 2011. V. 11. P. 278-288.
78. Bosl G. J., Motzer R. J. Testicular germ-cell cancer // *New England Journal of Medicine*. 1997. V. 337. P. 242-253.
79. Reuter V. E. Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors // *Modern Pathology*. 2005. V. 18. P. S51-S60.
80. van de Geijn G.-J. M., Hersmus R., Looijenga L. H. J. Recent developments in testicular germ cell tumor research // *Birth Defects Research Part C-Embryo Today-Reviews*. 2009. V. 87. P. 96-113.
81. Troost M. M., Sternberg C. N., de Wit R. Management of good risk germ-cell tumours // *BJU International*. 2009. V. 104. P. 1387-1391.

82. Einhorn L. H. Curing metastatic testicular cancer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. V. 99. P. 4592-4595.
83. Oosterhuis J. W., Looijenga L. H. J. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective // *Nature Reviews Cancer*. 2005. V. 5. P. 210-222.
84. Koeberle B., Tomicic M. T., Usanova S., Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications // *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*. 2010. V. 1806. P. 172-182.
85. Andrews P. W., Damjanov I., Simon D., Banting G. S. et al. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation *in vivo* and *in vitro* // *Laboratory Investigation*. 1984. V. 50. P. 147-162.
86. Port M., Glaesener S., Ruf C., Riecke A. et al. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines // *Molecular Cancer*. 2011. V. 10.
87. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y. P. et al. Cancer statistics, 2008 // *CA Cancer Journal for Clinicians*. 2008. V. 58. P. 71-96.
88. Hotte S. J., Saad F. Current management of castrate-resistant prostate cancer // *Current Oncology*. 2010. V. 17. P. S72-S79.
89. Perlmutter M. A., Lepor H. Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer // *Reviews in Urology*. 2007. V. 9 Suppl 1. P. S3-S8.
90. Warde P., Mason M., Ding K., Kirkbride P. et al. Combined androgen deprivation therapy and radiation therapy for locally advanced prostate cancer: a randomised, phase 3 trial // *Lancet*. 2011. V. 378. P. 2104-2111.
91. Nelson P. S. Targeting the androgen receptor in prostate cancer — a resilient foe // *New England Journal of Medicine*. 2014. V. 371. P. 1067-1069.
92. Boyd L. K., Mao X., Lu Y.-J. The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity // *Nature Reviews Urology*. 2012. V. 9. P. 652-664.
93. Claessens F., Helsen C., Prekovic S., Van den Broeck T. et al. Emerging mechanisms of enzalutamide resistance in prostate cancer // *Nature Reviews Urology*. 2014. V. 11. P. 712-716.
94. Kung H.-J., Changou C., Nguyen H. G., Yang J. C. et al. Autophagy and prostate cancer therapeutics // *Prostate cancer* / Tindal D. J. Springer, 2013. P. 497-518.
95. O'Neill A. J., Prencipe M., Dowling C., Fan Y. et al. Characterisation and manipulation of docetaxel resistant prostate cancer cell lines // *Molecular Cancer*. 2011. V. 10. P. 126-126.

96. Ware K. E., Garcia-Blanco M. A., Armstrong A. J., Dehm S. M. Biologic and clinical significance of androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer // *Endocrine-Related Cancer*. 2014. V. 21. P. T87-T103.
97. Antonarakis E. S., Lu C., Wang H., Luber B. et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer // *New England Journal of Medicine*. 2014. V. 371. P. 1028-1038.
98. Lu C., Luo J. Decoding the androgen receptor splice variants // *Translational andrology and urology*. 2013. V. 2. P. 178-186.
99. Liu C., Lou W., Zhu Y., Nadiminty N. et al. Niclosamide inhibits androgen receptor variants expression and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer // *Clinical Cancer Research*. 2014. V. 20. P. 3198-3210.
100. Li Y., Chan S. C., Brand L. J., Hwang T. H. et al. Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines // *Cancer Research*. 2013. V. 73. P. 483-489.
101. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children // *British Journal of Surgery*. 1958. V. 46. P. 218-23.
102. God J. M., Haque A. Burkitt Lymphoma: Pathogenesis and Immune Evasion // *Journal of Oncology*. 2010. V. 2010. P. 14.
103. Dang C. V., O'Donnell K. A., Zeller K. I., Nguyen T. et al. The c-Myc target gene network // *Seminars in Cancer Biology*. 2006. V. 16. P. 253-264.
104. Doucet J. P., Hussain A., Al-Rasheed M., Gaidano G. et al. Differences in the expression of apoptotic proteins in Burkitt's lymphoma cell lines: potential models for screening apoptosis-inducing agents // *Leukemia & Lymphoma*. 2004. V. 45. P. 357-362.
105. Magluta E. P. S., Klumb C. E. Resistência ao tratamento no linfoma de Burkitt: associação com mutações específicas no gene TP53? // *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2008. V. 30. P. 41-46.
106. Philchenkov A., Zavelevich M., Krocak T. J., Los M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities // *Experimental Oncology*. 2004. V. 26. P. 82-97.
107. Lindstrom M. S., Klangby U., Wiman K. G. p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53 // *Oncogene*. 2001. V. 20. P. 2171-2177.
108. Ichikawa A., Kinoshita T., Watanabe T., Kato H. et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma // *New England Journal of Medicine*. 1997. V. 337. P. 529-534.

