

на правах рукописи

ФРОЛОВА ТАТЬЯНА СЕРГЕЕВНА

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ТРИТЕРПЕНОВЫХ КИСЛОТ УРСАНОВОГО РЯДА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в секторе мутагенеза и репарации Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Синицына Ольга Ивановна**
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Рыкова Елена Юрьевна**
доктор биологических наук,
с. н. с. лаборатории молекулярной
медицины ИХФБМ СО РАН

Дмитрий Николаевич Щербаков
кандидат биологических наук,
зав. лабораторией иммунохимии
ФБУН ГЦН ВБ «Вектор».

Ведущее учреждение: **ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург**

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 года на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 на базе ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН), в конференц-зале Института по адресу: пр. Лаврентьева, 10, г. Новосибирск, 630090. Тел.: (383)363-49-06, факс: (383)333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Тритерпеновые соединения являются одним из самых больших классов природных соединений, в настоящий момент их описано более 20 000 [Liby, Yore, Sporn, 2007]. Наивысшее их содержание отмечается в восковом и кутикулярном слое плодов, листьев и стеблей [Laszczyk, 2009; Rabi, Bishayee, 2009].

Сейчас наибольшее внимание привлекают тритерпеноиды, обладающие избирательной токсичностью против раковых клеток [Laszczyk, 2009]. Большое число тритерпеновых производных синтезировано структурными модификациями природных молекул с целью оптимизации их действия, и некоторые из этих полусинтетических аналогов считаются самыми мощными противовоспалительными и противораковыми тритерпеноидами [Liby, Yore, Sporn, 2007]. Несмотря на огромное количество публикаций, касающихся избирательной цитотоксичности тритерпеноидов и их производных, механизм наблюдаемого эффекта все еще недостаточно изучен. Так, до сих пор не предложена конкретная мишень для связывания с тритерпенами.

Помимо биологической активности тритерпеновых кислот урсанового ряда, в данной работе исследован химический состав лекарственного растения – иван-чая узколистного (*Chamaenerion angustifolium*). Имеющиеся ранее сведения преимущественно описывали полярные водо- и спирторастворимые вещества [Королёва, Красноборов, Пеньковская, 1973; Hiermann, Vucar, 1997]. Состав липофильных компонентов иван-чая практически не изучен, хотя имеется ряд сведений о составе моно- [Полежаева, 2007] и тритерпеноидов [Glen et al., 1967], среди которых идентифицированы урсоловая, олеаноловая, маслиновая и коросоловая кислоты [Буданцев, 2009]. Данные получены преимущественно в середине прошлого века и приведены без количественных характеристик.

Учитывая, что в условиях Западной Сибири иван-чай узколистный накапливает существенную биомассу, он может являться весьма перспективным источником тритерпеновых кислот для фармацевтической промышленности. В данной работе подробно изучена фракция липофильных компонентов, содержащая целевые соединения, в том числе динамика их накопления в течение периода вегетации. Все тритерпеновые кислоты, использованные в работе, выделены из

сырья иван-чая узколистного.

Еще один аспект научной новизны заключается в разработке способа включения флюоресцентной метки в молекулу тритерпеновых кислот. Раньше присоединение флюорофоров применялось только для белков, сейчас же начинают появляться работы, где флюоресцентное мечение используется и для небольших, сопоставимых по размеру биоактивных молекул: фруктозы, вортманнина, азатилонов [Levi et al., 2007; Barnes et al., 2008; Gertsche et al., 2009]. В данной работе впервые предлагается новый подход, основанный на флюоресцентном мечении тритерпеновых кислот флюоресцеинизотиоцианатом (FITC). В качестве модельного соединения была взята самая распространенная в урсановом ряду урсоловая кислота, она же является наиболее изученной, что позволит сопоставить полученные в ходе исследования результаты с имеющимися литературными данными и оценить валидность предложенной методики.

Цели и задачи

Цель работы: изучить цитотоксические свойства урсоловой и помоловой кислот и предложить механизм наблюдаемого эффекта.

Задачи исследования:

- 1) Выделить из растительного сырья иван-чая узколистного (*S. angustifolium*) образцы урсоловой и помоловой кислот.
- 2) Изучить биологическую активность помоловой кислоты в бактериальных и эукариотических тест-системах.
- 3) Предложить возможный механизм цитотоксического эффекта тритерпеновых кислот урсанового ряда.
- 4) Разработать методику по включению флюоресцентной метки в молекулу тритерпеновых кислот и исследовать цитотоксические свойства полученных эпимеров для проверки предлагаемого механизма.

