

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Фролова Татьяна Сергеевна

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук, доцент  
Синицына Ольга Ивановна

Новосибирск – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	10
1.1. Тритерпеновые кислоты природного происхождения.....	10
1.2. Цитотоксические свойства тритерпеновых кислот.....	13
1.3. Механизмы цитотоксичности урсоловой и помоловой кислот.....	20
1.4. Апоптоз как основной механизм антинеопластического действия.....	21
1.5. Аутофагия.....	29
1.6. Параптоз.....	37
1.7. Заключение.....	42
Глава 2. Материалы и методы.....	43
2.1. Материалы.....	43
2.2. Характеристика растительного сырья <i>Chamaenerion angustifolium</i> и выделение помоловой кислоты.....	43
2.3. Введение флюоресцентной метки в молекулы тритерпеновых кислот урсанового ряда.....	45
2.4. Методы оценки генотоксических и мутагенных свойств. Бактериальные тест-системы.....	46
2.5. Методы оценки потенциальных противоопухолевых свойств. МТТ-тест, микроскопическое исследование клеточных культур.....	48
2.6. Детекция апоптоза.....	49
2.7. Методы статистической обработки.....	50
2.8. Молекулярный докинг.....	50
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	51
3.1. Изучение химического состава липофильного экстракта <i>Chamaenerion angustifolium</i> и выделение помоловой кислоты.....	51
3.1.1. Исследование динамики накопления экстрактивных веществ.....	51
3.1.2. Разработка методики очистки тритерпеновых кислот.....	53
3.2. Изучение биологической активности помоловой кислоты.....	55
3.2.1. Мутагенные и генотоксические свойства.....	55
3.2.2. Антимутагенные свойства.....	58
3.2.3. Цитотоксические свойства.....	61
3.2.4. Исследование изменения клеточной морфологии.....	65
3.2.5. Проапоптотические свойства.....	67

3.3. Модельный эксперимент по получению флюоресцентно меченых тритерпеновых кислот и возможный механизм их действия.....	70
3.3.1. Предполагаемый механизм цитотоксического действия тритерпеновых кислот урсанового ряда.....	70
3.3.2. Синтез и характеристика флюоресцентно меченой урсоловой кислоты.....	75
3.3.3. Сравнение цитотоксичности нативной и меченой урсоловой кислоты.....	81
3.3.4. Сравнение проапоптотических свойств нативной и меченой урсоловой кислоты.....	82
3.3.5. Исследование динамики проникновения и внутриклеточного распределения меченой урсановой кислоты.....	83
Заключение.....	88
Выводы.....	90
Благодарность.....	91
Список литературы.....	92

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

MTБЭ – метил-трет-бутиловый эфир

ТСХ – тонкослойная хроматография

ХМС – хромато-масс-спектрометрия

ЦОМТ – центр организации микротрубочек

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Akt1 – протеинкиназа В

DMSO – диметилсульфоксид

DTT – дитиотреитол

FITC – флюоресцеинизотиоцианат

МАР-киназы – митоген-активируемые протеинкиназы

MDM2 – E3 убиквитин-протеин лигаза

МТТ-реагент – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид

NBD – 7-нитро-1,2,3-бензadiaзол

NF-κB – ядерный фактор κB

NQO – 4-нитрохинолин-1-оксид

ONPG – о-нитрофенил-β-галактозид

PARP – поли-(АДФ-рибоза)-полимераза

PBS – натрий-фосфатный буфер

PNPP – п-нитрофенилфосфат

SDS – лаурилсульфат натрия

t-BuO<sub>2</sub>H – трет-бутил гидропероксид

TNF – фактор некроза опухоли

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Тритерпеновые соединения являются одним из самых больших классов природных соединений, в настоящий момент их описано более 20 000 [Liby, Yore, Sporn, 2007]. Основными источниками тритерпенов являются растения, в том числе водоросли, причем наибольшее содержание тритерпеноидов наблюдается в восковом покрытии плодов, листьев и стеблей. Особенно богаты тритерпеновыми соединениями оливки, лаванда, розмарин, тимьян, яблоки, клюква, брусника и черника [Gerhauser, 2008; Laszczyk, 2009; Neto, Amoroso, Liberty, 2008; Ovesná et al., 2004; Rabi, Bishayee, 2009].

Долгое время тритерпеноиды считались биологически неактивными, сведения о широком спектре их биологической активности в сочетании с низкой токсичностью постепенно накапливались и привлекли к ним огромный интерес. Уже сейчас для них зарегистрированы противовоспалительные, обезболивающие, жаропонижающие, гепатопротекторные и кардиотонические свойства [Ovesná et al., 2004]. Последние исследования обнаружили новые виды биологической активности, включая антиоксидантную, противовирусную и антиаллергическую [Shah, Qazi, Taneja, 2009; Sultana, Ata, 2008]. Накапливается все больше сведений о тритерпеноидах, обладающих токсичностью против раковых клеток, не воздействуя при этом на нормальные [Laszczyk, 2009; Petronelli, Pannitteri, Testa, 2009; Setzer, Setzer, 2003]. Некоторые соединения успешно протестированы в доклинических моделях рака на животных. Большое число модифицированных тритерпеноидов синтезировано структурными модификациями природных соединений 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 изучен недостаточно. Так, до сих пор не предложена конкретная мишень для связывания с тритерпенами. Наиболее вероятными кандидатами считаются глюкокортикоидные рецепторы [Kassi et al., 2009; Kassi, Moutsatsou, 2011] на основании структурного сходства глюкокортикоидов и тритерпенов, однако при исследовании взаимодействия молекулярно-биологическими методами все же обнаруживаются некоторые различия, свидетельствующие о различных механизмах действия глюкокортикоидов и тритерпеновых соединений.

Помимо биологической активности тритерпеновых кислот урсанового ряда, в данной работе исследован химический состав лекарственного растения иван-чая

узколистного (*Chamaenerion angustifolium*). Имеющиеся ранее сведения касались, по большей части, полярных водо- и спирторастворимых компонентов: фенолокислот (производных бензойной и коричной кислот) [Королёва, Красноборов, И. М. Пеньковская, 1973], гликозидированных и свободных флавоноидов [Gruenwald, Brendler, Jaenicke, 2000; Hiermann, Bucar, 1997]. Состав липофильных компонентов иван-чая практически не изучен, хотя имеется ряд сведений о составе монотерпенов [Полежаева, 2007], алифатических кислот [Hiermann, Bucar, 1997], стеренов [Hiermann, Maug, 1985; Juan, Sametz, Hiermann, 1988] 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, современными методами экстракты иван-чая не изучены.

Учитывая, что в условиях Западной Сибири иван-чай узколистный накапливает существенную биомассу, он может являться весьма перспективным источником тритерпеновых кислот для фармакологической промышленности, поэтому детальное исследование его химического состава является очень актуальной задачей. В данном исследовании подробно изучена фракция липофильных компонентов, содержащая целевые соединения, в том числе динамика ее накопления в течение периода вегетации. Результаты подтверждены на сырье трех лет сбора. Все тритерпеновые кислоты, использованные в исследовании, выделены из сырья иван-чая узколистного.

Еще один аспект научной новизны данной работы 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. Так, меченый 7-нитро-1,2,3-бензодиазолом (NBD) лиганд для опиатного рецептора  $\sigma_2$  позволил исследовать механизм его работы в онкотрансформированных клетках поджелудочной железы линии ВхРС3 [Abate et al., 2011]. Установлено, что этот рецептор имеется в большом количестве в некоторых линиях раковых клеток и участвует в запуске апоптоза [Crawford, Bowen, 2002; Kashiwagi et al., 2009; Ostefeld et al., 2005], поэтому является потенциальной мишенью для терапии онкологических заболеваний. С помощью присоединения флюорофоров NBD и Cy5.5 к фруктозе был разработан подход, позволяющий диагностировать раковые клетки молочной железы – они отличаются от нормальных повышенным количеством транспортера Glut5 и, как следствие, мощным захватом фруктозы [Levi et al., 2007]. Также с помощью NBD были исследованы механизмы действия других антипролиферативных соединений – вортманнина [Barnes et al., 2008], азатилонов [Gertsch et al., 2009]. Исследован

механизм антималярийного эффекта 1,2,3-триоксоланов с использованием флюоресцентного красителя дансилхлорида [Hartwig et al., 2011]. Одним из самых популярных красителей является флюоресцеин изотиоцианат, применяемый для присоединения по NH<sub>2</sub>- или SH-группам [Fülöp, Penke, Zarándi, 2001; Hoffmann et al., 2008; Wu, Dovichi, 1989], так как он нетоксичен и позволяет наблюдать прижизненные внутриклеточные процессы. В данной работе впервые предлагается новый подход, основанный на флюоресцентном мечении тритерпеновых кислот. 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.

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

**Задачи исследования:**

- 1) Выделить из растительного сырья иван-чая узколистного (*C. 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 предложено две мишени, которые теоретически могут участвовать в связывании тритерпеновых кислот. 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.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** 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 дополнить уже существующие модели, объясняющие данный эффект для тритерпеновых кислот.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

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

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

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

**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).



**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».

**Личный вклад соискателя.** 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.

**Структура и объем работы.** 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Тритерпеновые кислоты природного происхождения

Пентациклические тритерпеновые кислоты являются вторичными метаболитами растений, образующимися в результате циклизации сквалена (рис. 1).

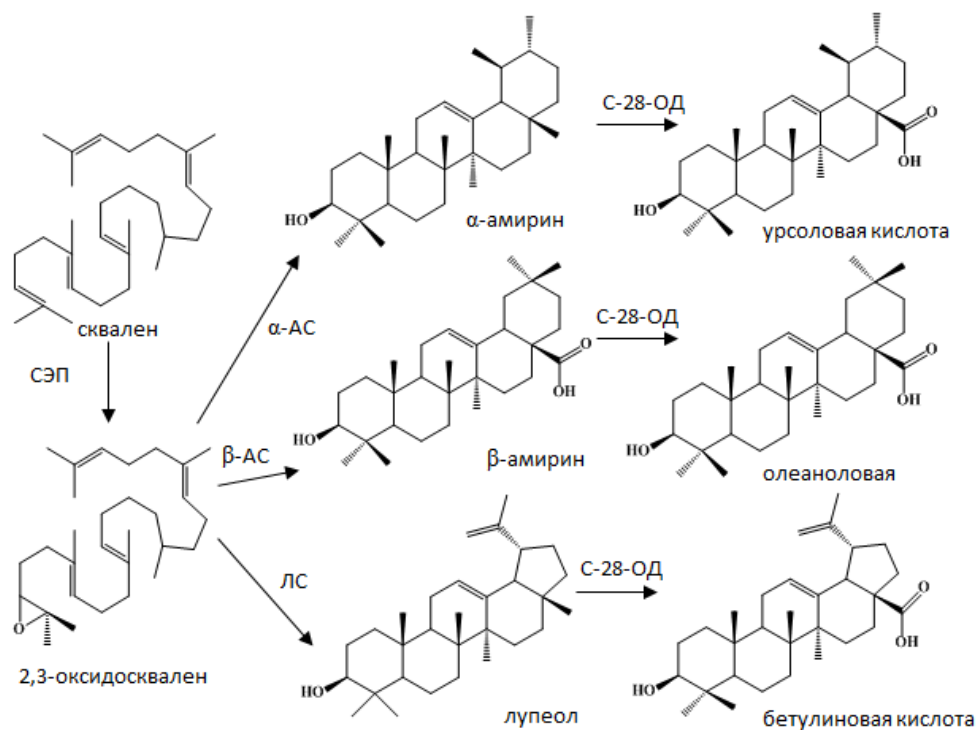


Рис. 1. Биосинтез основных тритерпеновых кислот [Huang и др., 2012; Xu, Fazio, Matsuda, 2004; Yu и др., 2013; Zheng и др., 2015]: СЭП – сквален-эпоксидаза;  $\alpha$ -АС –  $\alpha$ -амирин-синтаза;  $\beta$ -АС –  $\beta$ -амирин-синтаза; ЛС – лупеол-синтаза; C-28-ОД – C-28-оксидаза.

Тритерпены обнаруживаются в разных частях растений, например, в коре, пробковом слое, восковом покрытии листьев или плодов. Низкое содержание тритерпенов (<0.1% от сухого веса сырья) всегда присутствует в растительном сырье, однако есть виды с очень высокой долей пентациклических тритерпенов (>1% от сухого веса сырья). Наивысший уровень тритерпенов зарегистрирован в наружной коре березы белой (*Betula alba* L.), содержащей до 34% бетулина [Ekman, 1983]. Также повышенным содержанием этих соединений отличаются листья розмарина и оливы, яблочная кожура – из этих растений могут быть получены концентраты, содержащие до 50-90% тритерпенов с преобладанием лупеола, бетулиновой, бетулоновой, урсоловой или олеаноловой кислот, либо с примерно эквивалентным их содержанием. Наиболее обогащенные тритерпеновыми соединениями растения представлены в табл. 1. Такие концентраты могут использоваться как стартовый материал для дальнейшей фармацевтической разработки.

Табл. 1. Растения, обогащенные тритерпеновыми кислотами [Laszczyk, 2009; Schinella et al., 2008].

Растение	Часть	Тритерпен	Содержание
<i>Betula alba</i> L., <i>Betulaceae</i>	кора	лупеол	1–2%
		бетулин	10–34%
		бетулиновая кислота	0.5–1.5%
		олеаноловая кислота	0–1.5%
<i>Rosmarinus officinalis</i> L., <i>Lamiaceae</i>	листья	бетулиновая кислота	1.5%
		олеаноловая кислота	1.2%
		урсоловая кислота	3.0%
<i>Malus domestica</i> Mill., <i>Rosaceae</i>	плоды	урсоловая кислота	2.0%
<i>Olea europaea</i> L., <i>Oleaceae</i>	листья	олеаноловая кислота	3.1%
<i>Lavandula angustifolia</i> L., <i>Lamiaceae</i>	листья	урсоловая кислота	1.6%
<i>Salvia officinalis</i> L., <i>Lamiaceae</i>	листья	урсоловая кислота	1.8%
<i>Thymus vulgaris</i> L., <i>Lamiaceae</i>	листья	урсоловая кислота	1.0%
<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul, <i>Urticaceae</i>	надземная часть	урсоловая кислота	0.13%
		помоловая кислота	0.28%

За последние годы сотни публикаций были посвящены исследованию широкого спектра биологической активности лупановых, олеанановых и урсановых тритерпенов. Особой популярностью они приобрели благодаря их избирательной цитотоксичности против малигнизированных клеток, что сделало их перспективными противоопухолевыми препаратами. Учитывая их низкую растворимость в воде, особое внимание уделяется концентрациям в экспериментах *in vitro*: концентрации свыше 100 мкМ искажают результаты из-за нерастворимости [Laszczyk, 2009]. Помимо цитотоксичности, тритерпены обладают еще рядом свойств, способствующих борьбе с опухолями: антиангиогенными, противовоспалительными, антиоксидантными, они способствуют клеточной дифференциации. Также тритерпены являются неотъемлемым компонентом нашего рациона в силу их растительного происхождения, что помогает реализовать их хемопревентивный потенциал для предупреждения развития онкологических заболеваний [Chaturvedi, Bhui, Shukla, 2008; Ovesná et al., 2004].