109. Yu Q. Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: New opportunities for cancer therapy // *Drug Resistance Updates*. 2006. V. 9. P. 19-25.
110. Kim J. J. Recent advances in treatment of advanced urothelial carcinoma // *Current Urology Reports*. 2012. V. 13. P. 147-152.
111. Dreicer R. Second-line chemotherapy for advanced urothelial cancer: Because we should or because we can? // *Journal of Clinical Oncology*. 2009. V. 27. P. 4444-4445.
112. Oing C., Rink M., Oechsle K., Seidel C. et al. Second line chemotherapy for advanced and metastatic urothelial carcinoma: Vinflunine and beyond - A comprehensive review of the current literature // *Journal of Urology*. 2016. V. 195. P. 254-263.
113. Atezolizumab for Urothelial Carcinoma. 2016. URL: <http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm501878.htm> (Access date: 05/19/2016).
114. Ojha R., Singh S. K., Bhattacharyya S., Dhanda R. S. et al. Inhibition of grade dependent autophagy in urothelial carcinoma increases cell death under nutritional limiting condition and potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agent // *J Urol*. 2014. V. 191. P. 1889-98.
115. Massari F., Santoni M., Ciccarese C., Brunelli M. et al. Emerging concepts on drug resistance in bladder cancer: Implications for future strategies // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2015. V. 96. P. 81-90.
116. Berggren P., Steineck G., Adolfsson J., Hansson J. et al. p53 mutations in urinary bladder cancer // *British Journal of Cancer*. 2001. V. 84. P. 1505-1511.
117. George B., Datar R. H., Wu L., Cai J. et al. p53 gene and protein status: The role of p53 alterations in predicting outcome in patients with bladder cancer // *Journal of Clinical Oncology*. 2007. V. 25. P. 5352-5358.
118. Malats N., Bustos A., Nascimento C. M., Fernandez F. et al. P53 as a prognostic marker for bladder cancer: a meta-analysis and review // *Lancet Oncology*. 2005. V. 6. P. 678-686.
119. Lin Y. C., Lin J. F., Wen S. I., Yang S. C. et al. Inhibition of high basal level of autophagy induces apoptosis in human bladder cancer cells // *Journal of Urology*. 2015. P. 1126-1135.
120. Bertram J. S. The molecular biology of cancer // *Molecular Aspects of Medicine*. 2000. V. 21. P. 167-223.
121. Surh Y.-J. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999. V. 428. P. 305-327.

122. Hong W. K., Sporn M. B. Recent advances in chemoprevention of cancer // *Science*. 1997. V. 278. P. 1073-1077.
123. Steele V. E., Sharma S., Mehta R., Elmore E. et al. Use of *in vitro* assays to predict the efficacy of chemopreventive agents in whole animals // *Journal of cellular biochemistry. Supplement*. 1996. V. 26. P. 29-53.
124. Colburn N. H., Gindhart T. D. Specific binding of transforming growth factor correlates with promotion of anchorage independence in EGF receptorless mouse JB6 cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1981. V. 102. P. 799-807.
125. Colburn N. H., Former B. F., Nelson K. A., Yuspa S. H. Tumour promoter induces anchorage independence irreversibly // *Nature*. 1979. V. 281. P. 589-591.
126. Colburn N. H., Koehler B. A., Nelson K. J. A cell culture assay for tumor-promoter-dependent progression toward neoplastic phenotype: detection of tumor promoters and promotion inhibitors // *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*. 1980. V. 1. P. 87-96.
127. Dong Z. G., Birrer M. J., Watts R. G., Matrisian L. M. et al. Blocking of tumor promoter-induced AP-1 activity inhibits induced transformation in JB6 mouse epidermal cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. V. 91. P. 609-613.
128. Hsu T. C., Nair R., Tulsian P., Camalier C. E. et al. Transformation nonresponsive cells owe their resistance to lack of p65/nuclear factor-kappa B activation // *Cancer Research*. 2001. V. 61. P. 4160-4168.
129. Li J. J., Westergaard C., Ghosh P., Colburn N. H. Inhibitors of both nuclear factor-kappa Beta and activator protein-1 activation block the neoplastic transformation response // *Cancer Research*. 1997. V. 57. P. 3569-3576.
130. Suzukawa K., Weber T. J., Colburn N. H. AP-1, NF kappa B, and ERK activation thresholds for promotion of neoplastic transformation in the mouse epidermal JB6 model // *Environmental Health Perspectives*. 2002. V. 110. P. 865-870.
131. Bar P. R. Apoptosis - the cell's silent exit // *Life Sciences*. 1996. V. 59. P. 369-378.
132. Savill J., Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death // *Nature*. 2000. V. 407. P. 784-788.
133. Bortner C. D., Cidlowski J. A. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell // *Cell Death and Differentiation*. 2002. V. 9. P. 1307-1310.
134. Ho P. K., Hawkins C. J. Mammalian initiator apoptotic caspases // *FEBS Journal*. 2005. V. 272. P. 5436-5453.
135. McIlwain D. R., Berger T., Mak T. W. Caspase functions in cell death and disease // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013. V. 5. P. a008656.

136. Kaufmann S. H., Hengartner M. O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium // *Trends in Cell Biology*. 2001. V. 11. P. 526-534.
137. Mayer B., Oberbauer R. Mitochondrial regulation of apoptosis // *News in Physiological Sciences*. 2003. V. 18. P. 89-94.
138. Green D. R., Reed J. C. Mitochondria and apoptosis // *Science*. 1998. V. 281. P. 1309-1312.
139. Hengartner M. O. The biochemistry of apoptosis // *Nature*. 2000. V. 407. P. 770-776.
140. Lazebnik Y. A., Kaufmann S. H., Desnoyers S., Poirier G. G. et al. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE // *Nature*. 1994. V. 371. P. 346-347.
141. Janicke R. U., Ng P., Sprengart M. L., Porter A. G. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. 1998. V. 273. P. 15540-15545.
142. Kroemer G., Martin S. J. Caspase-independent cell death // *Nature Medicine*. 2005. V. 11. P. 725-730.
143. Bröker L. E., Kruyt F. A. E., Giaccone G. Cell death independent of caspases: A review // *Clinical Cancer Research*. 2005. V. 11. P. 3155-3162.
144. Tait S. W., Green D. R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut // *Oncogene*. 2008. V. 27. P. 6452-6461.
145. Li L. Y., Luo X., Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria // *Nature*. 2001. V. 412. P. 95-99.
146. Sevrioukova I. F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011. V. 14. P. 2545-2579.
147. Lorenzo H. K., Susin S. A., Penninger J., Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death // *Cell Death & Differentiation*. 1999. V. 6. P. 516-524.
148. Foghsgaard L., Wissing D., Mauch D., Lademann U. et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor // *Journal of Cell Biology*. 2001. V. 153. P. 999-1010.
149. Roberts L. R., Kurosawa H., Bronk S. F., Fesmier P. J. et al. Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes // *Gastroenterology*. 1997. V. 113. P. 1714-1726.