Научная новизна

Подробно изучен химический состав липофильных компонентов иван-чая узколистного на сырье трех лет сбора. Выявлены соединения, являющиеся перспективными для промышленной наработки, установлена динамика накопления экстрактивных веществ. Впервые обнаружено 6 тритерпеновых соединений в составе кислой фракции.

Полученный образец помоловой кислоты впервые был протестирован с помощью микробиологических тест-систем на наличие мутагенных, генотоксических и защитных свойств. Проверены цитотоксические свойства на панели онкотрансформированных клеточных линий, позволяющей установить зависимость между цитотоксичностью и способностью тритерпеновых кислот вызывать апоптоз p53-зависимым и независимым путем.

С помощью компьютерного моделирования предложены мишени для связывания тритерпеновых кислот в онкотрансформированных клетках. Предложен новый подход для исследования проникновения и распределения тритерпеновых кислот урсанового ряда с использованием флюоресцентной метки. Проведен синтез по получению эпимеров меченой урсоловой кислоты, исследованы ее цитотоксические свойства и распределение в малигнизированных клетках.

Научно-практическая ценность

В процессе исследования липофильных компонентов иван-чая узколистного показано, что по содержанию тритерпеновых кислот он может являться перспективным источником их наработки для фармацевтической промышленности в условиях Западной Сибири.

Предложенная модель по флюоресцентному мечению может быть экстраполирована на другие пентациклические тритерпеновые кислоты урсанового ряда при изучении механизма их цитотоксического эффекта. Полученные результаты помогут расширить представления о механизме противоопухолевого действия и подтвердить уже существующие модели, объясняющие данный эффект для тритерпеновых кислот.

Личный вклад автора

Вклад соискателя заключается в планировании, проведении и анализе экспериментов, статистической обработке полученных результатов. Автором в полном объеме выполнена экспериментальная часть исследования: заготовка растительного сырья, выделение и очистка целевых соединений, разработка способа и синтез по включению флюоресцентной метки, проведение микробиологических и культуральных экспериментов, микроскопические исследования культур и компьютерное моделирование.

Основные положения, выносимые на защиту

1) Иван-чай узколистый (*C. angustifolium*) как природный источник помоловой кислоты, перспективен для промышленного использования.

2) Помоловая кислота генетически безопасна и обладает защитными свойствами против мутагенов 4-нитрохинолин-1-оксида и трет-бутил-гидропероксида.

3) Помоловая кислота обладает избирательным цитотоксическим эффектом на онкотрансформированные клетки, индуцируя в них апоптоз.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 работ, включая 6 статей в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора и кандидата наук».

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях: 1-ом Международном симпозиуме по вторичным метаболитам (Турция, г. Денизли, 2011); V Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья» (г. Барнаул, 2012); 4-ой Российско-Корейской конференции «Современные достижения химии биологически активных веществ и биотехнологии» (г. Новосибирск, 2012); 1-ой Международной научной конференции «Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы» (г. Новосибирск, 2013), 38-ом конгрессе FEBS (г. Санкт-Петербург, 2013), 6-ой Российско-Корейской конференции «Современные достижения химии биологически активных веществ и биотехнологии» (г. Новосибирск, 2015), IX Всероссийской научной конференции с международным участием «Химия и технология растительных веществ» (г. Москва, 2015), XX Менделеевском съезде (г. Екатеринбург, 2016).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Работа изложена на 112 страницах машинописи, иллюстрирована 56 рисунками. Список литературы содержит 292 источника, из них 10 отечественных и 282

зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение тритерпеновых кислот

В рамках данной работы сырье лекарственного растения *C. angustifolium* заготавливалось в течение 3 лет дважды за период вегетации. Образцы высушивались в мягких условиях, затем экстрагировались метил-*трет*-бутиловым эфиром для получения суммарного экстракта, из которого экстракцией водно-спиртовым раствором щелочи выделялась фракция свободных кислот, обогащенная тритерпеновыми соединениями. Очистка урсоловой и помоловой кислот осуществлялась с помощью колоночной хроматографии до чистоты не менее 96% (по данным хромато-масс-спектрометрического анализа).

Проверка потенциальной мутагенности и генотоксичности помоловой кислоты выполнена с помощью стандартных бактериальных тест-систем: теста Эймса [Maron, Ames, 1983] и SOS-хроматеста [Quillardet, Hofnung, 1985]. Цитотоксическая активность исследовалась в МТТ-тесте [Mosmann, 1983] на линиях MCF-7, U87, НСТ116 (p53+/+), НСТ116 (p53-/-) и лимфоцитах, выделенных из крови здоровых людей. Микроскопическое исследование проводилось для исследования морфологических изменений клеток после обработки помоловой кислотой. Исследование апоптотической активности тритерпеновых кислот проводилось методом проточной цитофлюориметрии с помощью двойного окрашивания FITC и пропидий йодидом.