В Западной Сибири имеется множество растений, содержание тритерпеновых компонентов в которых достаточно высоко [Красноборов, Ломоносова, Шауло, 2000]. Их

источниками могут быть облепиха, клюква, брусника, черника, жимолость, календула и иван-чай, на котором следует остановиться поподробнее. Иван-чай узколистный (*C. angustifolium*) – широко распространенное по всему миру растение. При выращивании в условиях сибирской климатической зоны он накапливает за период вегетации значительную биомассу, поэтому может представлять интерес в качестве сырьевого источника биологически активных соединений, в частности, тритерпеновых кислот [Буданцев, 2009]. Ранее сообщалось об обнаружении урсоловой, олеаноловой, маслиновой и 2- $\alpha$ -гидроксиурсоловой (коросоловой) кислот в составе липофильной фракции. Позднее нами этот список был расширен: впервые в сырье были обнаружены помоловая, бетулиновая, урсонная, олеанононая, ацетилурсоловая, ацетилолеанононая кислоты (рис. 2, [Frolova et al., 2014]).

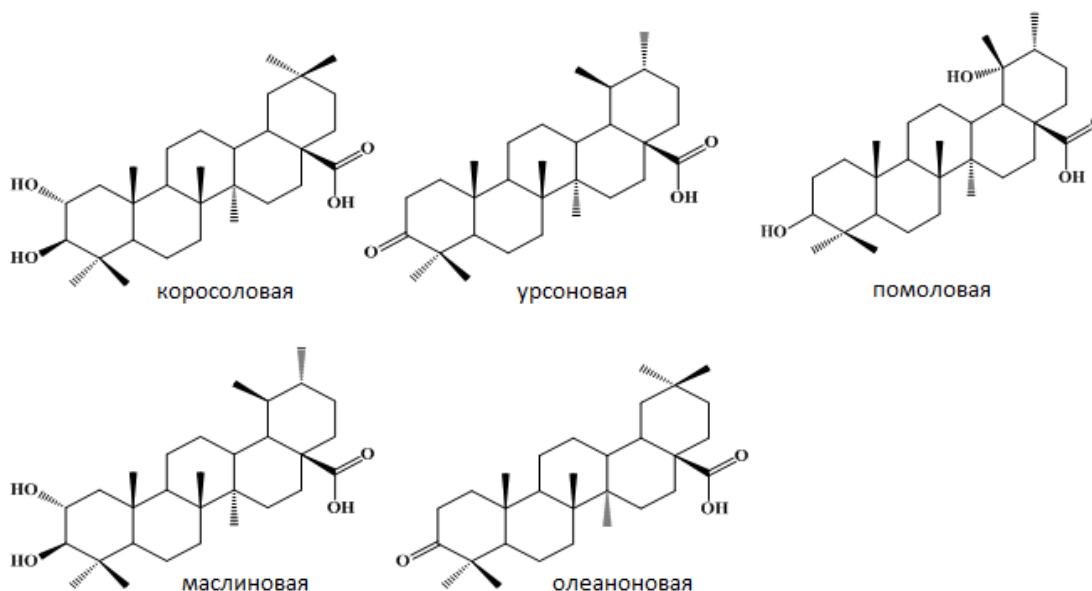


Рис. 2. Тритерпеновые кислоты *C. angustifolium*.

Помимо этого, в литературе имеются сведения об использовании иван-чая для рекультивации почв на выработанных месторождениях медно-никелевых руд, золота, угля, нефти; зонах, подвергшихся радиационному воздействию; а также территориях, поврежденных при строительстве магистралей и в результате активной вулканической деятельности [Якубов и др., 2003]. Эти данные свидетельствуют, что после сбора образцов сырья в нем практически не были аккумулированы радионуклиды [Полежаева, Полежаева, Левданский, 2005; Сапегин, Дайнеко, Тимофеев, 2008] и тяжелые металлы [Полежаева, Полежаева, Н, 2005]. Так, коэффициент накопления радионуклидов иван-чаем, выращенным в зоне, подвергшейся воздействию Чернобыльской катастрофы, в 1.3 раза ниже, чем у энотеры, принадлежащей к тому же семейству, в 5.2 раза ниже, чем у донника

белого, в 22 раза ниже, чем у чабреца. Стоит отметить, что использование липофильных компонентов надежнее гарантирует безопасность полученных фармацевтических препаратов [Шмонов, 1991], так как большинство поллютантов являются гидрофильными.

## 1.2. Цитотоксические свойства тритерпеновых кислот

Сейчас лечение раковых заболеваний – не только вопрос уничтожения онкотрансформированных клеток индукцией клеточной смерти. Новые терапевтические стратегии также нацелены на микроокружение опухоли, предотвращение ангиогенеза, модуляцию иммунного ответа или хронического воспаления, которые часто сопутствуют опухоли. Также имеется подход, основанный на дедифференциации или редифференциации раковых клеток. Растительные метаболиты представляют широкий спектр соединений для онкотерапии с множеством эффектов и мишеней, из тритерпеновых кислот наибольший интерес представляют лупановые, олеанановые и урсановые тритерпены, последние будут рассмотрены в отдельном разделе.

Первая работа, посвященная бетулиновой кислоте как высоко перспективному противораковому препарату, вышла в 1995 году [Pisha et al., 1995]. Авторы показали ее способность запускать апоптоз в клетках меланомы как *in vivo*, так и *in vitro*. После этой статьи множество работ фокусировались на проапоптотическом действии бетулиновой кислоты и других тритерпенах. Противоопухолевый эффект позже был подтвержден на клеточных линиях другого происхождения, например, молочной железы, толстой кишки, легкого и нейробластомы [Laszczyk, 2009]. Помимо непосредственно цитотоксического действия, для тритерпеновых соединений показан ряд свойств, способствующих более эффективной терапии онкологических заболеваний. В частности, тритерпены лупанового ряда, такие как бетулиновая кислота, бетулин, лупеол, проявляют противовоспалительную активность, которая зачастую модулирует иммунный ответ. Антиоксидантными свойствами среди тритерпеновых соединений обладают не только кислоты, но и моноспирты и диолы. Таким образом, фармакологический потенциал тритерпенов для лечения онкологических заболеваний выглядит достаточно высоким.

Итак, индукция апоптоза проапоптотическими агентами – один из наиболее важных аспектов терапии рака. Но в раковых клетках апоптоз зачастую ослаблен или даже заблокирован мутацией генов, регулирующих клеточный цикл, или дисбалансом соотношения про- и антиапоптотических белков. Поэтому необходимо необходимо нацеливаться на разные этапы апоптоза в соответствии с блоками, характерными для конкретной опухоли.

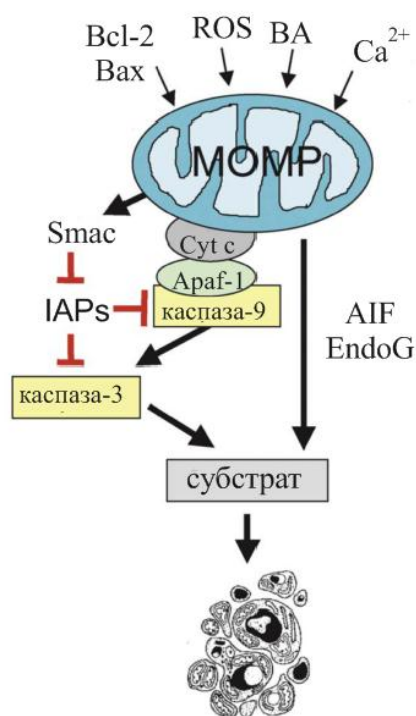


Рис. 3. Митохондриальный путь запуска апоптоза [Fulda, Kroemer, 2009]. Внутренний (митохондриальный) путь связан с проницаемостью наружной мембраны митохондрий (MOMP), которая регулируется различными факторами: белками семейства Bcl-2, активными формами кислорода (ROS), ионами, бетулиновой кислотой (BA). MOMP, в свою очередь, приводит к высвобождению цитохрома с, Smac/DIABLO, AIF и эндонуклеазы G (EndoG), приводя к апоптозу.

Тритерпены запускают апоптоз различными способами, которые особенно подробно описаны для бетулиновой кислоты [Chaturvedi, Bhui, Shukla, 2008; Fulda, 2009; Ovesná et al., 2004]. Изначально предполагалось, что бетулиновая кислота является селективным цитотоксическим соединением против клеток меланомы, однако с расширением панели клеточных линий оказалось, что они чувствительны не только к бетулиновой кислоте, но и к другим тритерпенам, из чего был сделан вывод об их избирательной токсичности против малигнизированных клеток. Сообщалось и о негативном воздействии на первичные клетки: фибробласты, меланоциты, кератиноциты, нейронные клетки и лимфоциты [Fulda, Kroemer, 2009; Galgon, Wohlrab, Dräger, 2005; Kessler et al., 2007; Selzer et al., 2000; Zuco et al., 2002], но они все же более устойчивы к высоким концентрациям тритерпенов, чем раковые клетки того же происхождения. Приведет ли это к положительным результатам *in vivo*, где раковые клетки находятся среди нормальных, остается открытым вопросом. Но в случае тритерпеновых кислот была обнаружена возможность усиления их действия в раковых тканях: в экспериментах *in vitro*

активность бетулиновой кислоты возрастала при снижении pH [Wachsberger et al., 2002]. Интересно, что у бестимусных мышей с ксенотрансплантатами меланомы человека после внутрибрюшинного введения наивысшая концентрация наблюдалась именно в опухолевой ткани, которая часто характеризуется более низким значением pH, вызванным изменением метаболизма, что может подтверждать накопление тритерпеновых кислот именно в ткани меланомы. На данный момент немногие исследования включали изменение pH [Noda et al., 1997; Wachsberger et al., 2002], но этот фактор может быть очень важным для усиления активности тритерпеновых кислот при лечении рака и должен быть исследован более детально.

Механизм запуска апоптоза бетулиновой кислотой был достаточно хорошо исследован и описан в 2009 году С. Фулда [Fulda, 2009]. Показано, что индукция идет через внутренний путь посредством изменения мембранного потенциала [Fulda et al., 1998] и продукцией активных форм кислорода, которая связана с активацией проапоптотических p38 MAPK и SAP/JNK киназ [Liu et al., 2004; Tan, Yu, Pezzuto, 2006].

Такой же эффект показан для олеаноловой кислоты в клетках астроцитомной линии [Martin et al., 2007]. Несмотря на данные о Bax/Bak-независимом запуске апоптоза бетулиновой кислотой в разнообразных клеточных линиях [Mullauer, Kessler, Medema, 2009], ряд публикаций свидетельствует о модуляции анти- и проапоптотических белков семейства Bcl-2 [Fulda et al., 1997; Rzeski et al., 2006; Selzer et al., 2000; Selzer et al., 2002; Wick et al., 1999]. Модуляция про- и антиапоптотических факторов очень сложная и, возможно, зависит от типа клеток. Вполне вероятно, что здесь также задействована регуляция ядерного фактора карра-В (NF-κB). Так как NF-κB активируется бетулиновой кислотой в разных линиях, приводя к апоптозу [Kasperczyk et al., 2005], ингибирование NF-κB наблюдается в хеморезистентных, нечувствительных к андрогенам клетках рака простаты, проявляющих Rel/NF-κB активацию [Rabi, Shukla, Gupta, 2008]. Похожие эффекты тритерпенов на NF-κB, связанный с воспалением, будут обсуждаться далее. Одним важным элементом для преодоления апоптозорезистентности в некоторых типах клеток является независимость действия бетулиновой кислоты от работы гена p53, который часто мутирует в раковых клетках [Fulda et al., 1997; Selzer et al., 2000; Wick et al., 1999], а также же Fas рецептора [Fulda et al., 1997].

Fas рецептор является мишенью лупеола, который через него активирует запуск апоптоза внешним путем посредством активации каспазы-8. Например, лупеол существенно усиливает синтез FADD белка и Fas рецептора в андроген-чувствительных клетках рака простаты [Saleem et al., 2005c]. Более того, лупеол делает более восприимчивыми хеморезистентные клетки рака поджелудочной железы, вызывая апоптоз

через TRIAL рецепторы, подавляя cFLIP [Murtaza et al., 2009]. Кроме этой, сообщалось и о других мишенях лупеола для преодоления апоптозорезистентности ингибированием онкогенов и активацией генов-супрессоров опухолей. Например, лупеол снижает синтез онкопротеина Ras, избыток которого обычно наблюдается в раковых клетках, что приводит в итоге к ингибированию PI3K/Akt пути, способствующему росту клеток [Saleem et al., 2005a]. По совпадению, синтез фосфо-p38 MAPK, которая запускает антиапоптотический ответ в раковых клетках, также снижался вслед за ингибированием NF-κB, что в сочетании приводило к индукции апоптоза в других устойчивых клетках рака поджелудочной [Saleem et al., 2005a].

Проапоптотические свойства показаны и для урсоловой и олеаноловой кислот [Ovesná et al., 2004]. Недавние работы свидетельствуют о модуляции белков семейства Bcl-2 посредством подавления NF-κB пути урсоловой кислотой в клетках мышиной меланомы B16.F10. Индукция апоптоза была связана с активацией экспрессии генов p53 и каспазы-3 [Manu, Kuttan, 2008]. Олеаноловая кислота вызывает апоптоз через активацию каспазы-9 и -3, связанных с расщеплением поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) [Zhang et al., 2007].

Бетулин часто оказывался неактивен или слабо активен против некоторых раковых линий, таких как меланома (MEL-2), эпидермоидная карцинома (KB) [Kim, Pezzuto, Pisha, 1998], лейкемия (HL60, U937, K562) или нейробластома (GOTO, NB-1) [Hata et al., 2003]. Однако в немалигнизированных иммортализованных кератиноцитах HaCaT наблюдалась индукция бетулином каспаз-зависимого апоптоза [Laszczyk et al., 2006], недавно зарегистрирован апоптоз для онкотрансформированных клеток легкого A549 [Pyo et al., 2009]. Эритродиол, структурно близкий диол олеананового ряда, изучен достаточно слабо, но и для него обнаружена апоптотическая активность на аденокарциномной линии HT-29 [Juan et al., 2008]. Тем не менее, оценить проапоптотические свойства бетулина и эритродиола в сравнении с бетулиновой кислотой достаточно трудно из-за малого количества данных. Умеренный проапоптотический эффект тритерпенов наблюдался *in vitro*, как сообщалось для иммортализованных кератиноцитов HaCaT или человеческих эпидермоидных клеток (A431), при обработке сухим экстрактом коры березы, содержащим 80% бетулина, до 4% бетулиновой кислоты и небольшие количества лупеола и олеаноловой кислоты [Laszczyk et al., 2006], причем в клетках HaCaT апоптоз был усилен лишь двукратно.

Для бетулиновой кислоты механизм индукции апоптоза хорошо известен – это запуск внутреннего пути посредством нарушения мембранного потенциала митохондрий, задействования MAP-киназы и PI3K/Akt пути. Интересным выглядит путь, в основе которого лежит продукция активных форм кислорода, причем концентрация является критическим



параметром, определяющим антиоксидантный или проапоптотический эффект. Похожим путем действует олеаноловая кислота.

Вследствие разных механизмов запуска апоптоза, использование разных тритерпенов, в том числе в смеси, может увеличить шансы преодоления хеморезистентности в раковых клетках, но это утверждение основывается на разных исследованиях, выполненных независимо. Только тщательно организованный обширный анализ панели раковых клеток, обработанных тритерпенами в стандартизованных условиях, может помочь сделать вывод, какие тритерпены или их смеси наиболее перспективны для конкретных раковых клеток. С другой стороны, это может ограничить потенциал тритерпенов, индуцирующих апоптоз.