150. Vancompernelle K., Van Herreweghe F., Pynaert G., Van de Craen M. et al. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity // *FEBS Letters*. 1998. V. 438. P. 150-158.
151. Boya P., Andreau K., Poncet D., Zamzami N. et al. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion // *Journal of Experimental Medicine*. 2003. V. 197. P. 1323-1334.
152. Boya P., Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death // *Oncogene*. 2008. V. 27. P. 6434-6451.
153. Guicciardi M. E., Deussing J., Miyoshi H., Bronk S. F. et al. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c // *Journal of Clinical Investigation*. 2000. V. 106. P. 1127-1137.
154. Stoka V., Turk B., Schendel S. L., Kim T. H. et al. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. V. 276. P. 3149-3157.
155. Breckenridge D. G., Germain M., Mathai J. P., Nguyen M. et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways // *Oncogene*. 2003. V. 22. P. 8608-8618.
156. Morishima N., Nakanishi K., Tsuchiya K., Shibata T. et al. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. V. 279. P. 50375-50381.
157. Szegedzi E., Fitzgerald U., Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003. V. 1010. P. 186-194.
158. Jimbo A., Fujita E., Kouroku Y., Ohnishi J. et al. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation // *Experimental Cell Research*. 2003. V. 283. P. 156-166.
159. Wang K. K. Calpain and caspase: can you tell the difference? // *Trends in Neurosciences*. 2000. V. 23. P. 20-26.
160. Seglen P. O., Bohley P. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms // *Experientia*. 1992. V. 48. P. 158-172.
161. Yang Z. J., Chee C. E., Huang S., Sinicrope F. A. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011. V. 10. P. 1533-1541.
162. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004. V. 36. P. 2491-2502.
163. Punnonen E. L., Reunanen H. Effects of vinblastine, leucine, and histidine, and 3-methyladenine on autophagy in Ehrlich ascites cells // *Experimental and Molecular Pathology*. 1990. V. 52. P. 87-97.

164. Paglin S., Hollister T., Delohery T., Hackett N. et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles // *Cancer Research*. 2001. V. 61. P. 439-444.
165. Solitro A. R., MacKeigan J. P. Leaving the lysosome behind: novel developments in autophagy inhibition // *Future Medicinal Chemistry*. 2016. V. 8. P. 73-86.
166. Amaravadi R. K., Yu D., Lum J. J., Bui T. et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma // *Journal of Clinical Investigation*. 2007. V. 117. P. 326-336.
167. Cheng Y., Ren X., Hait W. N., Yang J. M. Therapeutic targeting of autophagy in disease: biology and pharmacology // *Pharmacological Reviews*. 2013. V. 65. P. 1162-1197.
168. Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer // *Nature reviews: Cancer*. 2007. V. 7. P. 961-967.
169. Gewirtz D. A. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy // *Cancer Research*. 2014. V. 74. P. 647-651.
170. Hippert M. M., O'Toole P. S., Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? // *Cancer Research*. 2006. V. 66. P. 9349-9351.
171. Austgen K., Johnson E. T., Park T.-J., Curran T. et al. The adaptor protein CRK is a pro-apoptotic transducer of endoplasmic reticulum stress // *Nature Cell Biology*. 2012. V. 14. P. 87-92.
172. Kaur J., Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015. V. 16. P. 461-472.
173. Lang T., Schaeffeler E., Bernreuther D., Bredschneider M. et al. Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole // *EMBO Journal*. 1998. V. 17. P. 3597-3607.
174. Tanida I., Ueno T., Kominami E. LC3 and Autophagy // *Methods in Molecular Biology*. 2008. V. 445. P. 77-88.
175. Klionsky D. J., Abdelmohsen K., Abe A., Abedin M. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) // *Autophagy*. 2016. V. 12. P. 1-222.
176. Chou T.-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method // *Cancer Research*. 2010. V. 70. P. 440-446.
177. Chou T.-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies // *Pharmacological Reviews*. 2006. V. 58. P. 621-681.

178. Chou T. C., Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors // *Advances in Enzyme Regulation*. 1984. V. 22. P. 27-55.
179. Wasinger V. C., Cordwell S. J., Cerpapoljak A., Yan J. X. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* // *Electrophoresis*. 1995. V. 16. P. 1090-1094.
180. Speicher D. W. Chapter 1 - Overview of proteome analysis // *Proteome Analysis* / David W. S. Amsterdam: Elsevier, 2004. P. 1-18.
181. Farley A. R., Link A. J. Identification and quantification of protein posttranslational modifications // *Guide to Protein Purification, Second Edition* / Burgess R. R., Deutscher M. P. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2009. P. 725-763.
182. Dyshlovoy S. A., Honecker F. Marine Compounds and Cancer: Where Do We Stand? // *Marine Drugs*. 2015. V. 13. P. 5657-5665.
183. Dyshlovoy S. A., Honecker F. Marine Compounds and Cancer: 2017 Updates // *Marine Drugs*. 2018. V. 16.
184. Fedorov S. N., Stonik V. A., Honecker F., Dyshlovoy S. A. Structure-activity Relationship Studies of New Marine Anticancer Agents and their Synthetic Analogues // *Current Medicinal Chemistry*. 2017. V. 24. P. 4779-4799.
185. Fedorov S. N., Krasokhin V. B., Shubina L. K., Dyshlovoy S. A. et al. The Extracts of Some Marine Invertebrates and Algae Collected off the Coast Waters of Vietnam Induce the Inhibitory Effects on the Activator Protein-1 Transcriptional Activity in JB6 Cl41 Cells // *Journal of Chemistry*. 2013. V. 2013. P. 6.
186. Dyshlovoy S. A., Hauschild J., Amann K., Tabakmakher K. M. et al. Marine alkaloid Monanchocidin A overcomes drug resistance by induction of autophagy and lysosomal membrane permeabilization // *Oncotarget*. 2015. V. 6. P. 17328-17341.
187. Guzii A. G., Makarieva T. N., Denisenko V. A., Dmitrenok P. S. et al. Melonoside A: An ω -Glycosylated Fatty Acid Amide from the Far Eastern Marine Sponge *Melonanchora kobjakovae* // *Organic Letters*. 2016. V. 18. P. 3478-3481.
188. Fedorov S. N., Dyshlovoy S. A., Kuzmich A. S., Shubina L. K. et al. *In vitro* Anticancer Activities of Some Triterpene Glycosides from Holothurians of Cucumariidae, Stichopodidae, Psolidae, Holothuriidae and Synaptidae families // *Natural Product Communications*. 2016. V. 11. P. 1239-1242.
189. Dyshlovoy S. A., Otte K., Alsdorf W. H., Hauschild J. et al. Marine compound rhizochalinin shows high *in vitro* and *in vivo* efficacy in castration resistant prostate cancer // *Oncotarget*. 2016. V. 7. P. 69703-69717.