Выявление потенциальных мишеней для исследуемых соединений и возможность сохранения связывания с ними после введения FITC в урсоловую кислоту осуществлялось с помощью молекулярного докинга. Были проверены белки внешнего сигнального пути индукции апоптоза, выявлено 2 кандидата: протеинкиназа В (Akt1) и E3-убиквитин-протеин-лигаза (MDM2).

Для исследования проникновения и внутриклеточного распределения урсоловой кислоты к ее молекуле был присоединен FITC: предварительно в положении C(3) тритерпенового остова гидроксильная группа была замещена аминогруппой по методике Брискорна [Brieskorn, Eschelbach, 1979]. Наличие аминогруппы позволило легко ввести FITC в молекулу урсоловой кислотой. Строение продуктов на всех этапах синтеза охарактеризовано с помощью ЯМР-анализа. Для amino-урсановой кислоты измерена температура плавления, состав меченых эпимеров подтвержден элементным

анализом.

Цитотоксичность полученных эпимеров оценивалась в МТТ-тесте, проапоптотические свойства исследованы с помощью двойного окрашивания акридиновым оранжевым и бромистым этидием [Kasibhatla et al.], проникновение в клетку и распределение внутри отслеживалось с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии с дополнительным окрашиванием DAPI, CellMask Orange и MitoTracker Red.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью хромато-масс-спектрометрического анализа был изучен химический состав лекарственного растения *C. angustifolium*. Впервые обнаружено 6 тритерпеновых кислот. Была разработана и усовершенствована методика выделения урсоловой и помоловой кислот (рис. 1) из сырья в чистом виде. Помимо этого, была изучена динамика накопления тритерпеновых кислот: показано, что к концу периода вегетации их содержание достигает максимума. Исследовано распределение тритерпеновых кислот по вегетативным органам *C. angustifolium*: урсоловая и олеаноловая кислоты накапливаются преимущественно в листьях, а помоловая – в стеблях.

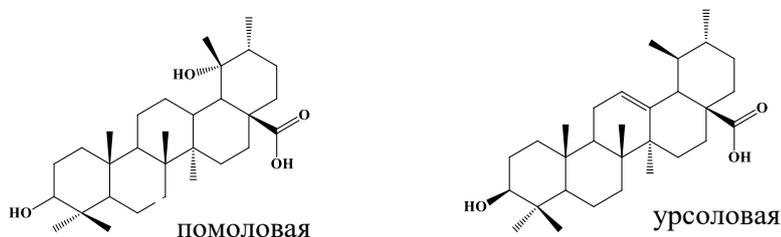


Рис. 1. Тритерпеновые кислоты урсанового ряда.

Впервые с помощью бактериальных тест-систем, SOS-хромотеста и теста Эймса, показано отсутствие генотоксических и мутагенных свойств у помоловой кислоты, выделенной из растительного сырья в чистом виде (96%). В тесте Эймса были исследованы защитные свойства помоловой кислоты: она существенно снижала мутагенный эффект NQO, но еще более выраженный защитный эффект она проявила как антиоксидант в тестах с t-BuO₂H.

Табл. 1. Показатель цитотоксичности помоловой кислоты (IC_{50}).

| Клеточная линия | IC_{50} , мкМ |
|-----------------------------|-----------------|
| контроль (лимфоциты) | 158 |
| MCF-7 | 23.38 |
| U87 | 33.82 |
| HCT116 (p53+/+) | 35.82 |
| HCT116 (p53-/-) | 9.95 |
| первичная культура (глиома) | 31.24 |

Впервые исследованы цитотоксические свойства помоловой кислоты на онкотрансформированных клеточных линиях H1299 (рак легкого), U87 (глиома), HCT116 (рак толстой кишки, p53+/+ и p53-/-). Полученные данные на линии MCF-7 (рак молочной железы) хорошо согласуются с литературными [Youn et al., 2012]. Также показано, что помоловая кислота ингибирует рост клеток первичной глиомной культуры. В качестве контрольной линии использованы лимфоциты, для них токсичность была существенно ниже. Результаты в табл. 1.