Важность результатов *in vitro* можно оценить только в последующих исследованиях *in vivo*. Именно по этой причине большой интерес к пентациклическим тритерпенам начался только после обнаружения активности бетулиновой кислоты *in vivo* против меланомы [Pisha et al., 1995].

Биодоступность является обязательным условием активности в таких исследованиях, но опубликовано лишь несколько работ по исследованию фармакокинетики тритерпенов. Бетулиновая кислота была обнаружена в разных тканях спустя 24 ч после внутрибрюшинного введения с наивысшей концентрацией в окологепаточном жировом теле. Пик концентрации в сыворотке крови (4.0 мкг/мл) наблюдался через 0.23 ч после применения [Udeani et al., 1999]. Для бетулина наивысшая концентрация (138 нг/мл) зарегистрирована через 4 ч после внутрибрюшинного введения крысам [Jäger, Laszczyk, Scheffler, 2008]. Эти сравнительно низкие уровни в сыворотке крови можно объяснить низкой растворимости в воде (ВА, ОА: 0,02 мкг/мл для бетулиновой и олеаноловой кислот, <0,1 мкг/мл для бетулина) [Jäger et al., 2007]. Известно, что олеаноловая кислота может связываться с плазмином и альбумином [Fulda et al., 1998; Mullauer, Kessler, Medema, 2009], что может повышать ее биодоступность. Таким образом, необходимое предсказание концентрации и действия на организм может быть ненадежным, если основываться на результатах *in vitro*.

Например, была показана цитотоксичность для лупеола при лечении тестостерон-индуцированного увеличения простаты у мышей путем индукции апоптоза в гиподиплоидных участках, а также в опухолях простаты человеческого происхождения в модели ксенотрансплантата [Prasad, Kalra, Shukla, 2008; Saleem et al., 2005b]. Недавние исследования показали, что лупеол также ингибирует рост высоко агрессивных метастазных клеток меланомы человека (451Lu) в ксенотрансплантатной модели на бестимусных голых мышах. Иммуногистохимический анализ опухолевой ткани показал,

что у животных, получавших лупеол, было снижено число Ki67 и PCNA-положительных клеток, что свидетельствует об антипролиферативных свойствах лупеола. Это коррелирует со снижением уровня циклин D1, циклин D2 и Cdk2 положительных клеток и увеличением уровня белка p21 по сравнению с контрольными мышами. Последний факт свидетельствует, что лупеол вызывает остановку роста меланомы, вмешиваясь в активность комплекса циклин/cdk2/p21 [Saleem et al., 2008].

Современная терапия онкологических заболеваний также включает модуляцию иммунной системы. Такой эффект для тритерпенов наблюдался в экспериментах *in vitro* и *in vivo*: например, на мышах C57BL/6 с перевиваемой меланомой B16.F10. Внутривентрикулярные инъекции урсоловой или олеаноловой кислот в течение 5 дней усиливали активность клеток-киллеров и увеличивали содержание цитокина IL-2, что стимулировало литическую активность NK-клеток. Кроме того, усиливалась антитело- и комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность. В соответствии с ожидаемым противораковым эффектом, повышенные уровни GM-CSF и IL-6 у животных с опухолью снижались после обработки урсоловой кислотой [Raphael, Kuttan, 2008]. Другие исследования показали эффективность лупеола в модели канцерогенеза кожи, индуцированного 12-O-тетрадеканойлфорбол-13-ацетатом (TPA), благодаря его противовоспалительной активности. Предварительное местное применение лупеола приводило к ингибированию TPA-индуцированной активации PI3K и NF-κB, а также к снижению синтеза белков COX-2 и iNOS. Мыши показали значительно сниженную частоту возникновения и более низкую массу опухолей и задержку латентного периода перед появлением опухоли [Saleem et al., 2004].

Во время активного обсуждения антиангиогенного эффекта урсоловой кислоты в экспериментах *in vitro*, Ли с соавторами начали исследовать это свойство *in vivo*. Сниженное потребление кислорода после обработки, а также существенное уменьшение опухолевой межклеточной жидкости и кровяного давления наблюдалось после внутривентрикулярного введения урсоловой кислоты. Это сопровождалось торможением роста опухоли [Lee et al., 2001]. Ингибирующее действие урсоловой кислоты на урокиназу, как было показано в экспериментах *in vitro*, является очень важным в отношении не только антиангиогенного эффекта, но и для подавления роста опухоли и метастазирования. В условиях *in vivo* на мышах линии C57BL/6 с перевитой меланомой B16 было обнаружено полное ингибирование метастазирования в легкие при ежедневном внутривентрикулярном введении урсоловой кислоты в течение 16 дней сразу после инъекции опухоли. Автору предположили, что помимо ингибирования урокиназы, большое значение может иметь

ингибирование урсоловой кислотой и катепсина В, который представляет другую возможную мишень для подавления инвазии опухоли и метастазирования [Jedinák et al., 2006]. Сопоставимые результаты обнаружены для бетулиновой кислоты при похожих экспериментальных условиях [Sawada et al., 2004]. Также бетулиновая кислота действует на синтез фактора роста эндотелия сосудов и индуцирует избирательную протеасомно-опосредованную деградацию транскрипционных факторов Sp1, Sp3 и Sp4 [Chintharlapalli et al., 2011].

Другим способом использования тритерпенов в терапии рака является их комбинация с известными препаратами для химиотерапии. Исследования *in vivo* на мышах с плоскоклеточным раком языка показали, что лупеол существенно снижает объем опухоли и подавляет локальное метастазирование без побочных эффектов. Лупеол был в 3 раза более активным, чем цисплатин – традиционно используемый агент для химиотерапии с рядом побочных эффектов. Сочетанное использование лупеола с низкими дозами цисплатина было в 13 и 40 раз более активным, чем только лупеола и цисплатина соответственно, при этом побочные эффекты также отсутствовали [Lee et al., 2007c]. В других исследованиях бетулиновая кислота сочеталась с винкристином, основным препаратом для лечения меланомы [Sawada et al., 2004]. Комбинация с тритерпенами позволила уменьшить концентрацию химиотерапевтического агента, что привело к снижению побочных эффектов без потери эффективности лечения.

Как было упомянуто выше, имеется очень ограниченный опыт в использовании тритерпенов для лечения онкологических больных. Дозы в экспериментах на животных находятся в промежутке от 10 до 100 мг/кг веса, что в пересчете на человека будет около 0.6-6 г на пациента (при весе в 60 кг). Это достаточно большая доза для лекарственного средства, что вызывает сомнения в целесообразности и актуальности использования тритерпенов. Тем не менее, бетулиновая кислота находится в фазе II клинических испытаний для лечения диспластического меланоцитарного невуса. Кроме этого, имеются сведения об успешном местном лечении предраковых поражений, а именно кератозов, с помощью сухого тритерпенового экстракта внешней коры березы, как говорилось выше [Nuuke et al., 2009]. Иммуногистохимические исследования биопсии до и спустя 3 месяца после лечения сухим экстрактом показали снижение стадии кератоза и реорганизацию эпидермальных структур.

Сейчас стало возможным подтвердить *in vivo* все основные эффекты тритерпенов, предсказанные на основе данных *in vitro* (включая апоптоз, противовоспалительный, антиангиогенный и антиоксидантный эффекты), за исключением редифференциации. Наблюдаемое снижение стадии кератозных поражений после трех

месяцев лечения тритерпенами в клинических испытаниях пока является единственным доступным наблюдением, но экспериментальные работы отсутствуют. Таким образом, слишком рано заявлять о редифференцирующем эффекте тритерпенов для лечения рака, однако это очень перспективная область для исследований.

Введение препаратов также обостряет вопрос их токсичности *in vivo*. Пентациклические тритерпены лупанового, олеананового и урсанового ряда считаются относительно нетоксичными препаратами. Недавно опубликованные данные об исследовании субхронической токсичности показано, что внутрибрюшинное и подкожное введение смеси тритерпенов (80% бетулина с примесями бетулиновой кислоты, лупеола, олеаноловой кислоты, эритродиола) не вызывает токсических эффектов [Jäger, Laszczyk, Scheffler, 2008]. Это согласуется с ранее опубликованными результатами для индивидуальных тритерпенов. Например, внутрибрюшинное введение олеаноловой кислоты имеет LD<sub>50</sub> 1500 мг/мл на мышах [Liu, 1995], а однократная доза 1000 мг/мл при подкожном введении не токсична для крыс [Singh et al., 1992]. Введение бетулиновой кислоты в виде суспензии в дозе 500мг/кг также не было токсичным [Shin et al., 1999]. Выше уже говорилось об отсутствии побочных эффектов при введении бетулина и лупеола.

Таким образом, как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*, показаны достаточно перспективные для лечения онкологических заболеваний эффекты тритерпеновых соединений, что в сочетании с низкой токсичностью делает их весьма интересным объектом для фармакологических исследований.

### 1.3. Механизмы цитотоксичности урсоловой и помоловой кислот

Наиболее распространенной в своем ряду и изученной среди тритерпеновых соединений является урсоловая кислота, в значительном количестве присутствующая в растительном сырье [Sultana, 2011].

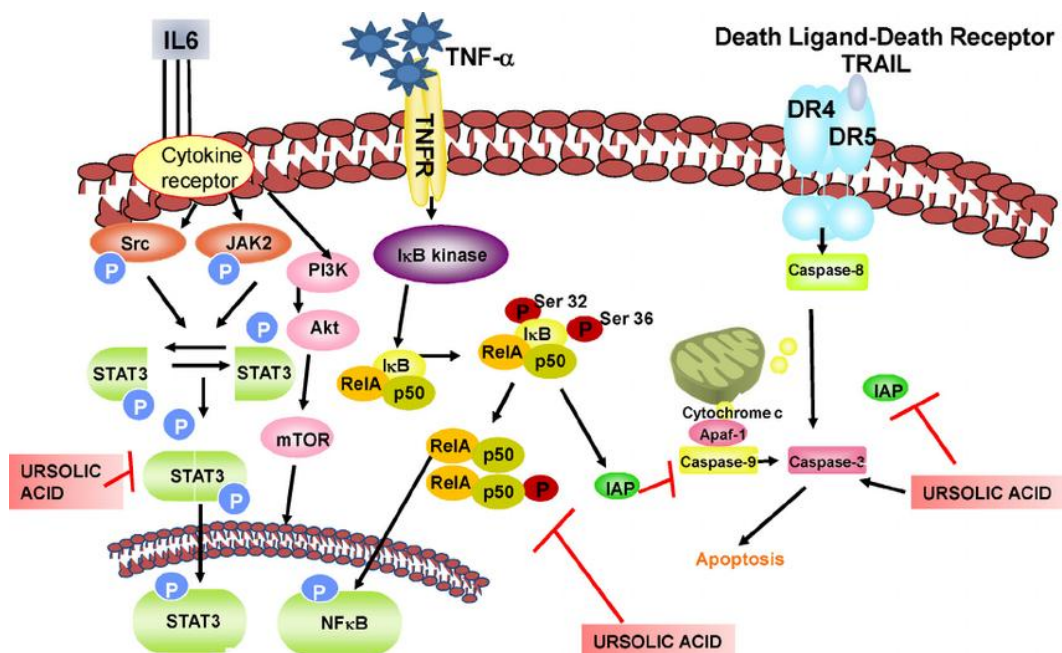


Рис. 4. Механизм цитотоксического действия урсоловой кислоты связан с противовоспалительным действием [Shanmugam et al., 2013]. Урсоловая кислота ингибирует действие белков IAP и STAT3, тормозящих апоптоз, а также регулирует NF-κB путь, участвующий в воспалительной реакции и запуске апоптоза.

Одним из наиболее интересных свойств урсоловой кислоты является избирательная цитотоксичность против раковых клеток [Aggarwal, Takada, Oommen, 2004], сопряженная с противовоспалительной активностью [Shanmugam et al., 2013] (Рис. 4). Она способна индуцировать апоптоз через митохондриальный внутренний путь посредством активации каспазы-3 в меланомных клетках M4Vec, а также ингибировать пролиферацию клеток через арест клеточного цикла в клетках линии B16 [Es-saady et al., 1996; Harmand et al., 2005]. Обнаружено, что нетоксичные концентрации урсоловой кислоты могут индуцировать апоптоз в клетках меланомы B16F-10 ингибированием транскрипционного фактора NF-κB — универсального фактора транскрипции, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла [Díaz et al., 2005]. Также урсоловая кислота проявила существенную антиангиогенную активность в моделях *in vivo* и *in vitro* [Manu, Kuttan, 2008; Skopinski et al., 2004; Sohn et al., 1995].

Помимо индукции апоптоза, для урсоловой кислоты обнаружено свойство вызывать аутофагию (Рис. 5). Так, на клетках глиомной линии U87-MG показан новый механизм индукции аутофагии. Показано, что обработка клеток урсоловой кислотой приводит к высвобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из пространства ЭПР, он накапливается в цитоплазме и в итоге активирует CaMKK-AMPK-mTOR-киназный сигнальный каскад. Вероятно, урсоловая кислота вызывает стресс ЭПР, который необходим для аутофагии. Помимо

усиления стресса ЭПР, урсоловая кислота способствует развитию ответа на неправильно свернутые белки. Все это происходит на фоне усиления производства активных форм кислорода в клетке [Shen et al., 2014].

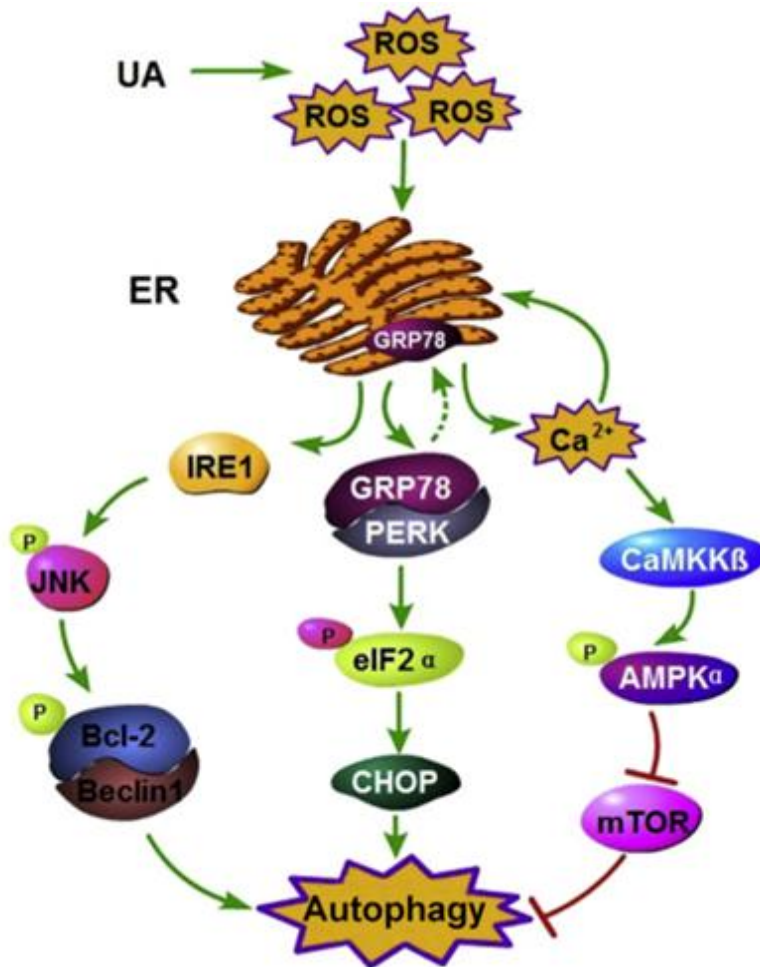


Рис. 5. Механизм индукции аутофагии урсоловой кислотой [Shen et al., 2014]

На другой клеточной линии, TC-1, не обнаружено признаков апоптоза после обработки урсоловой кислотой: оценка фрагментации ДНК, окрашивание аннексин V/пропидий йодидом, а также вестерн-блоттинг сопутствующих апоптозу белков дали отрицательные результаты. Зато был обнаружен маркер аутофагии – белок LC3. Его зрелая форма, LC3II, образуется во время формирования двумембранных пузырьков, и ее образование из LC3I стимулируется урсоловой кислотой. При добавлении ингибитора аутофагии, вортманнина, или миРНК для гена Atg5, выживаемость клеток TC-1 существенно возрасла. Однако сайленсинг гена Beclin-1 после добавления соответствующей миРНК не влиял на выживаемость клеток, из чего авторы исследования сделали вывод о ключевой роли Atg5 в индукции аутофагии на линии TC-1 [Leng et al., 2013].