190. Kolesnikova S. A., Lyakhova E. G., Kalinovskiy A. I., Pushilin M. A. et al. Isolation, Structures, and Biological Activities of Triterpenoids from a *Penares* sp. Marine Sponge // *Journal of Natural Products*. 2013. V. 76. P. 1746-1752.
191. Dyshlovoy S. A., Fedorov S. N., Kalinovskiy A. I., Shubina L. K. et al. Mycalamide A shows cytotoxic properties and prevents EGF-induced neoplastic transformation through inhibition of nuclear factors // *Marine Drugs*. 2012. V. 10. P. 1212-1224.
192. Levina E. V., Aminin D. L., Kovalchuk S. N., Kozhemyako V. B. et al. Polar steroids from *Solaster endeca* starfish and the physiological activity of polar steroids from three starfish species // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2010. V. 36. P. 233-239.
193. Malyarenko O. S., Dyshlovoy S. A., Kicha A. A., Ivanchina N. V. et al. The inhibitory activity of luzonicosides from the starfish *Echinaster luzonicus* against human melanoma cells // *Mar Drugs*. 2017. V. 15.
194. Kicha A. A., Ivanchina N. V., Huong T. T. T., Kalinovskiy A. I. et al. Two new asterosaponins, archasterosides A and B, from the Vietnamese starfish *Archaster typicus* and their anticancer properties // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010. V. 20. P. 3826-3830.
195. Shubina L. K., Makarieva T. N., von Amsberg G., Denisenko V. A. et al. Monanchoxymycalin C with anticancer properties, new analogue of crambescidin 800 from the marine sponge *Monanchora pulchra* // *Nat Prod Res*. 2017. P. 1-8.
196. Shubina L. K., Makarieva T. N., Denisenko V. A., Dmitrenok P. S. et al. Absolute configuration and body part distribution of the alkaloid 6-epi-monanchorin from the marine polychaete *Chaetopterus variopedatus* // *Natural Product Communications*. 2016. V. 11. P. 1253-1257.
197. Shubina L. K., Makarieva T. N., Yashunsky D. V., Nifantiev N. E. et al. Pyridine Nucleosides Neopetrosides A and B from a Marine Neopetrosia sp Sponge. Synthesis of Neopetroside A and Its beta-Riboside Analogue // *Journal of Natural Products*. 2015. V. 78. P. 1383-1389.
198. Lyakhova E. G., Kolesnikova S. A., Kalinovskiy A. I., Afiyatulloev S. S. et al. Bromine-containing alkaloids from the marine sponge *Penares* sp // *Tetrahedron Letters*. 2012. V. 53. P. 6119-6122.
199. Shubina L. K., Kalinovskiy A. I., Makarieva T. N., Fedorov S. N. et al. New meroterpenoids from the marine sponge *Aka coralliphaga* // *Nat Prod Commun*. 2012. V. 7. P. 487-90.
200. Kellner R. L. L. Suppression of pederin biosynthesis through antibiotic elimination of endosymbionts in *Paederus sabaeus* // *Journal of Insect Physiology*. 2001. V. 47. P. 475-483.

201. Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. V. 99. P. 14002-14007.
202. Davis A. R., Butler A. J., Vanaltna I. Settlement behaviour of ascidian larvae: preliminary evidence for inhibition by sponge allelochemicals // *Marine Ecology-Progress Series*. 1991. V. 72. P. 117-123.
203. Dong Z. G., Watts R. G., Sun Y., Zhan S. N. et al. Progressive elevation of AP-1 activity during preneoplastic-to neoplastic progression as modeled in mouse JB6 cell variants // *International Journal of Oncology*. 1995. V. 7. P. 359-364.
204. Strickland J., Sun Y., Dong Z. G., Colburn N. H. Grafting assay distinguishes promotion sensitive from promotion resistant JB6 cells // *Carcinogenesis*. 1997. V. 18. P. 1135-1138.
205. He Z. W., Tang F. Q., Ermakova S., Li M. et al. Fyn is a novel target of (-)-epigallocatechin gallate in the inhibition of JB6 Cl41 cell transformation // *Molecular Carcinogenesis*. 2008. V. 47. P. 172-183.
206. Huang C. S., Ma W. Y., Goranson A., Dong Z. G. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway // *Carcinogenesis*. 1999. V. 20. P. 237-242.
207. Huang C. S., Ma W. Y., Young M. R., Colburn N. et al. Shortage of mitogen-activated protein kinase is responsible for resistance to AP-1 transactivation and transformation in mouse JB6 cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998. V. 95. P. 156-161.
208. Huang C. S., Ma W. Y., Dawson M. I., Rincon M. et al. Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997. V. 94. P. 5826-5830.
209. Koch S., Mayer F., Honecker F., Schittenhelm M. et al. Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions *in vitro* // *British Journal of Cancer*. 2003. V. 89. P. 2133-2139.
210. Fedorov S. N., Shubina L. K., Kicha A. A., Ivanchina N. V. et al. Proapoptotic and anticarcinogenic activities of leviusculoside G from the starfish *Henricia leviuscula* and probable molecular mechanism // *Natural Product Communications*. 2008. V. 3. P. 1575-1580.
211. Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L. et al. The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (= *Radianthus macrodactylus*) // *Toxicon*. 2010. V. 55. P. 811-817.