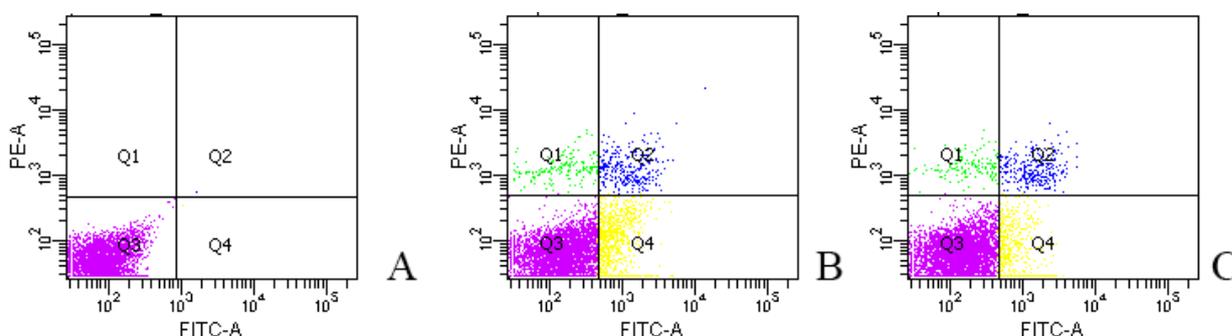


Рис. 2. Исследование стадий апоптоза клеток линии U87 с помощью проточной цитофлуориметрии после обработки помоловой кислотой в концентрации 50 мкМ: А) контроль, обработка ДМСО; В) и С) – обработка помоловой кислотой в течение 24 и 48 ч соответственно. Q1 – некроз, Q2 – поздний апоптоз, Q3 – живые клетки, Q4 – ранний апоптоз.

Табл. 2. Исследование стадий апоптоза клеток линии U-87 MG с помощью проточной цитофлуориметрии после обработки помоловой кислотой в концентрации 50 мкМ (% клеточной популяции)

| Время, ч | Нормальные клетки | Ранний апоптоз | Поздний апоптоз | Некроз |
|----------|-------------------|----------------|-----------------|---------|
| ДМСО | 90.2±3.3 | 3.2±1.1 | 1.6±0.7 | 5.0±1.8 |
| 24 | 87.4±5.1 | 8.2±2.5* | 3.0±1.2 | 1.5±0.7 |
| 48 | 84.1±2.7 | 11.2±3.7* | 2.9±1.2 | 1.8±0.8 |

*p-value ≤0.01

Был исследован проапоптотический эффект помоловой кислоты на глиомной линии U87, так как запуск апоптоза является основным механизмом цитотоксического действия тритерпеновых кислот. Показано, что помоловая кислота достоверно увеличивает долю клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза (рис. 2, табл. 2)

Микроскопический анализ клеток, обработанных помоловой кислотой, выявил разницу между линиями с наличием гена p53 и его отсутствием (рис. 3). Учитывая данные МТТ-теста и проточной цитофлуориметрии, можно предположить, что ингибирующий эффект данного соединения осуществляется несколькими путями. Выявленная вакуоляризация обработанных клеток, нехарактерная для апоптоза, свидетельствует, что гибель может происходить в результате параптоза.

В литературных данных имеется не так много информации о механизмах противоракового действия помоловой кислоты, так как источников ее выработки очень мало, ее содержание по сравнению с другими тритерпеновыми кислотами невелико, что существенно затрудняет процесс очистки.

НСТ116 (p53+/+)

Н1299 (p53-/-)