Показана способность урсоловой кислоты вызывать аутофагию с последующей клеточной смертью в линиях, устойчивых к апоптозу (Рис. 6). Так, для клеток рака прямой кишки НСТ15 с мутацией гена p53 показано накопление белка LC3, сопутствующего аутофагии [Xavier et al., 2013]. В этом же исследовании указывается на участие активных форм кислорода и активацию пути JNK. Однако при совместной обработке клеток меланомы В16F10 урсоловой кислотой или ресвератролом и хлорохином, ингибитором аутофагии, выживаемость клеток падала, но это не является следствием синергического эффекта хлорохина и тритерпенов [Junco et al., 2015].

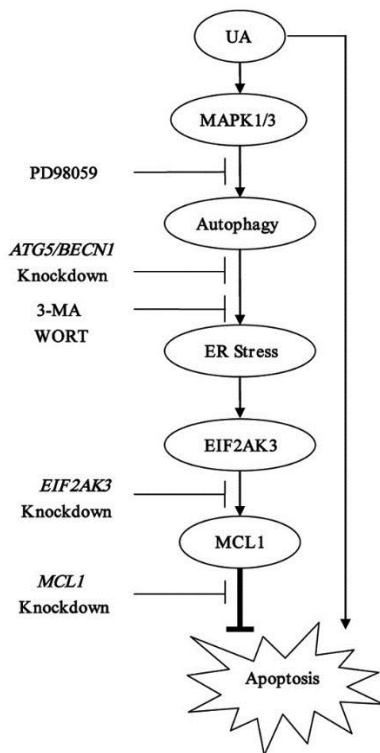


Рис. 6. Механизмы запуска апоптоза и аутофагии в клетках, устойчивых к апоптозу [Xavier et al., 2013].

С другой стороны, известны антагонистические взаимодействия апоптоза и аутофагии [Nikoletopoulou et al., 2013]. В ряде исследований подавление аутофагии, напротив, способствовало смерти клеток через апоптоз. Так, в линии РС3, дефицитной по гену PTEN, аутофагия развивалась в ответ на обработку урсоловой кислотой, однако авторы предполагают, что это является защитным эффектом клетки на апоптоз, вызываемый активацией PI3K/Akt сигнального пути. Линия РС3 характеризуется пониженной жизнеспособностью и усиленной экспрессией LC3, маркера аутофагии у млекопитающих. Обнаружено, что урсоловая кислота вызывает арест клеточного цикла в фазе G1, а затем аутофагию на ранней стадии. Показано также, что индукция аутофагии урсоловой кислотой опосредуется через пути Beclin-1 и PI3K/Akt/mTOR. Ингибирование

аутофагии или Beclin-1/Atg5 с помощью миРНК усиливает апоптоз при обработке клеток урсоловой кислотой [Shin, Kim, Park, 2012]. На линии MCF-7 также обнаружено развитие аутофагии и стресса ЭПР в ответ на воздействие урсоловой кислотой как защиты клетки от апоптоза [Zhao et al., 2013], причем этот эффект обусловлен активацией MAPK1/3, а не ингибированием PI3K/Akt/mTOR пути. Есть и противоположные данные, где исследовалось влияние повышенного уровня глюкозы при диабете на мезангиальные клетки [Lu et al., 2015]. Воздействие урсоловой кислотой в таких условиях приводит усиливает экспрессию PTEN и ингибирует PI3K/Akt/mTOR путь, а также экспрессию миРНК-21, которая усиливается при высоких уровнях глюкозы. При этом наблюдалось усиление аутофагии, по всей видимости, для уменьшения накопления внеклеточного матрикса и ослабления клеточной гипертрофии и пролиферации.

Несмотря на многочисленные данные о способности урсоловой кислоты индуцировать апоптоз и некроз, имеются данные и запуске непрограммируемой клеточной смерти – некрозе [Lu et al., 2014]. Авторы инкубировали клеточную линию множественной глиобластомы DBTRG-05MG с урсоловой кислотой, однако, несмотря на массовую гибель клеток, признаков апоптоза или аутофагии обнаружено не было. Отмечено повышение уровня активных форм кислорода и высвобождение из митохондрий ионов  $Ca^{2+}$ . Изменения морфологии клеток свидетельствовали о некротической смерти, но поиски признаков некроптоза также не увенчались успехом, из чего авторами был сделан вывод о способности урсоловой кислоты вызывать некроз.

Подводя итог по имеющейся информации о механизмах действия урсоловой кислоты, можно сказать, что, несмотря на большое количество информации, к единому мнению прийти все еще не удалось, и исследования в этой области по-прежнему остаются актуальными.

Для другой тритерпеновой кислоты урсанового ряда, помоловой, обнаружены цитотоксические свойства, причем эффективная доза была сопоставима с действием препарата, используемого в терапии [Numata et al., 1989]. Обнаружено, что помоловая кислота способна тормозить рост культуры раковых клеток посредством ингибирования ферментов [Youn et al., 2012] и индукцией апоптоза [Schinella et al., 2008]. Имеются данные и о противовоспалительном действии помоловой кислоты [Schinella et al., 2008] и преодолении лекарственной резистентности [Fernandes et al., 2007].

#### 1.4. Апоптоз как основной механизм антинеопластического действия

В настоящее время клеточную смерть классифицируют на апоптоз, аутофагию, некроз и ороговение, а также предварительные определения атипичных клеточных смертей,



например, параптоз, митотическая катастрофа, аноикс, эксцитотоксичность, валлерова дегенерация, пироптоз, пиронекроз, энтоз и т. д. [Kroemer et al., 2009]. Из вышеперечисленных типов клеточной смерти по крайней мере три, апоптоз, параптоз и аутофагия, относятся к программируемой клеточной смерти на основании их морфологических черт [Sperandio et al., 2010].

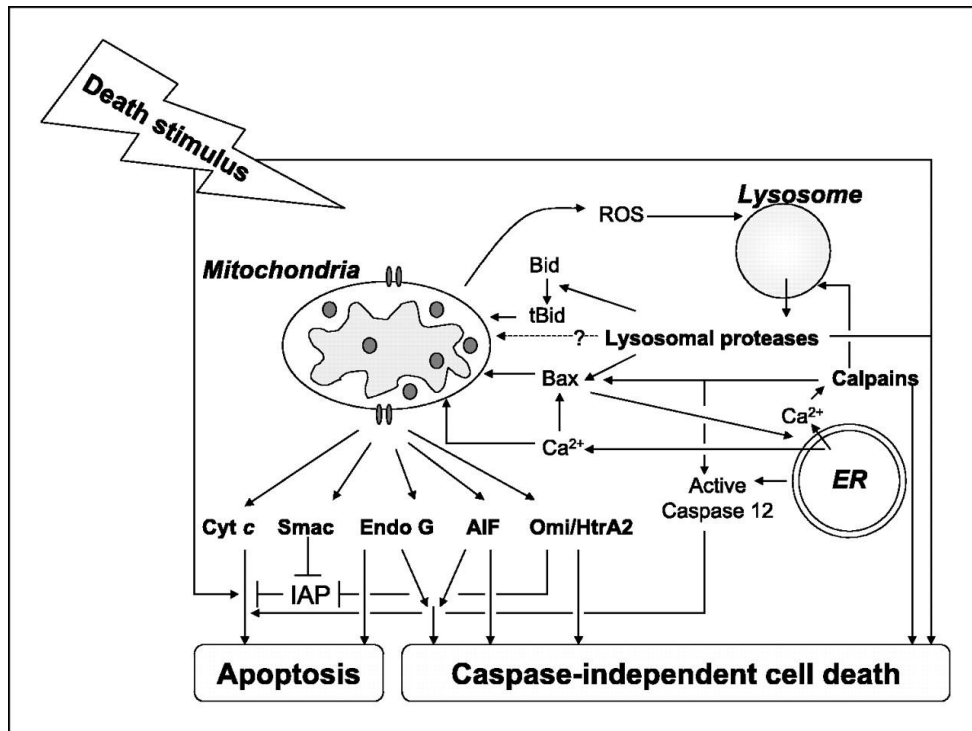


Рис. 7. Взаимодействие клеточных органелл во время гибели клетки [Bröker, Kruyt, Giaccone, 2005].

Программируемая клеточная смерть во время развития и гомеостаза тканей классифицируется в три основных типа [Bröker, Kruyt, Giaccone, 2005] (Рис. 7): первый тип, также известный как ядерный или апоптотический; второй тип, аутофагический; и третий тип, нелизосомальная вакуолярная дегенерация, также называемая параптозом [Sperandio et al., 2010]. Процессы поддержания жизнедеятельности и гибели клеток имеют важное значение для тканевого гомеостаза и поддержания нормального роста и развития многоклеточных организмов [Lowe, Lin, 2000] (Рис. 8).

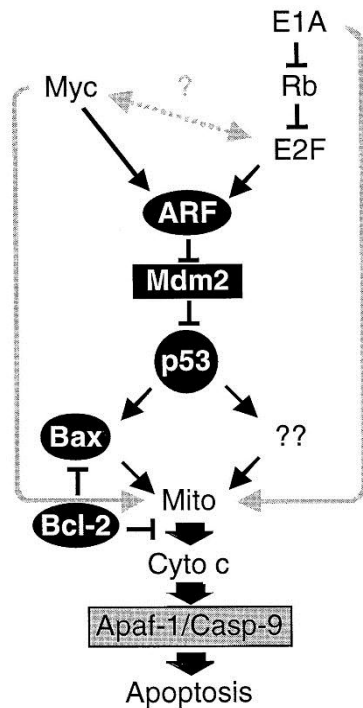


Рис. 8. Онкоген-индуцированный апоптоз [Lowe, Lin, 2000].

Апоптоз – это каспазозависимый процесс, который морфологически проявляется во фрагментации ядра, сжатии клетки, конденсации хроматина, пузырении мембран и формировании апоптотических телец [Gerl, Vaux, 2005]. Он играет важную роль в эмбриогенезе и клеточном гомеостазе, а также позволяет путем сложных механизмов удалять инфицированные, повреждённые или мутантные клетки [Lowe, Lin, 2000].

Индукцировать апоптоз можно двумя сигнальными путями: внешним путем, или рецептор-зависимым; и внутренним путем, или митохондриальным (Рис. 9).

Путь с участием рецепторов клеточной гибели заключается в межмембранных рецептор-опосредованных взаимодействиях, которые включают суперсемейство рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) [Chicheportiche et al., 1997]. В этом пути сигнал о гибели передается от внешнего рецептора через домен смерти, состоящий из 80 аминокислот, с поверхности клетки. Рецепторы клеточной гибели и их лиганды включают FasL/FasR, TNF  $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 и Apo2L/DR5 [Ashkenazi, Dixit, 1998; Chicheportiche et al., 1997; Peter, Krammer, 1998; Rubio-Moscardo et al., 2005; Suliman et al., 2001]. После взаимодействия трансмембранного рецептора с лигандом к нему присоединяются белки-адаптеры, и соответствующий домен смерти связывается с рецептором. К примеру, связывание Fas-лиганда с Fas-рецептором приводит к связыванию адаптера FADD, а взаимодействие TNF-лиганда с TNF-рецептором приводит к связыванию адаптера TRADD с сопутствующим набором FADD и RIP [Hsu, Xiong, Goeddel, 1995;

Kischkel et al., 1995]. FADD затем связывается с прокаспазой-8, а сигнальный комплекс, индуцирующим смерть, формируется в результате активации прокаспазы-8 [Kischkel et al., 1995]. Рецепторы смерти, которые опосредуют апоптоз, могут быть ингибированы белком с-FLIP, который способен связываться с FADD и каспазой-8 с последующей их инактивацией [Kataoka et al., 1998; Scaffidi et al., 1999].

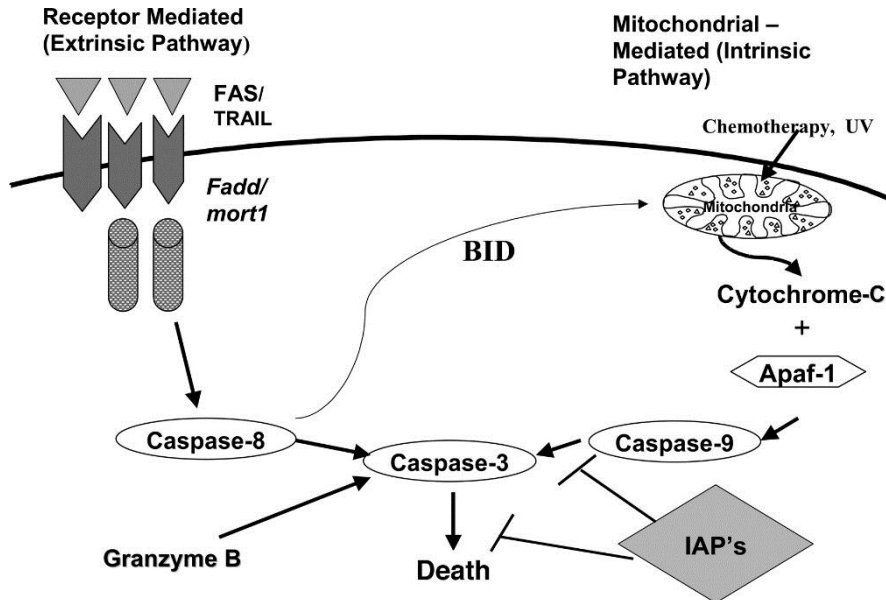


Рис. 9. Внешний и внутренний пути апоптоза [Schimmer, 2004].