212. Vousden K. H. p53: Death star // *Cell*. 2000. V. 103. P. 691-694.
213. Chinni S. R., Li Y. W., Upadhyay S., Koppolu P. K. et al. Indole3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells // *Oncogene*. 2001. V. 20. P. 2927-2936.
214. Arakaki N., Toyofuku A., Emoto Y., Nagao T. et al. Induction of G(1) cell cycle arrest in human umbilical vein endothelial cells by flavone's inhibition of the extracellular signal regulated kinase cascade // *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*. 2004. V. 82. P. 583-588.
215. Regula K. M., Kirshenbaum L. A. p53 activates the mitochondrial death pathway and apoptosis of ventricular myocytes independent of de novo gene transcription // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2001. V. 33. P. 1435-1445.
216. Marchenko N. D., Moll U. M. The role of ubiquitination in the direct mitochondrial death program of p53 // *Cell Cycle*. 2007. V. 6. P. 1718-1723.
217. Fedorov S. N., Shubina L. K., Bode A. M., Stonik V. A. et al. Dactylone inhibits epidermal growth factor-induced transformation and phenotype expression of human cancer cells and induces G(1)-S arrest and apoptosis // *Cancer Research*. 2007. V. 67. P. 5914-5920.
218. Fedorov S. N., Bode A. M., Stonik V. A., Gorshkova I. A. et al. Marine alkaloid polycarpine and its synthetic derivative dimethylpolycarpine induce apoptosis in JB6 cells through p53-and caspase 3-dependent pathways // *Pharmaceutical Research*. 2004. V. 21. P. 2307-2319.
219. Xia Z. G., Dickens M., Raingeaud J., Davis R. J. et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis // *Science*. 1995. V. 270. P. 1326-1331.
220. Lewis T. S., Shapiro P. S., Ahn N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades // *Advances in Cancer Research, Vol 74*. 1998. V. 74. P. 49-139.
221. Oechsle K., Honecker F., Cheng T., Mayer F. et al. Preclinical and clinical activity of sunitinib in patients with cisplatin-refractory or multiply relapsed germ cell tumors: a Canadian Urologic Oncology Group/German Testicular Cancer Study Group cooperative study // *Annals of Oncology*. 2011. V. 22. P. 2654-2660.
222. Schweyer S., Soruri A., Meschter O., Heintze A. et al. Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation // *British Journal of Cancer*. 2004. V. 91. P. 589-598.
223. Mi L., Gan N., Cheema A., Dakshanamurthy S. et al. Cancer preventive isothiocyanates induce selective degradation of cellular alpha- and beta-tubulins by proteasomes // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. V. 284. P. 17039-17051.

224. Erdal H., Berndtsson M., Castro J., Brunk U. et al. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2005. V. 102. P. 192-197.
225. Canonico P. G., Bird J. W. C. The use of acridine orange as a lysosomal marker in rat skeletal muscle // *The Journal of Cell Biology*. 1969. V. 43. P. 367-371.
226. Geng Y., Kohli L., Klocke B. J., Roth K. A. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent // *Neuro Oncology*. 2010. V. 12. P. 473-481.
227. Seglen P. O., Gordon P. B. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1982. V. 79. P. 1889-1892.
228. Johansson A. C., Appelqvist H., Nilsson C., Kagedal K. et al. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization // *Apoptosis*. 2010. V. 15. P. 527-540.
229. Leist M., Jaattela M. Triggering of apoptosis by cathepsins // *Cell Death and Differentiation*. 2001. V. 8. P. 324-326.
230. Kroemer G., Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control // *Nature Reviews Cancer*. 2005. V. 5. P. 886-897.
231. Schotte P., Declercq W., Van Huffel S., Vandenabeele P. et al. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases // *FEBS Letters*. 1999. V. 442. P. 117-121.
232. Farrow J. M., Yang J. C., Evans C. P. Autophagy as a modulator and target in prostate cancer // *Nature Reviews Urology*. 2014. V. 11. P. 508-516.
233. Siddik Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance // *Oncogene*. 2003. V. 22. P. 7265-7279.
234. Dyshlovoy S. A., Venz S., Hauschild J., Tabakmakher K. M. et al. Anti-migratory activity of marine alkaloid monanchocidin A - proteomics-based discovery and confirmation // *Proteomics*. 2016. V. 16. P. 1590-1603.
235. Satelli A., Li S. L. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. V. 68. P. 3033-3046.
236. Vogel T., Guo N. H., Guy R., Drezlich N. et al. Apolipoprotein E: a potent inhibitor of endothelial and tumor cell proliferation // *Journal of Cellular Biochemistry*. 1994. V. 54. P. 299-308.
237. Pencheva N., Tran H., Buss C., Huh D. et al. Convergent Multi-miRNA Targeting of ApoE Drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis // *Cell*. 2012. V. 151. P. 1068-1082.

238. Ding L., Gao L.-J., Gu P.-Q., Guo S.-Y. et al. The role of eIF5A in epidermal growth factor-induced proliferation of corneal epithelial cell association with PI3K/Akt activation // *Molecular Vision*. 2011. V. 17. P. 16-22.
239. Lee N. P., Tsang F. H., Shek F. H., Mao M. et al. Prognostic significance and therapeutic potential of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in hepatocellular carcinoma // *International Journal of Cancer*. 2010. V. 127. P. 968-976.
240. Caraglia M., Tagliaferri P., Budillon A., Abbruzzese A. Post-translational modifications of eukaryotic initiation factor-5A (eIF-5A) as a new target for anti-cancer therapy // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1999. V. 472. P. 187-198.
241. Caraglia M., Marra M., Giuberti G., D'Alessandro A. M. et al. The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis // *Amino Acids*. 2001. V. 20. P. 91-104.
242. Hornbeck P. V., Zhang B., Murray B., Kornhauser J. M. et al. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations // *Nucleic Acids Research*. 2015. V. 43. P. D512-D520.
243. Dyshlovoy S. A., Naeth I., Venz S., Preukschas M. et al. Proteomic profiling of germ cell cancer cells treated with aaptamine, a marine alkaloid with antiproliferative activity // *Journal of Proteome Research*. 2012. V. 11. P. 2316-2330.
244. Sievert H., Pallmann N., Miller K. K., Hermans-Borgmeyer I. et al. A novel mouse model for inhibition of DOHH-mediated hypusine modification reveals a crucial function in embryonic development, proliferation and oncogenic transformation // *Disease Models & Mechanisms*. 2014. V. 7. P. 963-976.
245. Eriksson J. E., He T., Trejo-Skalli A. V., Harmala-Brasken A. S. et al. Specific *in vivo* phosphorylation sites determine the assembly dynamics of vimentin intermediate filaments // *Journal of Cell Science*. 2004. V. 117. P. 919-932.
246. Zhou T.-B. Signaling pathways of apoE and its role of gene expression in glomerulus diseases // *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2013. V. 33. P. 73-78.
247. Chan W. M., Ho Y. Y. Inhibition of cell proliferation by apolipoprotein E isoform expression // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006. V. 451. P. 97-102.
248. Zeleny M., Swertfeger D. K., Weisgraber K. H., Hui D. Y. Distinct apolipoprotein E isoform preference for inhibition of smooth muscle cell migration and proliferation // *Biochemistry*. 2002. V. 41. P. 11820-11823.
249. Chen Y.-C., Pohl G., Wang T.-L., Morin P. J. et al. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer // *Cancer Research*. 2005. V. 65. P. 331-337.

250. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B. M., Lindskog C. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome // *Science*. 2015. V. 347. P. 1260419.
251. Park M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) // *Journal of Biochemistry*. 2006. V. 139. P. 161-169.
252. Park M. H., Wolff E. C., Lee Y. B., Folk J. E. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase - inhibition of growth of chinese-hamster ovary cells by guanyl diamines // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. V. 269. P. 27827-27832.
253. Preukschas M., Hagel C., Schulte A., Weber K. et al. Expression of eukaryotic initiation factor 5A and hypusine forming enzymes in glioblastoma patient samples: implications for new targeted therapies // *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e43468.
254. Pallmann N., Braig M., Sievert H., Preukschas M. et al. Biological relevance and therapeutic potential of the hypusine modification system // *Journal of Biological Chemistry*. 2015. V. 290. P. 18343-18360.
255. Barna M., Pusic A., Zollo O., Costa M. et al. Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency // *Nature*. 2008. V. 456. P. 971-975.
256. Truitt M. L., Conn C. S., Shi Z., Pang X. et al. Differential requirements for eIF4E dose in normal development and cancer // *Cell*. 2015. V. 162. P. 59-71.
257. Jacobsen C., Honecker F. Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms // *Andrology*. 2014. V. 3. P. 111-121.
258. Beyer J., Albers P., Altena R., Aparicio J. et al. Maintaining success, reducing treatment burden, focusing on survivorship: highlights from the third European consensus conference on diagnosis and treatment of germ-cell cancer // *Annals of Oncology*. 2013. V. 24. P. 878-888.
259. Fedorov S., Ermakova S., Zvyagintseva T., Stonik V. Anticancer and cancer preventive properties of marine polysaccharides: some results and prospects // *Marine Drugs*. 2013. V. 11. P. 4876-4901.
260. Stonik V., Fedorov S. Marine low molecular weight natural products as potential cancer preventive compounds // *Marine Drugs*. 2014. V. 12. P. 636-671.
261. Kashman Y., Hirsh S., McConnell O. J., Ohtani I. et al. Ptilomycalin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin // *Journal of the American Chemical Society*. 1989. V. 111. P. 8925-8926.
262. Dyshlovoy S. A., Tabakmakher K. M., Hauschild J., Shchekaleva R. K. et al. Guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora pulchra* show cytotoxic properties and

prevent EGF-induced neoplastic transformation *in vitro* // *Marine Drugs*. 2016. V. 14. P. 133 [1-17].

263. Shaulian E., Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death // *Nature Cell Biology*. 2002. V. 4. P. E131-E136.

264. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. V. 270. P. 16483-16486.

265. Eferl R., Wagner E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis // *Nature Reviews Cancer*. 2003. V. 3. P. 859-868.

266. Dyshlovoy S. A., Fedorov S. N., Shubina L. K., Kuzmich A. S. et al. Aaptamines from the marine sponge *Aaptos* sp. display anticancer activities in human cancer cell lines and modulate AP-1-, NF-kappa B-, and p53-dependent transcriptional activity in mouse JB6 Cl41 cells // *Biomed Research International*. 2014. V. 2014. P. 1-7.

267. Ameyar M., Wisniewska M., Weitzman J. B. A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against // *Biochimie*. 2003. V. 85. P. 747-752.

268. Berry A., Goodwin M., Moran C. L., Chambers T. C. AP-1 activation and altered AP-1 composition in association with increased phosphorylation and expression of specific Jun and Fos family proteins induced by vinblastine in KB-3 cells // *Biochemical Pharmacology*. 2001. V. 62. P. 581-591.

269. Fan M., Goodwin M. E., Birrer M. J., Chambers T. C. The c-Jun NH(2)-terminal protein kinase/AP-1 pathway is required for efficient apoptosis induced by vinblastine // *Cancer Research*. 2001. V. 61. P. 4450-4458.

270. Gopalakrishnan A., Xu C. J., Nair S. S., Chen C. et al. Modulation of activator protein-1 (AP-1) and MAPK pathway by flavonoids in human prostate cancer PC3 cells // *Archives of Pharmacal Research*. 2006. V. 29. P. 633-644.

271. Lee S. H., Bahn J. H., Whitlock N. C., Baek S. J. Activating transcription factor 2 (ATF2) controls tolfenamic acid-induced ATF3 expression via MAP kinase pathways // *Oncogene*. 2010. V. 29. P. 5182-5192.

272. Kuzmich A. S., Fedorov S. N., Shastina V. V., Shubina L. K. et al. The anticancer activity of 3-and 10-bromofascaplysin is mediated by caspase-8,-9,-3-dependent apoptosis // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010. V. 18. P. 3834-3840.

273. Shubina L. K., Fedorov S. N., Radchenko O. S., Balaneva N. N. et al. Desmethylobiquinone Q2 from the Far-Eastern ascidian *Aplidium glabrum*: structure and synthesis // *Tetrahedron Letters*. 2005. V. 46. P. 559-562.

274. Fedorov S. N., Radchenko O. S., Shubina L. K., Balaneva N. N. et al. Evaluation of cancer-preventive activity and structure-activity relationships of 3-demethylobiquinone Q2,

isolated from the ascidian *Aplidium glabrum*, and its synthetic analogs // *Pharmaceutical Research*. 2006. V. 23. P. 70-81.

275. Kasibhatla S., Brunner T., Genestier L., Echeverri F. et al. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1 // *Molecular Cell*. 1998. V. 1. P. 543-551.

276. McKay B. C., Becerril C., Ljungman M. P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts // *Oncogene*. 2001. V. 20. P. 6805-6808.

277. Konstantakou E. G., Voutsinas G. E., Karkoulis P. K., Aravantinos G. et al. Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses // *International Journal of Oncology*. 2009. V. 35. P. 401-416.