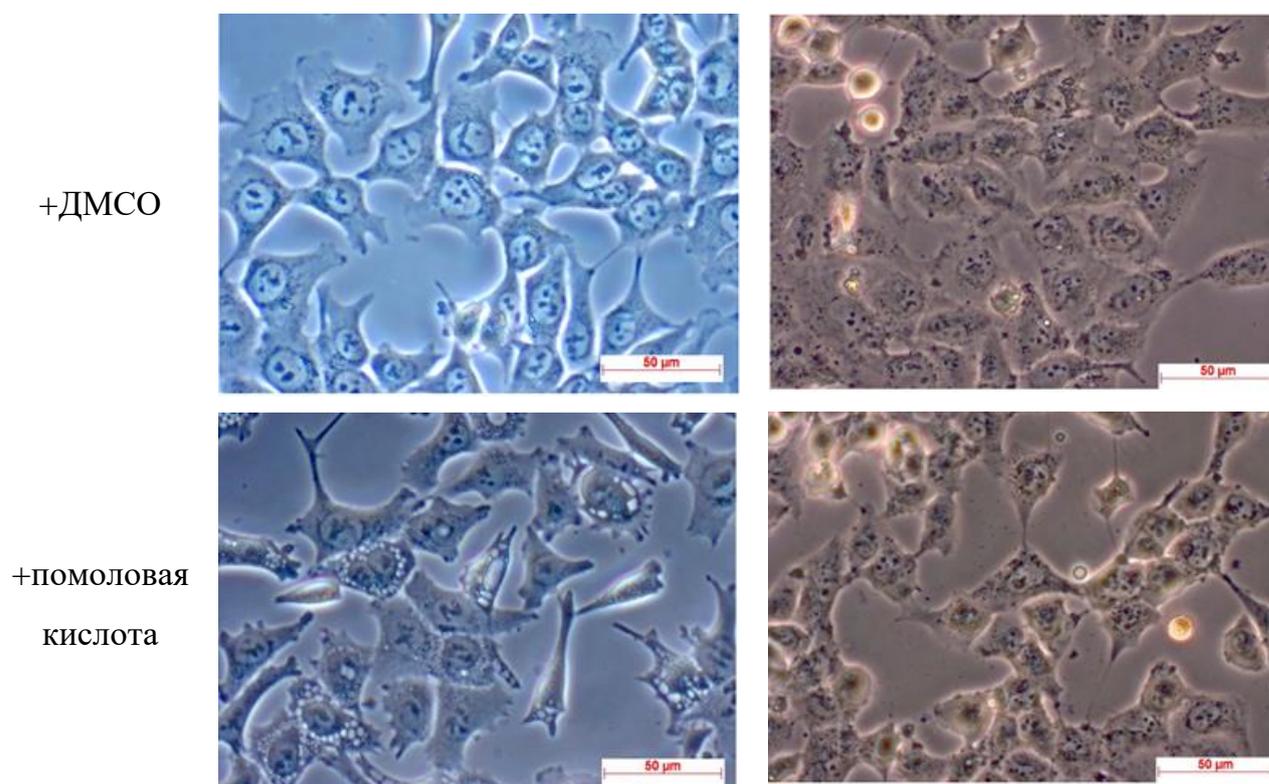


Рис. 3. Исследование изменений клеточной морфологии после обработки помоловой кислотой в концентрации 10 мкМ.

На данный момент основным способом ингибирования роста раковых клеток считается запуск апоптоза, причем как внешним сигнальным путем, так и митохондриальным [Yoo et al., 2012; Youn et al., 2012]. Помимо индукции апоптоза, на клетках линии MCF-7 показано, что помоловая кислота способна активировать АМФ-зависимую протеинкиназу [Youn et al., 2012], фермент, контролирующий рост и развитие клеток, а также являющийся супрессором опухолей [Luo, Zang, Guo, 2010]. В этом же исследовании [Youn et al., 2012] экспериментальным путем установлена способность помоловой кислоты вызывать арест клеточного цикла на стадии G1, увеличивать уровень мРНК таких проапоптотических генов, как p53 и p21. Следует отметить, что множественная лекарственная устойчивость, обусловленная повышенным синтезом антиапоптотических белков Bcl-2 или Bcl-xL, преодолевается помоловой кислотой за счет активации каспазы-3, -9 и нарушении целостности митохондриальной мембраны [Fernandes et al., 2007].

Для тритерпеновых кислот отсутствуют данные об индукции параптоза, но они описаны для другого тритерпена – целастрола, который способен вызывать

разные типы клеточной смерти, в том числе параптоз [Yoon et al., 2014]. Общие модели, описывающие четкий механизм параптоза, на данный момент отсутствуют, поэтому предполагать возможные пути в этой конкретной ситуации довольно сложно.

Таким образом, полученные в рамках данной работы результаты коррелируют с уже имеющимися сведениями о противораковой активности помоловой кислоты, дополняют и подтверждают их.

Урсоловая и помоловая кислоты похожи не только структурно, их биологическая активность во многом пересекается. Согласно литературным данным, при индукции апоптоза малыми биологически активными молекулами, в том числе тритерпеновыми кислотами, через внешний сигнальный путь потенциальными мишенями могут быть протеинкиназа B или Akt1 [Kashyap, Tuli, Sharma, 2016; Li, Liang, Yang, 2012], а также убиквитин-лигаза MDM2 [Lee et al., 2014; Vassilev et al., 2004]. Более того, Akt1 и MDM2 как мишени для урсоловой кислоты ранее были предсказаны с использованием альтернативных биоинформатических методов [He et al., 2015]. Было оценено взаимодействие между урсоловой и помоловой кислотами с Akt1 и MDM2, используя молекулярное моделирование (табл. 3).