Внутренний путь апоптоза, или митохондриальный, включает внутриклеточные стимулы, которые инициируют события внутри клетки. Эти сигналы могут вызывать изменения внутренней митохондриальной мембраны, в результате чего открываются поры на внешней мембране. Это приводит к потере мембранного потенциала и высвобождению двух групп проапоптогенных белков из межмембранного пространства в цитозоль [Saelens et al., 2004]. Первая группа содержит цитохром с, а также митохондриальные активаторы каспаз (Smac)/ направляющие IAP связывающие белки с низким pI (DIABLO) и сериновые протеазы HtrA2/Omi [Du et al., 2000; Garrido et al., 2006]. Эти белки и активируют каспазозависимый митохондриальный путь. Цитохром с связывает и активирует белок Apaf-1 также хорошо, как прокаспазу-9, формируя апоптосому [Chinnaiyan, 1999; Hill et al., 2004]. Сообщается, что Smac/DIABLO и HtrA2/Omi способствуют апоптозу, ингибируя активность IAP (белков-ингибиторов апоптоза) [Loo van et al., 2002; Schimmer, 2004]. Вторая группа проапоптогенных белков состоит из белков AIF, CAD и эндонуклеазы G, она высвобождается позднее из митохондрий во время апоптоза. Семейство белков Bcl-2 контролирует и регулирует события митохондриального апоптоза [Cory, Adams, 2002]. Ген-

супрессор опухоли, p53, регулирует семейство Bcl-2, однако точный механизм этого до сих пор неясен [Schuler, Green, 2001]. Семейство Bcl-2 также контролирует проницаемость митохондриальной мембраны и может либо способствовать апоптозу (белки Bcl-10, Вах, Вак, Bid, Bad, Bim, Bik, and Blk), либо препятствовать ему (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, Bcl-xS, Bcl-w, BAG). Эти белки играют очень важную роль в определении судьбы клетки. Семейство Bcl-2 регулирует высвобождение цитохрома c из митохондрий, изменяя проницаемость митохондриальной мембраны.

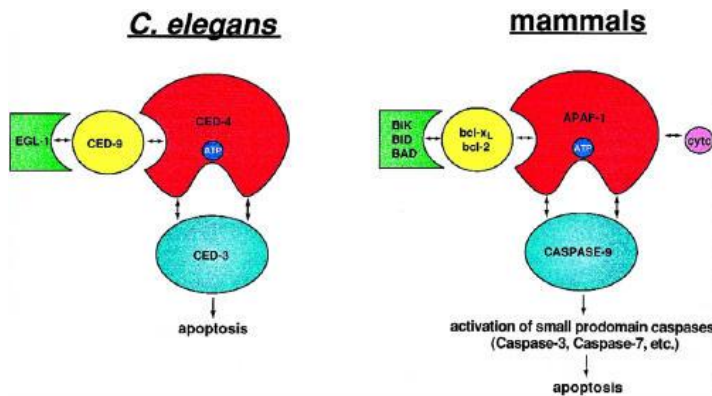


Рис. 10. Формирование апоптосомы у эукариот [Chinnaiyan, 1999].

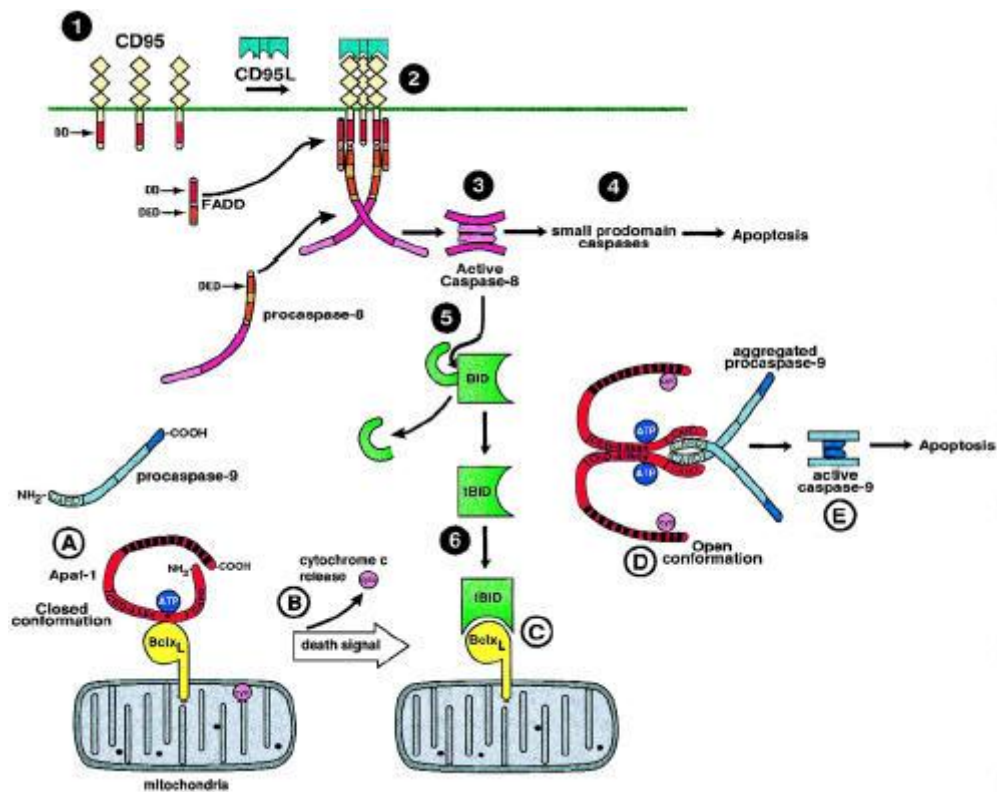


Рис. 11. Активация каспаз в митохондриальном пути запуска апоптоза [Chinnaiyan, 1999]

Оба пути апоптоза при определенных обстоятельствах могут вызывать перекрестные помехи друг другу, тем самым дополнительно его стимулируюя. Примером

может быть повреждение митохондрий при Fas-пути апоптоза, который опосредован расщеплением белка Bad каспазой-8 [Igney, Grammer, 2002]. Bad связан с семейством многофункциональных фосфосерин-связывающих молекул. Когда Bad фосфорилирован, он локализован в цитозоле, а после дефосфолирования перемещается в митохондрии, тем самым высвобождая цитохром с. Другая роль Bad заключается в гетеродимеризации с Bcl-xL или Bcl-2, предупреждении их защитного эффекта и содействии клеточной смерти [Yang et al., 1995]. Bcl-xL и Bcl-2 ингибируют высвобождение цитохрома с из митохондрий в случае, если они не связаны с Bad. Предполагается, что Bcl-xL и Bcl-2 ингибируют апоптоз, преимущественно контролируя активацию каспазных протеаз [Newmeyer et al., 2000]. Дополнительно белок Aven связывает Bcl-xL и Araf-1 и предотвращает активацию прокаспазы-9 [Chau et al., 2000]. Имеются данные, подтверждающие взаимную регуляцию между этими двумя белками, когда сверхэкспрессия одного белка (Bcl-2 или Bcl-xL) снижает сверхэкспрессию другого.

Завершается апоптоз фазой деградации, заключающейся в активации исполняющих каспаз (Рис. 12). Они активируют цитоплазматические эндонуклеазы и протеазы, которые вызывают деградацию ядерного материала, ядерных и цитоскелетных белков соответственно. Каспаза-3, каспаза-6 и каспаза-7 функционируют как каспазы-эффекторы или «палачи». Они расщепляют разнообразные субстраты, включая цитокератин, поли-(АДФ-рибоза)-полимеразу, плазматический мембранный белок  $\alpha$ -фодрин, ядерный белок митотического аппарата и так далее. Все эти события касаются морфологических и биохимических изменений, обычно наблюдаемых в апоптозных клетках [Slee, Adrain, Martin, 2001].

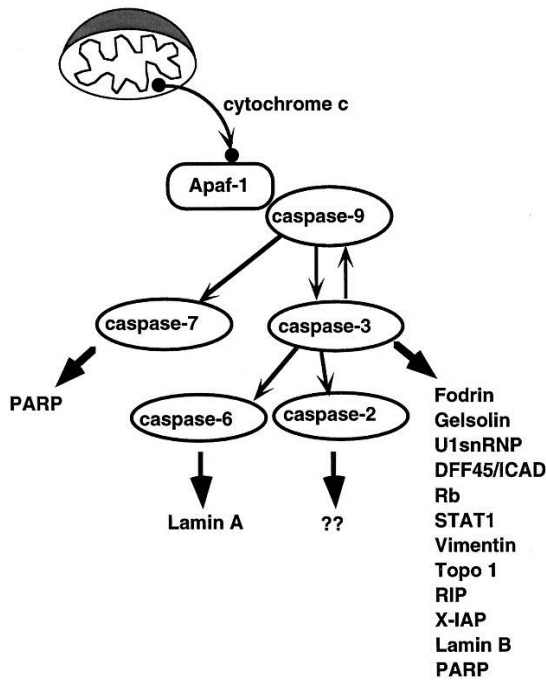


Рис. 12. Каскад активации каспаз при индукции апоптоза [Slee, Adrain, Martin, 2001]

Каспаза-3 является наиболее важной из эффекторных каспаз и активируется инициаторными каспазой-8, -9 и -10. Каспаза-3 активирует эндонуклеазу CAD. В пролиферирующих клетках CAD образует комплекс со своим ингибитором ICAD, но в апоптотических клетках активированная каспаза-9 расщепляет ICAD для высвобождения CAD [Sakahira, Enari, Nagata, 1998]. CAD вызывает конденсацию хроматина через деградацию хромосомной ДНК в ядре. Каспаза-3 также вызывает реорганизацию цитоскелета и распад клетки на апоптотические тельца. Гельсолин, актин-связывающий белок, был идентифицирован как один из ключевых субстратов для активированной каспазы-3. Доказательство предполагает, что митохондрии и ЭПР играют ключевую роль в рецептор-зависимом сигнальном пути.

Следовательно, дерегуляция этих путей в клетке может приводить к лекарственной устойчивости [Srivastava et al., 2007]. Дисбаланс между выживаемостью и апоптозом может привести к ряду заболеваний, включая рак. Раковые опухоли являются примером нарушения регуляции клеточного цикла с сверхпролиферацией клеток и/или уменьшением удаления клеток [King, Cidlowski, 1998]. Супрессия апоптоза является ключевым моментом в развитии и прогрессе некоторых опухолей во время канцерогенеза. Имеются разнообразные молекулярные механизмы, которые раковые клетки используют для подавления апоптоза: или экспрессия антиапоптотических белков, таких как Bcl-2, или снижение либо мутация проапоптотических белков, таких как Bax. Регуляция экспрессии Bcl-2

и Вах находится под контролем гена-супрессора p53 [Miyashita et al., 1994]. Молекулы, участвующие в путях клеточной смерти, являются потенциальными терапевтическими целями в терапии рака. Кроме того, понимание молекулярных механизмов клеточного выживания и путей апоптоза особенно важно для лечения и предупреждения заболеваний. Для предупреждения рака используется ряд природных соединений. Многие из них регулируют окислительный стресс, а другие воздействуют на пролиферацию опухоли и/или апоптоз.

### 1.5. Аутофагия

Под аутофагией подразумеваются клеточные катаболические процессы, в которых целевой цитоплазматический материал транспортируется в лизосомы для деградации [Ravikumar et al., 2010b]. Впервые этот термин использован в 1963 году К. де Ньюом для описания явления пищеварения на разных стадиях, связанного с одно- или двумембранными везикулами, включающими часть цитоплазмы и органеллы. По этому признаку аутофагия отличается от гетерофагии – переваривания клеткой материала, полученного извне. Этот процесс высоко консервативен у эукариот, начиная с дрожжей и заканчивая человеком, и является достаточно масштабным процессом деградации, обеспечивающим процесс обновления долгоживущих белков и органелл. Во время аутофагии фагофоры (или преаутофагосомальные структуры) удлиняются и сливаются, захватывая часть цитоплазмы внутри двумембранных везикул, называемых аутофагосомами. Аутофагосомы вначале сливаются с эндосомами, образуя гибридные органеллы, называемые амфисомами, которые позже сливаются с кислыми лизосомами, после чего захваченное содержимое деградирует (рис. 13).



Рис. 13. Формирование аутолизосом [Ravikumar et al., 2010b].

Помимо вышеописанного, существует еще две формы аутофагии. Первая, шаперон-опосредованная аутофагия, включает избирательную транслокацию цитозольных белков, меченных 5-аминокислотным мотивом с консенсусной последовательностью, через лизосомальную мембрану. Цитозольные шапероны помогают в узнавании и разворачивании целевых белков. Второй формой является микроаутофагия, слабо изученный процесс в клетках млекопитающих, при котором содержимое цитозоля поглощается непосредственно инвагинацией лизосомальной мембраной. Сейчас под термином «аутофагия» обычно подразумевают макроаутофагию, в которой выделяют 3 стадии: инициацию формирования аутофагосом, элонгацию, созревание и слияние.

До сих пор однозначно не определен мембранный источник, из которого образуются аутофагосомы. Предполагается, что аутофагосомы могут либо синтезироваться *de novo* из уже существующих внутриклеточных молекул-предшественниц, либо могут образовываться из внутриклеточных мембранных структур, например, из ЭПР [Axe et al., 2008]. На данный момент существует больше доказательств в пользу образования аутофагосом преимущественно из ЭПР [Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009], так как зарегистрировано их появление в непосредственной близости от него. Более того, на внешней и внутренней поверхности шероховатого ЭПР наблюдались чашеподобные преаутофагосомальные структуры. Накопление этих связанных с ЭПР ранних аутофагических телец нашли в клетках с заблокированным созреванием преаутофагосомальных структур. Однако, эта связь не наблюдалась при созревании преаутофагосом в аутофагосомы. Таким образом, ЭПР вполне может быть одним из мембранных источников, способствующих созреванию преаутофагосомных структур [Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009]. Также имеется гипотеза, что аутофагосомы могут образовываться из митохондрий во время голодания клетки [Hailey et al., 2010], а плазмалемма может быть ключевым участником при формировании предшественников аутофагосом [Ravikumar et al., 2010a]. Формирование аутофагосом требует активности Vps34, фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), продуктом активности которой является фосфатидилинозитол-3-фосфат (PI3P). PI3P играет важную роль на ранних стадиях аутофагии. Недавние исследования показали существенную колокализацию ранних аутофагосомных маркеров в структурах, богатых PI3P, которые формируются при клеточном голодании [Axe et al., 2008]. Точная роль PI3P до сих пор неясна, однако это повышает значимость PI3P-эффektorных белков в формировании аутофагосом. Недавно идентифицированный белок млекопитающих WIPI-1, также известный как Atg18 гомолог, способен связываться с PI3P и оказываться в аутофагосомальных мембранах, особенно при индукции аутофагии [Proikas-Cezanne et al., 2007]. Небольшая ГТФаза Rab5, ранний



эндоцитозный белок, взаимодействует с Vps34 и активирует ее, тем самым усиливая апоптоз [Christoforidis et al., 1999; Shin et al., 2005]. Напротив, ингибирование Vps34, например, 3-метиладенином или вортманнином, приводит к торможению формирования аутофагосом [Blommaert et al., 1997; Petiot et al., 2000; Seglen, Gordon, 1982].

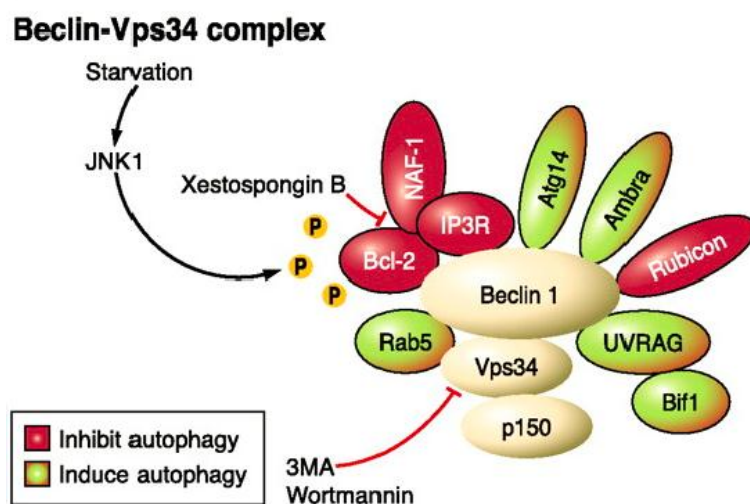


Рис. 14. Vps34 как часть макромолекулярного комплекса, регулирующего аутофагию (PI3K комплекса) [Furuya et al., 2005].