278. Zamble D. B., Jacks T., Lippard S. J. p53-dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. V. 95. P. 6163-6168.

279. Dyshlovoy S. A., Menchinskaya E. S., Venz S., Rast S. et al. The marine triterpene glycoside frondoside A exhibits activity *in vitro* and *in vivo* in prostate cancer // *International Journal of Cancer*. 2016. V. 138. P. 2450-2465.

280. Pulukuri S. M., Gondi C. S., Lakka S. S., Jutla A. et al. RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity *in vivo* // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. V. 280. P. 36529-36540.

281. Li J., Yen C., Liaw D., Podsypanina K. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer // *Science*. 1997. V. 275. P. 1943-1947.

282. Marchiani S., Tamburrino L., Nesi G., Paglierani M. et al. Androgen-responsive and -unresponsive prostate cancer cell lines respond differently to stimuli inducing neuroendocrine differentiation // *International Journal of Andrology*. 2010. V. 33. P. 784-793.

283. Kao C. H. J., S. B. K., Han D. Y., Murray P. M. et al. A comparison of the gene expression profiles and pathway network analyses after treatment of prostate cancer cell lines with different *Ganoderma lucidum* based extracts // *Journal of Functional Foods in Health and Disease* 2014. V. 4. P. 182-207.

284. Xiong Y., Hannon G. J., Zhang H., Casso D. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases // *Nature*. 1993. V. 366. P. 701-704.

285. Ouyang D. Y., Xu L. H., He X. H., Zhang Y. T. et al. Autophagy is differentially induced in prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via distinct splicing profiles of ATG5 // *Autophagy*. 2013. V. 9. P. 20-32.
286. Shacka J. J., Klocke B. J., Shibata M., Uchiyama Y. et al. Bafilomycin A1 inhibits chloroquine-induced death of cerebellar granule neurons // *Molecular Pharmacology*. 2006. V. 69. P. 1125-1136.
287. Kallifatidis G., Hoepfner D., Jaeg T., Guzman E. A. et al. The marine natural product manzamine A targets vacuolar ATPases and inhibits autophagy in pancreatic cancer cells // *Marine Drugs*. 2013. V. 11. P. 3500-3516.
288. Garbis S., Lubec G., Fountoulakis M. Limitations of current proteomics technologies // *Journal of Chromatography A*. 2005. V. 1077. P. 1-18.
289. Aminin D. L., Koy C., Dmitrenok P. S., Muller-Hilke B. et al. Immunomodulatory effects of holothurian triterpene glycosides on mammalian splenocytes determined by mass spectrometric proteome analysis // *Journal of Proteomics*. 2009. V. 72. P. 886-906.
290. Aminin D. L., Agafonova I. G., Kalinin V. I., Silchenko A. S. et al. Immunomodulatory properties of frondoside A, a major triterpene glycoside from the North Atlantic commercially harvested sea cucumber *Cucumaria frondosa* // *Journal of Medicinal Food*. 2008. V. 11. P. 443-453.
291. Ueda K., Cardarelli C., Gottesman M. M., Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987. V. 84. P. 3004-3008.
292. Darshan M. S., Loftus M. S., Thadani-Mulero M., Levy B. P. et al. Taxane-induced blockade to nuclear accumulation of the androgen receptor predicts clinical responses in metastatic prostate cancer // *Cancer Research*. 2011. V. 71. P. 6019-6029.
293. Antonarakis E. S., Lu C., Wang H., Luber B. et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer // *New England Journal of Medicine*. 2014. V. 371. P. 1028-1038.
294. Friedlander R. M., Gagliardini V., Rotello R. J., Yuan J. Functional role of interleukin 1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis // *The Journal of Experimental Medicine*. 1996. V. 184. P. 717-724.
295. Tosello-Trampont A. C., Brugnera E., Ravichandran K. S. Evidence for a conserved role for CRKII and Rac in engulfment of apoptotic cells // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. V. 276. P. 13797-13802.

296. Nalla A. K., Gorantla B., Gondi C. S., Lakka S. S. et al. Targeting MMP-9, uPAR, and cathepsin B inhibits invasion, migration and activates apoptosis in prostate cancer cells // *Cancer Gene Therapy*. 2010. V. 17. P. 599-613.
297. Okada H., Tsubura A., Okamura A., Senzaki H. et al. Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma // *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*. 1992. V. 421. P. 157-161.
298. Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers // *Oncogene*. 2011. V. 30. P. 127-138.
299. Dyshlovoy S. A., Madanchi R., Hauschild J., Otte K. et al. The marine triterpene glycoside frondoside A induces p53-independent apoptosis and inhibits autophagy in urothelial carcinoma cells // *BMC Cancer*. 2017. V. 17. P. 93 [1-10].
300. Bamford S., Dawson E., Forbes S., Clements J. et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website // *British Journal of Cancer*. 2004. V. 91. P. 355-358.
301. Otto K. B., Acharya S. S., Robinson V. L. Stress-activated kinase pathway alteration is a frequent event in bladder cancer // *Urologic Oncology*. 2012. V. 30. P. 415-420.
302. Grieco L., Calzone L., Bernard-Pierrot I., Radvanyi F. et al. Integrative modelling of the influence of MAPK network on cancer cell fate decision // *PLOS Computational Biology*. 2013. V. 9. P. e1003286.
303. Ojha R., Singh S. K., Bhattacharyya S., Dhanda R. S. et al. Inhibition of grade dependent autophagy in urothelial carcinoma increases cell death under nutritional limiting condition and potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agent // *Journal of Urology*. 2014. V. 191. P. 1889-1898.
304. Sui X., Chen R., Wang Z., Huang Z. et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment // *Cell Death & Disease*. 2013. V. 4. P. e838.
305. Liu J., Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword // *Cell Research*. 2005. V. 15. P. 36-42.
306. Dyshlovoy S., Rast S., Hauschild J., Otte K. et al. Frondoside A induces AIF-associated caspase-independent apoptosis in Burkitt's lymphoma cells // *Leukemia & Lymphoma*. 2017. P. [1-11] doi: 10.1080/10428194.2017.1317091.
307. Zyada M. M. Relationship of survivin to clinical drug resistance in Burkitt's lymphoma of the head and neck region // *Medical Oncology*. 2011. V. 28. P. 1565-1569.
308. Li X., Fang P., Mai J., Choi E. T. et al. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers // *Journal of Hematology & Oncology*. 2013. V. 6. P. 19.