Для теоретического обоснования идеи, что после введения метки FITC связывание урсановых тритерпеновых кислот сохранится, был проведен молекулярный докинг, позволяющий оценить энергию связывания белковой макромолекулы с потенциальным лигандом и сделать вывод о наличии или отсутствии взаимодействия. Энергии связывания меченых эпимеров урсановой кислоты с Akt1 и MDM2 представлены в табл. 4.

Табл. 3. Расчетные энергии связывания урсоловой и помоловой кислот с Akt1 и MDM2, полученные в AutoDock Vina.

| Лиганд | Энергия связывания, ккал/моль | |
|-------------|-------------------------------|------|
| | Akt1 | MDM2 |
| Референсный | -8.7 | -8.3 |
| урсоловая | -8.9 | -8.1 |

| | | |
|-----------|------|------|
| помоловая | -8.6 | -8.0 |
|-----------|------|------|

Табл. 4. Расчетные энергии связывания эпимеров урсоловой кислоты, меченных FITC, с Akt1 и MDM2, полученные в AutoDock Vina.

| Лиганд | Энергия связывания, ккал/моль | |
|------------------|-------------------------------|------|
| | Akt1 | MDM2 |
| Референсный | -8.8 | -8.8 |
| α -эпимер | -10.4 | -7.4 |
| β -эпимер | -9.7 | -8.9 |

Был проведен синтез по введению флуоресцентной метки FITC в молекулу урсоловой кислоты. Структура полученных эпимеров подтверждена ЯМР- и элементным анализом (рис. 4).

Исследование цитотоксических и проапоптотических свойств меченой урсоловой кислоты показало ее более высокую токсичность за счет усиления индукции апоптоза (табл. 5).

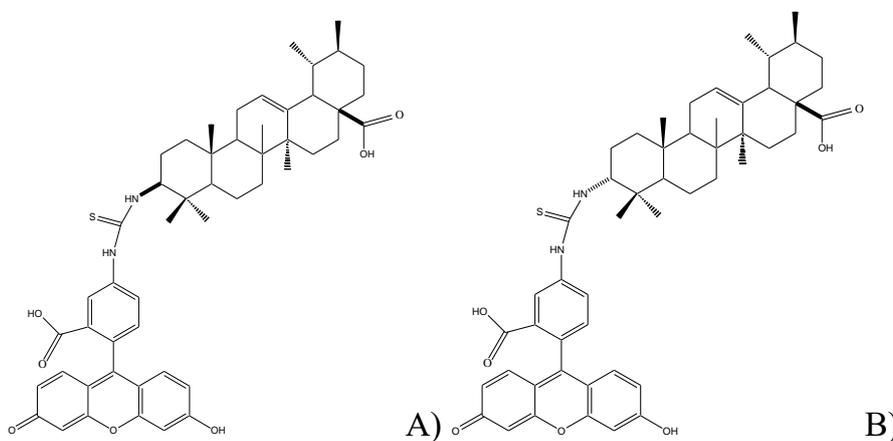


Рис. 4. Эпимеры меченой урсоловой: А) α -эпимер; В) β -эпимер.

Табл. 5. Детекция апоптоза с помощью окрашивания бромитсым этидием и акридиновым оранжевым на клетках линии MCF-7 после обработки меченой урсоловой кислотой

| |
|------|
| 24 ч |
|------|

| | живые | апоптоз | некроз |
|------------|-----------|----------|---------|
| контроль | 96.8±5.0 | 1.6±0.1 | 1.6±0.3 |
| урсоловая | 87.7±11.1 | 10.5±2.0 | 1.8±0.2 |
| урсоловая* | 70.6±10 | 26.5±5.3 | 2.9±0.3 |
| 48 ч | | | |
| контроль | 97.4±6.2 | 1.3±0.2 | 1.3±0.2 |
| урсоловая | 78.7±12.3 | 16.4±3.1 | 4.9±0.6 |
| урсоловая* | 69.5±8.8 | 25.6±4.3 | 4.9±0.7 |

Имеются экспериментальные данные, подтверждающие влияние урсоловой кислоты на Akt1 и MDM2 [Li, Liang, Yang, 2012; Zhang et al., 2016]. В клетке Akt1 локализуется преимущественно на внутренних мембранах [Dufner et al., 1999], а MDM2 – в ядрышках [Lohrum et al., 2000; Yang et al., 2013].