Vps34 является частью макромолекулярного комплекса, регулирующего аутофагию (PI3K комплекса) [Itakura et al., 2008; Kihara et al., 2001; Sun et al., 2008]. Активность Vps34 усиливается его взаимодействием с Beclin-1 [Furuya et al., 2005] (Рис. 14). Идентифицировано несколько белков, связывающихся с Beclin-1, и разрушение их взаимодействия с Beclin-1 влияет на формирование аутофагосом. Партнерами Beclin-1, индуцирующими аутофагию, являются ambra1 [Fimia et al., 2007], UVRAG [Liang et al., 2006] и bif-1 [Takahashi et al., 2007]. С другой стороны, связывание антиапоптотических белков Bcl-2 или Bcl-X<sub>L</sub> с Beclin-1 ингибирует аутофагию [Pattingre et al., 2005]. Также инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор (IPR), который может связываться с Bcl-2, также может взаимодействовать с Beclin-1. Антагонист IP3R ксестоспонгин В нарушает это взаимодействие и индуцирует аутофагию [Vicencio et al., 2009]. Взаимодействие между Beclin-1 и Bcl-2 также снижается ксестоспонгином В, даже если этот препарат не воздействует на связь IP3R и Bcl-2 [Criollo et al., 2007]. Недавно была обнаружена другая составляющая IP3R комплекса, NAF-1, которая действует в ЭПР [Chang et al., 2010]. NAF-1 взаимодействует с Bcl-2 и ЭПР, тем самым стабилизируя комплекс Bcl-2 и Beclin-1, в то время как нокдаун по NAF-1 дестабилизирует его и способствует аутофагии [Chang et al., 2010]. Активация с-Jun N-концевой киназы (JNK1) во время голодания приводит к

фосфорилированию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-X<sub>L</sub> и их освобождению от связывания с Beclin-1, таким образом, индуцируя формирование аутофагосом [Wei et al., 2008].

Второй этап, элонгация, вероятно, требует дополнительного поступления мембран от других органелл (Рис. 15). Atg9 – один из белков, который мог бы выполнять эту функцию, так как он является транс-мембранным белком, который циркулирует между сетью *транс*-Гольджи и эндосомами, возможно, перенося мембраны для расширения фагофор [Young et al., 2006].

Две убиквитин-подобных реакции вовлечены в элонгацию преаутофагосомальных структур. В первой реакции убиквитин-подобный белок Atg12 ковалентно связывается с Atg5 [Kabeya et al., 2000]. Atg12 сначала активируется Atg7 (E1-убиквитин-подобный активирующий фермент), затем переносится на Atg10 (E2-убиквитин-подобный конъюгирующий фермент) и, наконец, связывается COOH-группой конечного глицина с лизиновым остатком (K130) Atg5 [Kabeya et al., 2000]. Atg12-Atg5 затем формирует конъюгат с Atg16L1 (Atg12-Atg5.Atg16L1), приводя в итоге к образованию 800 кДа комплекса, содержащего тетрамеры Atg12-Atg5.Atg16L1, которые связаны посредством спираль-спирального домена Atg16L1 [Mizushima et al., 2003]. Этот комплекс необходим для элонгации преаутофагосомальной мембраны, но отделяется от полностью сформированной аутофагосомы.

Вторая убиквитин-подобная реакция включает белок, ассоциированный с микротрубочками (MAP1-LC3/LC3/Atg8). LC3 (light chain 3) синтезируется как предшественник и расщепляется по С-концу протеазой Atg4B [Nemelaar et al., 2003; Tanida et al., 2004], что приводит к образованию его цитозольной формы LC3-I. LC3-I конъюгирует с фосфатидилэтаноламином (PE) в реакции, включающей Atg7 (E1-подобный) и Atg3 (E2-подобный), образуя LC3-II [Kabeya et al., 2000; Tanida, Ueno, Kominami, 2004]. LC3-II специфично нацелен на элонгацию аутофагосомной мембраны и, в отличие от Atg12-Atg5.Atg16L1 комплекса, остается на сформированной аутофагосоме до ее слияния с лизосомой, после которого LC3-II с цитоплазматической поверхности аутолизосомы может быть расщеплен Atg4 и переработан [Tanida et al., 2004]. LC3 также обнаружен на внутренней поверхности аутофагосом и поэтому деградирует внутри аутолизосомы. Относительно специфичное связывание LC3-II с аутофагосомой делает его отличным маркером для исследования аутофагии [Klionsky et al., 2008].

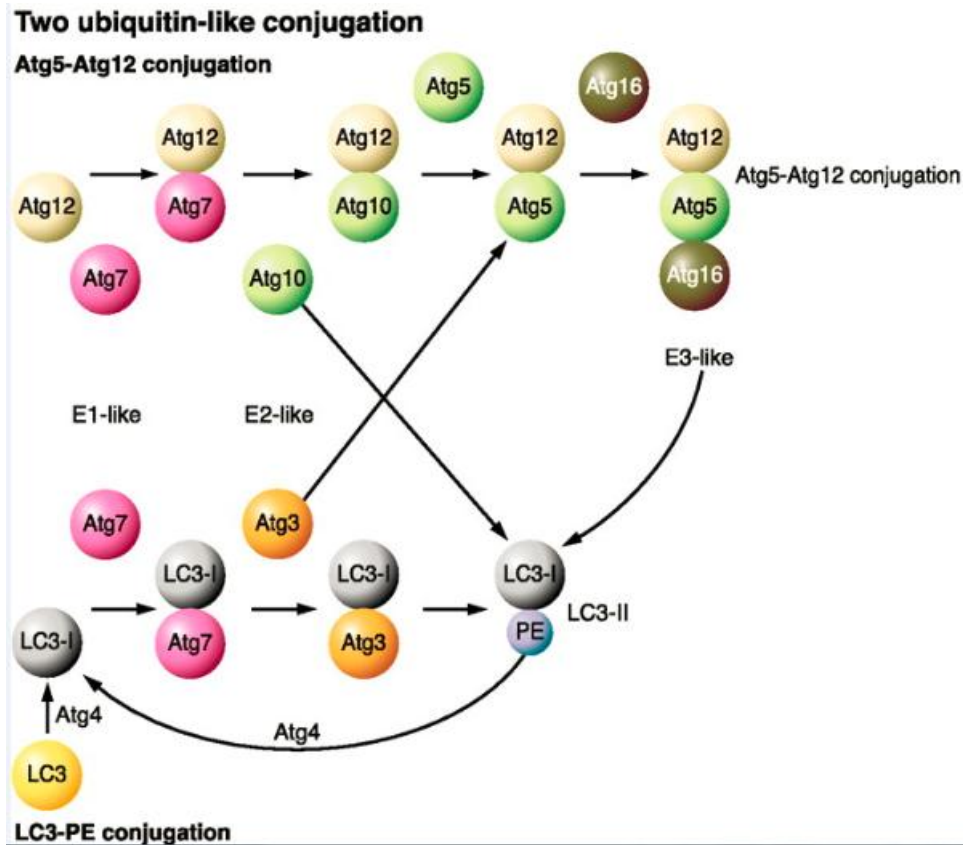


Рис. 15. Этап элонгации в процессе аутофагии [Ravikumar et al., 2010b].

Между двумя убиквитин-подобными системами случаются перекресты. Atg12-Atg5-Atg16L1 может функционировать как в E3-убиквитин-подобной лигазе, тем самым облегчая конъюгацию с PE [Hanada et al., 2007]. Считается, что Atg16L1 комплекс приносит LC3 к месту липидирования для финальной конъюгации с PE, но механизм, с помощью которого LC3 определяет специфические мембраны, до сих пор неясен [Fujita et al., 2008a]. Atg10 может взаимодействовать с LC3 и облегчать конъюгацию LC3 с PE [Nemoto et al., 2003]. LC3 может быть посредником в привязывании и полуслиянии мембран, эти функции могут быть критическими для расширения и/или содействия окончательному слиянию двойных мембранных полусфер в закрытые везикулы [Nakatogawa, Ichimura, Ohsumi, 2007]. Согласно этой гипотезе, потеря Atg3 или мутация, приводящая к потере функциональности в Atg4B, приведут к снижению слияния отдельных мембран [Fujita et al., 2008b; Sou et al., 2008].

Завершающей стадией является созревание и слияние. В отличие от дрожжей, у которых аутофагосомы формируются в определенном месте рядом с вакуолью, аутофагосомы млекопитающих образуются в цитоплазме случайным образом. Аутофагосомы двигаются в двух направлениях по микротрубочкам, но преимущественно к центру организации микротрубочек (ЦОМТу), где находится скопление лизосом. Этот

транспорт требует функционирования моторного белка динеина [Kimura, Noda, Yoshimori, 2008; Ravikumar et al., 2010b; Williams et al., 2008]. Деполимеризация микротрубочек или ингибирование динеин-зависимого транспорта приводит к ингибированию аутофагии [Köchl et al., 2006; Webb, Ravikumar, Rubinsztein, 2004]. Сперва аутофагосомы сливаются с эндосомами, а затем с лизосомами, на чем судьба аутофагосом заканчивается. Этап слияния задействует такие белки, как ESCRT, SNAREs, Rab7 и класс C Vps белков [Atlashkin et al., 2003; Filimonenko et al., 2007; Gutierrez et al., 2004; Jäger et al., 2004; Lee et al., 2007a; Rusten et al., 2007]. Мутация или потеря белков, важных для формирования мультивезикулярных телец (например, ESCRT), приводит к ингибированию созревания аутофагосом [Filimonenko et al., 2007; Lee et al., 2007a; Rusten et al., 2007]. UVRAG, связывающий Beclin-1 белок, также участвует в этапе созревания, способствуя слиянию везикул в аутофагосомы, причем эта функция не зависит от его связывания с Beclin-1 [Liang et al., 2008]. UVRAG набирает Vps белки и посредством этого взаимодействия активирует Rab7, тем самым способствуя слиянию с поздними эндосомами и лизосомами [Liang et al., 2008]. Недавно идентифицированный белок Rubicon, взаимодействующий с Beclin-1, также участвует в созревании аутофагосом. Rubicon считается частью отдельного Beclin-1 комплекса, содержащего также hVps34, hVps15 и UVRAG, который подавляет созревание аутофагосом [Matsunaga и др., 2009; Zhong и др., 2009]. Однако требуются дополнительные исследования для более точной характеристики различных комплексов Beclin-1 и пути, в котором они задействованы в аутофагии.

Правильная работа лизосом также необходима для успешного процесса слияния. Ингибирование лизосомальной  $H^+$ -АТФазы препаратами, например, бафиломицином А1, ингибирует слияние аутофагосом с эндосомами/эндолизосомами [Yamamoto et al., 1998]. Это может быть из-за кислотности лизосом, необходимой для нормального слияния. Тем не менее, точный механизм до сих пор неизвестен.

Аутофагия необходима для поддержания гомеостаза, который вовлекает деградацию белков для энергетических нужд, и для удаления поврежденных субстратов для их биосинтеза *de novo*. Как результат, аутофагия очень важна для поддержания жизнедеятельности клетки в различных условиях, таких, как агрегация белков из-за стресса, недостаток питания и ростовых факторов, стресс ЭПР и патогенные инфекции. Аутофагия блокирует чувствительность клеток к ряду проапоптотических стимулов, особенно тех, которые действуют через внутренний (митохондриальный) путь [Boya et al., 2005; Ravikumar et al., 2006]. Некоторые из этих эффектов могут быть отнесены к вторичным эффектам долгосрочной блокады аутофагии, например, накопление p62 замедляет доставку убиквитинированных субстратов в протеасому, что приводит к накоплению таких белков,

как p53 [Korolchuk et al., 2009]. Однако как генетические, так и химические индукторы аутофагии действуют mTOR-зависимыми и независимыми путями, также защищая от последующих проапоптотических повреждений в клетке, проявляя защитный эффект аутофагии в ряде случаев [Ravikumar et al., 2006; Sarkar et al., 2007]. Этот защитный эффект не просто функция аутофагии по освобождению топлива для клеток, но, по-видимому, он связан с уменьшением количества митохондрий (или количества митохондрий вследствие митофагии). Это, в свою очередь, приводит к уменьшению выброса токсичных молекул, например, цитохрома c, из митохондрий в ответ на проапоптотических повреждения [Ravikumar et al., 2006].

Хотя аутофагия в целом и считается цитопротективным процессом, повышенное количество аутофагосом в умирающих клетках привело к концепции аутофагической клеточной смерти (иногда называемой клеточной смертью II типа). В некоторых случаях, например, при хлорохин-индуцированной миопатии [Schmalbruch, 1980], токсичность явно не связана с усилением аутофагии, так как хлорохин является слабым основанием, что предотвращает закисление лизосом и уменьшает их слияние с аутофагосомами. Таким образом, в некоторых случаях увеличение числа аутофагосом в умирающих клетках может быть следствием снижения расщепления аутофагического субстрата. В иных случаях клетка может гибнуть параллельно с процессом аутофагии, но не из-за нее, если были активированы общие каскады реакций. Однако более привлекательной выглядит модель, в которой аутофагическая смерть (связанная с увеличением числа аутофагосом) сперва наблюдается в развитии или в процессе гомеостаза, при котором лишние клетки должны быть ликвидированы. Но эта модель опровергается наблюдениями на *C. elegans* [Takacs-Vellai et al., 2005], нокаутных по гену *Becn-1*, и нокаутных по *Becn-1* или *Atg5* мышцах [Qu et al., 2007], проявляющих увеличение клеточной смерти. В общем, роль аутофагии в клеточной смерти млекопитающих остается неясной, хотя некоторые исследования предполагают, что аутофагия может регулировать клеточную смерть в нормальных клетках в условиях стресса.

Было высказано предположение, что аутофагия может приводить к клеточной смерти из-за чрезмерной деградации компонентов клетки. Эта модель подтверждается исследованиями, в которых мутанты по *Becn-1*, неспособные связывать *Bcl-2*, индуцируют излишнюю аутофагию и клеточную смерть, которая может быть ингибирована миРНК против *Atg5* [Patingre et al., 2005]. У мутантов *D. melanogaster* сверхэкспрессия постоянно активного *Atg1* индуцирует интенсивную аутофагию и раннее разрушение слюнных желез, что может быть заблокировано удалением *Atg12*, но не сверхэкспрессией ингибитора апоптоза p35 [Scott, Juhász, Neufeld, 2007]. Возможно, что некоторые из этих эффектов

могут быть обусловлены функциями этих генов, которые не зависят от аутофагии. Например, *Becn1-1* нокаутные мыши показали эмбриональную смертность, в то время как нокаутные по *Atg5* и *Atg7* мыши (у которых отсутствовала аутофагия) рождались живыми. Более того, *Atg1* по-видимому модулирует клеточный рост, ингибируя активность *S6*-киназы, которая регулирует клеточный рост, и некоторые из этих эффектов могут не зависеть от аутофагии [Lee et al., 2007b].