309. Nagy N., Takahara M., Nishikawa J., Bourdon J. C. et al. Wild-type p53 activates SAP expression in lymphoid cells // *Oncogene*. 2004. V. 23. P. 8563-8570.
310. O'Connor P. M., Jackman J., Jondle D., Bhatia K. et al. Role of the p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines // *Cancer Research*. 1993. V. 53. P. 4776-4780.
311. Farrell P. J., Allan G. J., Shanahan F., Vousden K. H. et al. p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines // *The EMBO Journal*. 1991. V. 10. P. 2879-2887.
312. Komarov P. G., Komarova E. A., Kondratov R. V., Christov-Tselkov K. et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy // *Science*. 1999. V. 285. P. 1733-1737.
313. Chipuk J. E., Green D. R. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? // *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology*. 2005. V. 6. P. 268-275.
314. Amaravadi R. K., Yu D., Lum J. J., Bui T. et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma // *Journal of Clinical Investigation*. V. 117. P. 326-336.
315. Prevarskaya N., Skryma R., Bidaux G., Flourakis M. et al. Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells // *Cell Death & Differentiation*. 2007. V. 14. P. 1295-1304.
316. Hartung F., Stuhmer W., Pardo L. A. Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of K(V)10.1 via bifunctional TRAIL antibody // *Molecular Cancer*. 2011. V. 10. P. 109.
317. Ji N., Li J., Wei Z., Kong F. et al. Effect of celastrol on growth inhibition of prostate cancer cells through the regulation of hERG channel *in vitro* // *Biomed Res Int*. 2015. V. 2015. P. 308475.
318. Patanè S. HERG-targeted therapy in both cancer and cardiovascular system with cardiovascular drugs // *International Journal of Cardiology*. 2014. V. 3. P. 1082-1085.
319. Nguyen H., Yang J., Kung H., Shi X. et al. Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model // *Oncogene*. 2014. V. 33. P. 4521-4530.
320. Abdul M., Hoosein N. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer // *Cancer Letters*. 2002. V. 186. P. 99-105.
321. Teplova V. V., Tonshin A. A., Grigoriev P. A., Saris N.-E. L. et al. Bafilomycin A1 is a potassium ionophore that impairs mitochondrial functions // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2007. V. 39. P. 321-329.

322. Rodríguez-Berriguete G., Fraile B., Martínez-Onsurbe P., Olmedilla G. et al. MAP Kinases and Prostate Cancer // *Journal of Signal Transduction*. 2012. V. 2012. P. 9.
323. Samatar A. A., Poulikakos P. I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges // *Nat Rev Drug Discov*. 2014. V. 13. P. 928-942.
324. Ohori M., Kinoshita T., Okubo M., Sato K. et al. Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005. V. 336. P. 357-63.
325. Dyshlovoy S., Otte K., Hauschild J., Venz S. et al. Marine compound rhizochalinin shows high anticancer activity in castration resistant and AR-V7 positive prostate cancer cell lines // *Oncology Research and Treatment*. 2015. V. 38. P. 265-266.
326. Mistry S. J., Bank A., Atweh G. F. Targeting stathmin in prostate cancer // *Mol Cancer Ther*. 2005. V. 4. P. 1821-9.
327. Nishikawa R., Goto Y., Sakamoto S., Chiyomaru T. et al. Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting of LASP1 in prostate cancer // *Cancer Science*. 2014. V. 105. P. 802-811.
328. Hailer A., Grunewald T. G. P., Orth M., Reiss C. et al. Loss of tumor suppressor mir-203 mediates overexpression of LIM and SH3 Protein 1 (LASP1) in high-risk prostate cancer thereby increasing cell proliferation and migration // *Oncotarget*. 2014. V. 5. P. 4144-4153.
329. Mistry S. J., Atweh G. F. Therapeutic interactions between stathmin inhibition and chemotherapeutic agents in prostate cancer // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006. V. 5. P. 3248-3257.
330. Kottke T., Sanchez-Perez L., Diaz R. M., Thompson J. et al. Induction of hsp70-mediated Th17 autoimmunity can be exploited as immunotherapy for metastatic prostate cancer // *Cancer Research*. 2007. V. 67. P. 11970-9.
331. Gong J., Theriault J., Calderwood S. Hsp70-based anticancer vaccines: chaperoning the immune response // *Heat shock proteins in cancer* / Calderwood S. и др. Springer Netherlands, 2007. P. 367-382.
332. Gioeli D., Wunderlich W., Sebolt-Leopold J., Bekiranov S. et al. Compensatory pathways induced by MEK inhibition are effective drug targets for combination therapy against castration resistant prostate cancer // *Molecular Cancer Therapeutics*. 2011. V. 10. P. 1581-1590.
333. Smalley K. S. M., Sondak V. K. Inhibition of BRAF and MEK in BRAF-mutant melanoma // *The Lancet*. V. 386. P. 410-412.

334. Li Y., Chan S. C., Brand L. J., Hwang T. H. et al. Androgen Receptor Splice Variants Mediate Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer Cell Lines // *Cancer Research*. 2013. V. 73. P. 483-489.
335. Barltrop J. A., Owen T. C., Cory A. H., Cory J. G. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1991. V. 1. P. 611-614.
336. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. V. 72. P. 248-254.
337. Junker H., Venz S., Zimmermann U., Thiele A. et al. Stage-related alterations in renal cell carcinoma - comprehensive quantitative analysis by 2D-DIGE and protein network analysis // *PloS One*. 2011. V. 6. P. e21867.
338. Sievert H., Venz S., Platas-Barradas O., Dhople V. M. et al. Protein-protein-interaction network organization of the hypusine modification system // *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012. V. 11. P. 1289-305.
339. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M. C., Grignani F. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry // *Journal of Immunological Methods*. 1991. V. 139. P. 271-279.
340. Thomas P. D., Kejariwal A., Campbell M. J., Mi H. Y. et al. PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification // *Nucleic Acids Research*. 2003. V. 31. P. 334-341.
341. Kato T., Natsume A., Toda H., Iwamizu H. et al. Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells // *Gene Therapy*. 2010. V. 17. P. 1363-1371.