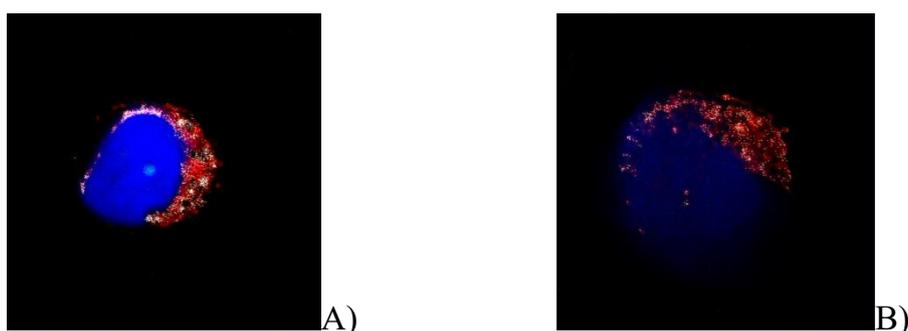


Рис. 5. Совместная локализация сигналов эпимеров урсоловой кислоты на клетках линии MCF-7. Белым цветом помечено перекрытие сигналов от меченой урсоловой кислоты и: А) CellMask Orange (внутренние мембраны); В) MitoTracker Red (митохондрии). Ядра окрашены DAPI.

Эксперимент по отслеживанию динамики проникновения и распределения меченой урсоловой кислоты показал, что после проникновения в клетку она изначально локализуется на внутренних мембранах (рис. 5), где и находится предполагаемая мишень Akt1 – белок, ингибирующий апоптоз. Инактивация Akt1 урсоловой кислотой может вызывать апоптоз в раковых клетках, который сопровождается нарушением целостности митохондриальных мембран и клеточного ядра. Сигнал в митохондриях спустя 18 ч после обработки может

свидетельствовать об их проницаемости для меченой урсоловой кислоты в силу начинающихся апоптотических изменений в клетке. Однако это предположение не исключает, что на мембранах митохондрий могут быть свои мишени для исследуемого соединения, которые не рассматриваются в данной работе. Наблюдаемое проникновение метки в ядро спустя 24 ч может быть интерпретировано как нарушение целостности ядерной мембраны, наблюдаемое при апоптоза. Не обнаружено локализации меченой урсоловой кислоты, характерной при связывании с ядрышками: сигнал равномерно распределен в области ядра, что косвенно свидетельствует об отсутствии взаимодействия меченой урсоловой кислоты с MDM2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизма цитотоксического действия природных соединений актуально не только для дальнейшей разработки новых препаратов, но и принципиально новых стратегий в борьбе с онкологическими заболеваниями.

В рамках данной работы была выделена в чистом виде помоловая кислота, соединение с перспективными противораковыми свойствами. При этом в условиях Западной Сибири обнаружен ее источник с содержанием, сопоставимым с промышленным – иван-чай узколистый (*C. angustifolium*), что делает его весьма привлекательной культурой для фармакологической промышленности.

Исследована биологическая активность помоловой кислоты в бактериальных и эукариотических тест-системах. Показано, что при отсутствии негативных свойств на про- или эукариотические нормальные клетки, помоловая кислота обладает достаточно мощным ингибирующим действием на онкотрансформированные. Полученные результаты на панели клеточных линий существенно дополняют уже имеющиеся данные, а микроскопический анализ препаратов добавил сведений к изучению наблюдаемого эффекта.

В результате модельный эксперимента по получению флюоресцентно меченой урсоловой кислоты удалось зарегистрировать проникновение внутрь клеток и накопление эпитмера вначале на внутренних мембранах, а затем на митохондриях. Таким образом, была подтверждена локализация мишени для пентациклических тритерпеновых кислот внутри клетки, наиболее вероятно, что это Akt1 – ключевой белок внешнего сигнального пути, принимающий участие в

регуляции внутреннего сигнального пути и аутофагии.

ВЫВОДЫ

1. Впервые в сырье иван-чая узколистного (*C. angustifolium*) обнаружено 6 тритерпеновых кислот: олеаноновая, урсоловая, помоловая, ацетилолеаноловая, ацетилурсоловая, бетулиновая. Разработана и усовершенствована методика очистки целевых соединений, получены образцы тритерпеновых кислот с чистотой более 96%.

2. Показано отсутствие генотоксических и мутагенных свойств помоловой кислоты и ее метаболитов в бактериальных тест-системах. Также обнаружены защитные свойства помоловой кислоты против мутагенов 4-нитрохиолин-1-оксида и трет-бутил-гидропероксида.

3. Впервые показано, что урсоловая и помоловая кислоты индуцируют апоптоз в глиомной линии U87. Микроскопический анализ клеток, обработанных помоловой кислотой, свидетельствует о множественном механизме действия, который зависит от наличия или отсутствия гена p53.