Есть мнение, что аутофагия способствует клеточной смерти, когда химические ингибиторы аутофагии снижают токсичность. Например, ингибитор аутофагии 3-МА снижает клеточную смерть в клетках TNF-индуцированного Т-лимфобластного лейкоза [Jia et al., 1997], а также в симпатических нейронах, лишенных фактора роста нервов [Хуе, Fletcher, Tolkovsky, 1999], в хлорохин-индуцированных кортикальных нейронах [Zaidi et al., 2001] и ряде других [Canu et al., 2005; Uchiyama, 2001]. В этих экспериментах по ингибированию аутофагии не достаточно ясно, произошло ли ингибирование аутофагии как защитного механизма, или же защита обусловлена мишенями для ингибитора, которые не зависят от аутофагии. Также считается, что аутофагия может непосредственно убивать клетки, когда отсутствует процесс апоптоза. Клеточная смерть блокируется, когда *Atg7* или *Becn1-1* нокаутируются РНК интерференцией в клетках, обработанных пан-ингибитором каспаз *zVAD* [Yu et al., 2004]. Также РНК интерференция против *Atg5* и *Becn1-1* блокирует клеточную смерть в клетках, нокаутированных по генам *bax* и *bak*, индуцированную этопозидом [Shimizu et al., 2004]. Однако важно отметить, что смерть от аутофагии наблюдается в условиях дефицита апоптоза, а не физиологических условий.

Итак, клеточная гибель вследствие аутофагии наблюдается при химическом ингибировании, чрезмерной индукции аутофагии или недостатке апоптоза, но не от физиологических условий. Более того, до сих пор непонятно, существует ли физиологически аутофагическая клеточная смерть по ряду признаков [Kroemer, Levine, 2008; Mizushima et al., 2008]. Однако многочисленные данные свидетельствуют о перекрывающихся связях между аутофагией и апоптозом. Взаимодействие между апоптозом и аутофагией предполагает, что может существовать координация между этими путями, которая может быть важной на протяжении развития и гомеостаза. Белки смерти из семейства протеинкиназ (DAPK) и DAPK-связанная протеинкиназа-1 (DPR-1) индуцируют клеточную смерть, зависимую от активности киназ, но DAPK и DPR-1 также индуцируют аутофагию в апоптозорезистентных клетках [Inbal et al., 2002]. Мощный ингибитор апоптоза *Bcl-2* также ингибирует аутофагию, индуцированную голоданием, его непосредственным взаимодействием с *Becn1-1*. Интересно, что ингибирует аутофагию только нацеленный на ЭПР *Bcl-2*, но не на митохондрии [Patingre et al., 2005]. Белок-

супрессор опухолей p53 может трансаktivировать гены, индуцирующие аутофагию. В условиях генотоксического стресса аутофагия может быть запущена p53-зависимым путем [Feng et al., 2005]. Также было обнаружено, что инактивация p53 запускает аутофагию, на основании чего появилось предположение, что цитоплазматический p53 может действовать как репрессор аутофагии. Atg5 критически важен для аутофагии на стадии синтеза предшественников аутофагосом [Kametaka et al., 1996; Kuma et al., 2004]. Было показано, что Atg5 расщепляется кальпаинами. Активность по индукции смерти этой укороченной формы Atg5 наблюдалась в отсутствие аутофагии. Вместо этого, этот продукт мог инактивировать антиапоптотическую активность Bcl-xL, вытесняя Bcl-xL-Bax комплексы, способствуя таким образом Bax олигомеризации. Активация каспаз в результате этого процесса будет способствовать дальнейшему снижению синтеза аутофагосом, расщепляя Beclin-1 [Luo, Rubinsztein, 2010]. Таким образом, активация кальпаина может способствовать аутофагии несколькими способами.

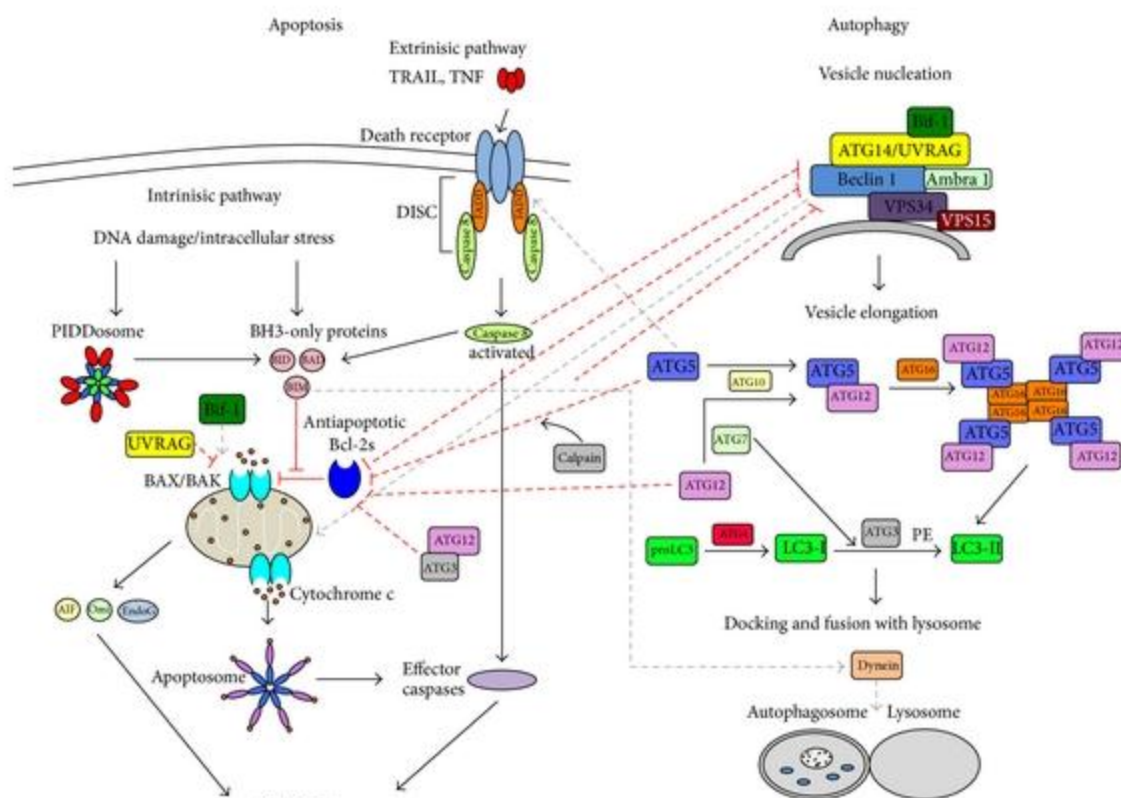


Рис. 16. Перекрывание сигнальных путей аутофагии и апоптоза. [Su et al., 2013].

Общие факторы и компоненты, а также связи между аутофагией и апоптозом свидетельствуют, что механизм совместной регуляции обоих путей может быть важным в

разных аспектах, например, развитии, поддержании гомеостаза в тканях, появления болезни.

### 1.6. Параптоз

Понятие параптоза появилось в 2000 году для описания способа программируемой клеточной смерти, морфологически и биохимически отличной от апоптоза [Sperandio, Belle de, Bredesen, 2000]. Основной чертой параптоза является вакуоляризация клетки вследствие набухания ЭПР и/или митохондрий. Молекулярные механизмы параптоза до сих пор неясны, но они существенно отличаются не только апоптоза, но и от аутофагии и некроза (табл. 2).

Табл. 2. Сравнение апоптоза, некроза и параптоза.

	<b>Апоптоз</b>	<b>Некроз</b>	<b>Параптоз</b>
<b>Морфология</b>			
Фрагментация ядра	+	–	–
Конденсация хроматина	+	–	±
Апоптотические тельца	+	–	–
Вакуоляризация цитоплазмы	–	+	+
Набухание митохондрий	иногда	+	позднее
<b>Активность каспаз</b>			
DEVD-расщепляющая активность*	+	–	–
Созревание каспазы-3	+	–	–
Расщепление PARP**	+ (фрагмент 85-кДа)	+ (от 50- до 62-кДа фрагменты)	–
<b>Ингибируется</b>			
p35	+	–	–
Bcl-x <sub>L</sub>	+	обычно –	–
Актиномицин D	иногда	–	+
Циклогексимид	иногда	–	+

\*DEVD – Asp-Glu-Val-Asp; \*\*PARP – поли(АДФ-рибоза)полимераза.

Как говорилось выше, основной чертой параптоза является цитоплазматическая вакуоляризация, которая начинается с прогрессивного набухания ЭПР и/или митохондрий. Активации каспаз при параптозе обычно не наблюдается, как и формирования апоптотических телец, он нечувствителен к ингибиторам апоптоза (например, ингибиторам



каспаз или Bcl-xL) и требует процессов транскрипции и трансляции [Sperandio et al., 2004; Sperandio, Belle de, Bredesen, 2000]. Показано, что в параптозе принимает участие ряд киназ: MAPK, MEK-2 и JNK [Sperandio et al., 2004].

Программируемая клеточная смерть, имеющая сходство с параптозом, описана при развитии нейронов [Clarke, 1990; Landmesser, Pilar, 1976; Schweichel, Merker, 1973], нейродегенеративных заболеваниях (амиотрофическом боковом склерозе, болезни Хантингтона) [Dal Canto, Gurney, 1994; Turmaine et al., 2000] и других неврологических нарушениях [Majno, Joris, 1995]. Важную роль параптоз может играть в патофизиологии сетчатки: это основной путь смерти пигментных клеток эпителия сетчатки, индуцированной кортикостероидами [Valamanesh et al., 2007], и ганглиозных клеток сетчатки на ранних стадиях глаукомы [Wang et al., 2014] и, наряду с аутофагией, после травмы сетчатки глаза при ишемии и реперфузии [Wei et al., 2015].

Известными стимулами для параптоза являются пара рецептор-лиганд субстанции P с ее рецептором нейрокинина-1 [Castro-Obregón et al., 2002], TAJ/TROY, член суперсемейства TNF-рецепторов [Wang et al., 2004] и эпидермальный фактор роста [Fombonne et al., 2004; Fombonne et al., 2006]. Кроме этого, человеческие клетки глиомы, трансфицированные сверхэкспрессирующимся вектором, кодирующим мембранную форму макрофагального колониестимулирующего фактора, могли быть уничтожены человеческими моноцитами через параптоз [Hoa et al., 2007; Jadus et al., 2003].

Гибель клетки в результате параптоза сопровождается повышением активности белков-маркеров стресса ЭПР, включающих Bip и CHOP, а также накоплением полиубиквитированных белков [Lee et al., 2016]. Эти данные могут указывать на близкую связь между стрессом ЭПР и накоплением белков с неправильным фолдингом. Более того, циклогексимид как ингибитор белкового синтеза может именно по этой причине ингибировать клеточную смерть, связанную с параптозом, снижая нагрузку на белки, обеспечивающие правильный фолдинг. Расширение ЭПР – наиболее распространенная морфологическая особенность параптоза, которая свидетельствует, что ключевым моментом является нарушение активности протеасом. Было высказано предположение, что перегрузка неправильно свернутыми белками в просвете ЭПР может оказывать осмотическое давление, вытягивая воду из цитоплазмы для набухания ЭПР [Mimnaugh et al., 2006]. Так как раковые клетки очень чувствительны к нормальному функционированию протеасом, ингибирование протеасомного аппарата может привести к последующему накоплению неправильно свернутых белков в ЭПР и цитоплазме [Ustundag, Bronk, Gores, 2007], что вызовет угнетение клеток и нарушение ответа на неправильно свернутые белки и ассоциированную с ЭПР деградацию, которые призваны защищать клетки от

протеотоксичности. В конечном счете, серьезные изменения структуре ЭПР приводят к необратимым функциональным нарушениям и смещают клеточный баланс в сторону смерти.

Для тритерпеновых кислот урсанового ряда не показана способность индуцировать параптоз, но есть данные по целастролу, пентациклическому тритерпеновому спирту. Предполагается, что целастрол образует ковалентные связи с белками-мишенями – транскрипционными факторами HSF1, Nrf2, and Atf4, которые регулируют работу генов, участвующих в экспорте активных форм кислорода, фолдинге и круговоре белков [Trott et al., 2008]. Предположительно, здесь важное значение имеет большая электрофильность колец А и В в молекуле целастрола, которые могут легко взаимодействовать с веществами, содержащими нуклеофильные группы (например, сульфгидрильные (-SH) группы белков и глутатион, или гидроксильные группы белков) с образованием ковалентных связей. Нарушение сульфгидрильного гомеостаза и образование ковалентных аддуктов с целастролом может индуцировать неправильный фолдинг белков-мишеней и их накопление, приводящее к вакуоляризации ЭПР. Помимо этого, целастрол ингибирует активность протеасом [Yang et al., 2006], что в результате приводит к гибели клеток. что вполне может быть связано с его высокой тиол-реакционной способностью.

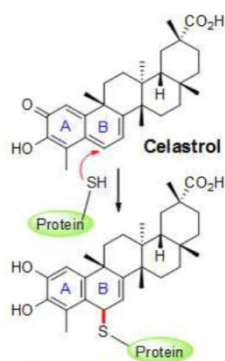


Рис. 17. Кольца А и В целастрола способствуют связыванию с белками-мишенями [Lee et al., 2016].

Во время параптоза также отмечено набухание митохондрий. Эти высоко динамичные органеллы постоянно сливаются, разъединяются и перемещаются внутри клетки. Эти динамические морфологические изменения имеют важное значение для поддержания целостности митохондриальной ДНК, обеспечения дыхательной активности, контроля клеточных процессов (например, гомеостаза кальция и сигнализации), а также регуляции клеточной смерти [Vannuvel et al., 2013]. Во время параптоза у митохондрий отмечается дезорганизация крист, приобретение шарообразной формы, а затем вакуоляризация. Показано, что при индукции параптоза целастролом в клетках образуются

мегамитохондрии в результате набухания нормальных митохондрий [Yoon et al., 2014]. И хотя детальный механизм и патофизиологическое значение формирования мегамитохондрий неизвестно, было высказано предположение, что это адаптивный эффект на изменяющиеся условия окружающей среды [Wakabayashi, 2002]. Набухание и последующее слияние митохондрий в мегамитохондрию обнаружено окончаниях аксонов в нервно-мышечных контактах старых крыс [García, Fernández, Solas, 2013]. Так как образование митохондриальной сети в результате слияния может способствовать депонированию  $\text{Ca}^{2+}$ , высвобожденного из ЭПР или внеклеточных источников [Frieden et al., 2004], образование мегамитохондрии во время параптоза может защищать клетки от клеточной смерти на ранних стадиях. Тем не менее, концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  позже превышает способность мегамитохондрии к накоплению, вызывая необратимые изменения, приводящие к утрате митохондриальной функции и в итоге к гибели клеток.

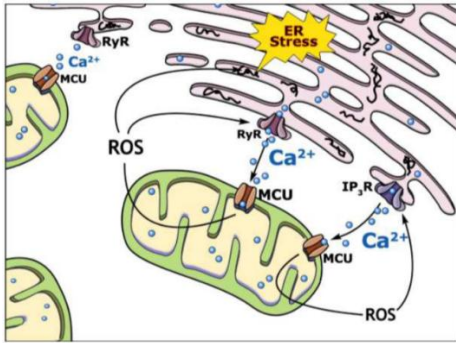


Рис. 18. Взаимодействие стресса ЭПР и аутофагии [Lee et al., 2016].