4. Получена урсоловая кислота, меченная FITC. Данные МТТ-теста свидетельствуют о повышении ее токсичности, в основе которой лежит индукция апоптоза. Показано проникновение меченого эписмера внутрь онкоконтрансформированных клеток линии MCF-7 и его накопление вначале на внутренних мембранах, затем на митохондриях. Akt1 предложена в качестве наиболее вероятной мишени для связывания с урсоловой кислотой.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Список статей в журналах, входящих в список, рекомендованный ВАК:

1. Frolova T. S., Salnikova O. I., Dudareva T. A., Kukina T. P., Synitsyna O. I. Isolation of pomolic acid from *Chamaenerion angustifolium* and evaluation of its genotoxicity by microbiological tests // *Bioorg Khim.* 2014. Vol. 40. N. 1. P.92-98.

2. Antimonova A. N., Petrenko N. I., Shakirov M. M., Rybalova T. V., Frolova T. S., Shults E. E., Kukina T. P., Sinitsyna O. I., Tolstikov G. A. Synthesis and Study of Mutagenic Properties of Lupane Triterpenoids Containig 1,2,3-triazole Fragments in the C-30 Position // *Chemistry of Natural Compounds.* 2013. Vol. 49. N. 4. P. 657–664.

3. Кукина Т. П., Фролова Т. С., Сальникова О. И. Липофильные кислоты иван-чая узколистного // Химия растительного сырья. 2014. № 1. С. 139–146.

4. Kukina T. P., Frolova T. S., Salnikova O. I. Neutral Constituents of *Chamaenerion angustifolium* leaves // Chemistry of Natural Compounds. 2014. Vol. 50. N. 2. P. 233–236.

5. Frolova T. S., Kukina T. P., Sinitsyna O. I. Genotoxic and Mutagenic Properties of Synthetic Betulinic and Betulonic Acids // Bioorg Khim. 2015. Vol. 41. N. 4. P. 462-467.

6. Фролова Т. С., Баев Д. С., Сеницына О. И. Исследование цитотоксических свойств тритерпеновых кислот против клеток глиомы // Успехи современной науки и образования. 2016. № 9. Т. 4. С. 14-18.

Тезисы:

1. Salnikova O. I., Frolova T. S. Triterpene Constituents of *Chamaenerion angustifolium* and investigation of their genotoxic properties // 1st International Symposium on Secondary Metabolites, Denizli, Turkey, 2011. P. 36.

2. Кукина Т. П., Сеницына О. И., Фролова Т. С. Исследование биологической активности соединений тритерпенового ряда, выделенных из лекарственного растения *Chamaenerion angustifolium* // V Всероссийская конференция «Новые достижения в химии и химтехнологии растительного сырья», Барнаул, 2012. С. 253-254.

3. Frolova T. S., Kukina T. P., Sinitsyna O. I. Comparison of Biological Properties of Oleanolic and Pomolic Acids Isolated from *Chamaenerion angustifolium* // 4th Annual Russian-Korean Conference «Current issues of natural products chemistry and technology», Novosibirsk, 2012. P. 93.

4. Frolova T. S., Sinitsyna O. I., Kukina T. P. Antineoplastic properties of pomolic acid isolated from *Chamaenerion angustifolium* // FEBS Congress, St. Petersburg, 2013. P. 308-309.

5. Фролова Т. С., Кукина Т. П., Сеницына О. И. Скрининг генотоксических свойств соединений тритерпенового ряда, выделенных из иван-чая узколистного // 1-ая Международная научная конференция «Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы», Новосибирск, 2013. С. 411-414.

6. Frolova T., Kukina T., Gubanova N., Sinitsyna O. Cytotoxicity of Pomolic acid Isolated from *Chamaenerion angustifolium* against human cancer cell // 6th Russian-Korean Conference “Current Issues of Biologically Active Compound Chemistry and Biotechnology”, Novosibirsk, 2015. P.181

7. Фролова Т. С., Липеева А. В., Губанова Н. В. Сальникова О. И., Кукина Т. П., Синицина О. И. Синтез флюоресцентно меченой урсоловой кислоты // IX Всероссийская научная конференция с международным участием “Химия и технология растительных веществ», Москва, 2015. С.182.

8. Frolova T. S., Baev D. S., Tolstikova T. G., Sinitsyna O. I. Anticancer mechanism of ursolic acid characterized by microscopy combined with molecular modeling // XX Mendeleev Congress, Ekaterinburg, 2016. Vol. 4. P. 409.

Список сокращений:

FITC – флюоресцеинизотиоцианат

Akt1 – протеинкиназа В

MDM2 – E3 убиквитин-протеин лигаза

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

NBD – 7-нитро-1,2,3-бензодиазол

ДМСО – диметилсульфоксид