В качестве возможного объяснения одновременного набухания ЭПР и митохондрий во время параптоза, было высказано предположение, что может существовать положительная обратная связь между генерацией активных форм кислорода и перегрузкой митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$  [Yoon et al., 2012]. Известно, что активные формы кислорода способны открывать кальциевые каналы ЭПР (например, рианодиновые рецепторы и IP3R), высвобождая  $\text{Ca}^{2+}$  [Cao, Kaufman, 2014]. Митохондрии и ЭПР взаимосвязаны физически и функционально митохондриально-ассоциированной ЭПР мембраной, и высвобожденный из ЭПР  $\text{Ca}^{2+}$  захватывается митохондрией с помощью кальциевых транспортеров [Bravo et al., 2012]. Увеличение  $\text{Ca}^{2+}$  стимулирует активность дегидрогеназ цикла Кребса с последующим усилением потребления  $\text{O}_2$  и производства активных форм кислорода [Brand, 2010]. Целастрол индуцирует параптоз именно через этот путь с участием IP3R рецепторов [Yoon et al., 2014]. Таким образом, параптоз может быть путем клеточной смерти,

требующим тесной связи ЭПР и митохондрий через посредничеством  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриально-ассоциированной ЭПР мембране.

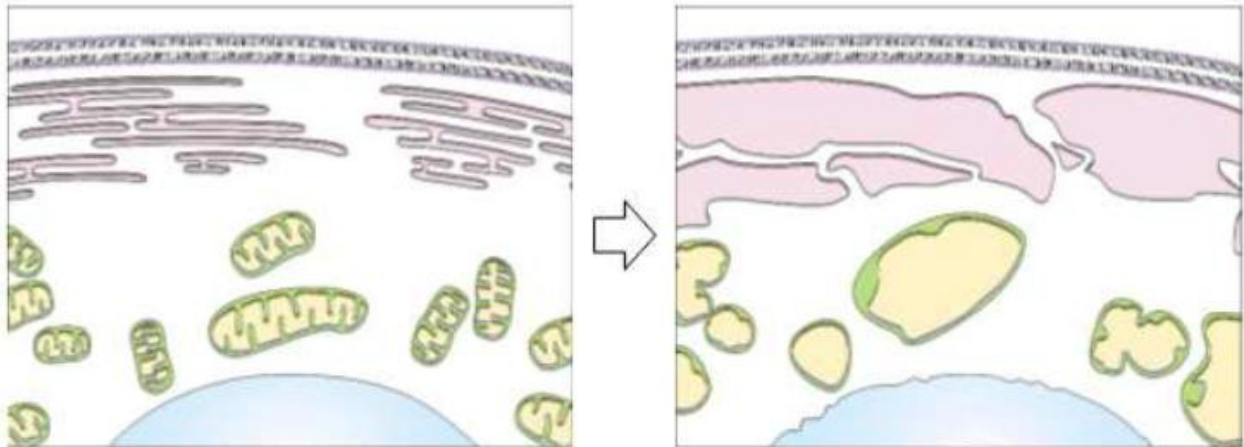


Рис. 19. Стресс ЭПР и образование мегамитохондрии [Lee et al., 2016]

### 1.7. Заключение

Тритерпеновые соединения являются одним из самых разнообразных классов вторичных метаболитов в растительном сырье. Для пентациклических тритерпеновых кислот описаны самые разнообразные биологические эффекты, в том числе избирательная цитотоксичность для онкотрансформированных клеток. В исследованиях сообщается о разных путях запуска апоптоза, аутофагии, параптоза и некроптоза, причем иногда данные о потенциальном механизме могут противоречить друг другу. До сих пор не предложена конкретная мишень для связывания с тритерпенами. Наиболее вероятными кандидатами считаются глюкокортикоидные рецепторы [Kassi et al., 2009; Kassi, Moutsatsou, 2011] на основании структурного сходства глюкокортикоидов и тритерпенов, однако при исследовании взаимодействия молекулярно-биологическими методами все же обнаруживаются некоторые отличия, свидетельствующие о различных механизмах их действия.

В данной работе изучаются цитотоксические свойства тритерпеновых кислот урсанового ряда – урсоловой и помоловой. Основываясь на молекулярном моделировании, предложены потенциальные мишени внешнего пути индукции апоптоза для связывания с тритерпеновыми кислотами урсанового ряда. Экспериментально предположения проверяются с помощью урсоловой кислоты, флуоресцентно меченой FITC – такой подход предлагается впервые. Отработка этого подхода на наиболее изученном соединении в своем ряду, урсоловой кислоте, позволит сопоставить полученные в ходе исследования результаты с имеющимися литературными данными и оценить валидность предложенной методики.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

Все растворители, использованные в работе, были отечественного производства (РеаХим), класс ХЧ Тонкослойная хроматография проведена на пластинках Sorbfil. Хроматографическая очистка целевых соединений осуществлялась с помощью силикагеля Армосорб. ХМС-анализы выполнены на приборе Hewlett Packard G 1800 А сотрудником Лаборатории физических методов исследования О. И. Сальниковой. Хроматографическая очистка осуществлялась при помощи колоночной хроматографии на силикагеле Армосорб. Для синтеза использована урсоловая кислота (Sigma) и FITC (Fluka).

В работе использовано три бактериальных штамма. Для SOS-хромотеста использован штамм *E. coli* PQ37 (*sfiA::Mud(Ap lac) cts, lacΔU169, mal<sup>+</sup>, uvrA, galE, galY, PhoC, rfa*), предоставленный Ф. Киларде. В тесте Эймса использованы штаммы *S. typhimurium* TA98 (*rfa, ΔuvrB, +R*) и TA102 (*rfa, +, +R*), любезно предоставленные Б. Эймсом.

Использовались стандартные мутагены: NQO, t-BuO<sub>2</sub>H и бензо[α]пирен, субстраты PNPP и ONPG, антибиотики ампициллин и тетрациклин (Sigma). S9-индуцированная микросомальная фракция печени крыс была любезно предоставлена к. б. н. В. И. Калединым. Бакто-Агар особой чистоты был произведен фирмой Difco (США). Измерение оптической плотности в бактериальных тестах производилось на спектрофотометре фирмы Varian (США).

Культуральные работы выполнены в секторе клеточных технологий ИЦиГ СО РАН. Использована среда IMDM с 10% содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США). МТТ-реагент предоставлен фирмой Sigma (США). Оптическая плотность измерялась с помощью спектрофотометра Multiskan RC (ThermoFischer Scientific, Финляндия).

Для исследования клеточной морфологии использован микроскоп AxioStar Plus (Carl Zeiss), фотографии препаратов сделаны с использованием камеры AxioCamICc3 (Carl Zeiss).

Детекция апоптоза осуществлялась с помощью PE Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Pharmingen, США) на приборе BD FACSDiva (BD Biosciences, Сан-Хосе, США). Исследование апоптоза при двойном окрашивании бромистым этидием и акрилинновым оранжевым выполнено на микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss).

2.2. Характеристика растительного сырья *C. angustifolium* и выделение помоловой кислоты

Сырье иван-чая узколистного на территории ЦСБС СО РАН г. Новосибирска в середине и конце вегетационного периода с 2008 по 2010 гг. Измельчение сырья проводилось на электрической мельнице.

**Экстракция сырья.** Воздушно-сухое сырье размолото на электрической мельнице и просеяно через сито с отверстиями размером 2 мм. Экстракция проводилась ступенчато в проточном перколяторе с использованием МТБЭ в качестве экстрагента. Навеска сырья загружалась в перколятор, заливалась порцией экстрагента, нагретого до 50°C, настаивалась в течение 1.5 часа, экстракт сливался через нижний кран. Сырьё заливали растворителем с таким расчётом, чтобы слой растворителя над сырьём был 2 см. Процесс повторяли 4 раза. При смене растворителя остаток экстракта удалялся из перколятора продуванием через сырье воздуха. Порции экстракта выпаривались на роторном испарителе досуха для определения массового выхода экстрактивных веществ.

**Выделение свободных кислот из экстракта.** Навеска исследуемого экстракта растворялась в МТБЭ до получения раствора с концентрацией 5%. 200 мл раствора помещали в делительную воронку и экстрагировали 2%-ным водным раствором едкого натра с добавлением 10% по объему этанола (4×50 мл). Объединенный водный слой, содержащий натриевые соли кислых компонентов, подкисляли 10%-ным водным раствором соляной кислоты до pH 2 и экстрагировали в делительной воронке МТБЭ (4×50 мл). Объединенные эфирные вытяжки отмывали в делительной воронке дистиллированной водой до нейтральной реакции (pH 7), сушили над безводным сульфатом натрия и упаривали досуха на роторном испарителе при пониженном (25 мм рт. ст.) давлении.

**Хроматографическая очистка** фракции свободных кислот осуществлялась при помощи колоночной хроматографии. Для первого цикла разделения использовалась система из гексана и МТБЭ, где соотношение растворителей изменялось от гексан-МТБЭ 9:1 до 4:6. Соотношение тритерпеновых кислот в каждой фракции определялось при помощи ТСХ, наиболее перспективные фракции исследовались при помощи ХМС-анализа.

Последующие этапы очистки осуществлялись на силикагеле армсорб в системе этилацетат-МТБЭ 6:4 до получения фракции с содержанием помоловой кислоты не менее 95% (5-6 циклов очистки). Количественные данные получены с помощью ХМС-анализа.

**Исчерпывающее метилирование кислот диазометаном для ХМС-анализа.** 5 мг кислот растворяли в 100 мкл метанола, затем добавляли 100 мкл диазометана. Окончание реакции определяли по ТСХ реакционной смеси: на ТС-хроматограмме полностью исчезало пятно неметилованных кислот. Полученные метиловые эфиры анализировали свежеприготовленными.

**Хромато-масс-спектрометрический анализ** проведены в лаборатории физических методов исследования НИОХ СО РАН О. И. Сальниковой.

**ЯМР-спектры** записаны в лаборатории физических методов исследования НИОХ СО РАН В. В. Кандауровой.

**Температура плавления** измерена в лаборатории микроанализа НИОХ СО РАН Т. А. Добринской.

2.3. Введение флюоресцентной метки в молекулы тритерпеновых кислот урсанового ряда

Меченые образцы урсоловой кислоты получены в два этапа: вначале синтезированы эпимеры 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -амино-3-дезоксоурсоловой кислоты, затем через полученную аминогруппу вводился FITC.

**Синтез 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -амино-3-дезоксоурсоловых кислот** проводили по методике Брискорна [Brieskorn, Eschelbach, 1979]. Смешали 2 г урсоловой кислоты, растворенной в 160 мл ацетона и 40 мл диэтилового эфира, с 2 мл реактива Джонса при перемешивании. Оставили смесь при перемешивании на 15 мин, затем добавили 200 мл воды и раствор декантировали. Образовавшийся белый осадок 3-оксоурсоловой кислоты отфильтровали и высушили. Получили 1.7 г продукта, данные подтверждены ЯМР-анализом.

К 1.7 г (0.0037 моль) 3-оксоурсоловой кислоты и 2.85 г (0.037 моль) ацетата аммония, растворенным в 55 мл метанола, спустя 10 мин прибавили 0.026 г цианборгидрида натрия и оставили смесь при комнатной температуре при перемешивании на 24 ч. Затем упарили раствор до 15 мл и подкислили концентрированной HCl. Выпавший осадок отцентрифугировали, отмыли водой и высушили. Получили 1.42 г смеси продуктов.

Смесь нанесли на колонку с силикагелем (8.7 г), элюент хлороформ-метанол 9:1, получили 0.4 г урсоловой кислоты и 0.8 г смеси эпимеров. Смесь перекристаллизовали из метанола при охлаждении до +4, получили 0.33 г  $\beta$ -эпимера и 0.18 г  $\alpha$ -эпимера. Оба эпимера охарактеризованы с помощью ЯМР-анализа, измерена температура плавления, данные соответствуют литературным [Brieskorn, Eschelbach, 1979].

**Получение меченных FITC эпимеров** осуществлялось следующим способом. По 20 мг (0.00004 моль) каждого эпимера смешали с 17 мг (0.00004 моль) FITC в 10 мл метанола, оставили смесь при перемешивании при комнатной температуре на ночь. Затем раствор упарили, полученный осадок высушили в пистолете Фишера. Включение метки подтверждено ЯМР-анализом. Элементный анализ выполнен в лаборатории микроанализа НИОХ СО РАН Т. А. Добринской.

2.4. Методы оценки генотоксических и мутагенных свойств. Бактериальные тест-системы.

**SOS-хромотест.** проводился по стандартной методике [Quillardet, Hofnung, 1985] с дополнениями [Mersch-Sundermann, Kevekordes, Mochayedi, 1991]. Ночная культура *E. coli* (штамм PQ37) доращивалась до оптической плотности 0.45 ( $2 \times 10^8$  клеток/мл) со встряхиванием на качалке при 37<sup>0</sup>С. Далее культура разбавлялась LB средой в 10 раз. Аликвоты суспензии бактериальных клеток объемом 600 мкл вносились в пробирку с тестируемым соединением. Образцы инкубировали со встряхиванием в течение 2 ч при температуре 37<sup>0</sup>С, затем проводили анализ активности ферментов.

Для теста с метаболической активацией бактериальная культура разбавлялась в 10 раз активационной смесью (1М КСl 0.33 мл, 1М MgSO<sub>4</sub> 0.08 мл, 1М трис-НСl рН 7.4 1 мл, 1М глюкоза-6-фосфат 0.05 мл, 0.1М НАДФ 0.15 мл, LB среда 6.4 мл, клеточная культура 1 мл, микросомальная фракция печени S9 1 мл), затем инкубировали со встряхиванием в течение 2 ч при температуре 37<sup>0</sup>С, затем проводили анализ активности ферментов.

*Анализ активности β-галактозидазы.* К 30 мкл исследуемого образца добавляли 270 мкл лизирующего буфера В (0.2 М натрий-фосфатный буфер рН 7.75, 0.1 М КСl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.3 mM DTT, 0.1% SDS) и инкубировали в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 10 мин. β-галактозидазную реакцию инициировали добавлением 60 мкл субстрата ONPG (4 мг/мл в 0.1 М натрий-фосфатном буфере, рН 7.0), затем инкубировали в термостате при температуре 37<sup>0</sup> С в течение 25 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

*Анализ активности щелочной фосфатазы.* К 30 мкл исследуемого образца добавляли 270 мкл лизирующего буфера Р (1 М трис-НСl, рН 8.05, 0.1% SDS) и инкубировали в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 10 мин. Реакцию инициировали добавлением 60 мкл субстрата PNPP (4 мг/мл в 1 М трис-НСl, рН 8.05), затем инкубировали в термостате при температуре 37<sup>0</sup> С в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 1.5 М NaOH.

При анализе ферментов в каждой серии образцов был введен контроль, в котором клеточная суспензия заменена на LB среду. В качестве положительного контроля выбран NQO. Все соединения растворялись в DMSO (отрицательный контроль). На каждый образец проводилось по три измерения. Конечный результат представлен в виде фактора индукции I(c), вычисленного по следующей схеме [Quillardet, Hofnung, 1985]:

1) Подсчет единиц активности ферментов EU:



$$EU = \frac{1000 \times OD(405)}{t}$$

где OD(405) – оптическая плотность измеряемого фермента при длине волны 405 нм, t – время инкубации.

2) Отношение единиц активности ферментов:

$$R = \frac{EU(\beta - \text{галактозидаза})}{EU(\text{щелочная фосфатаза})}$$

3) Подсчет фактора индукции I(c):

$$I(c) = \frac{R(c)}{R(0)}$$

где R(c) – отношение единиц активности ферментов при определенной концентрации тестируемых веществ, R(0) – отношение единиц активности ферментов без тестируемых соединений (в данном случае это значение DMSO).

**Тест Эймса** проводился по стандартной методике, предложенной авторами [Maron, Ames, 1983]. Для получения ночной культуры замороженный сток *S. typhimurium* (штамм TA98, (*rfa*, *DuvrB*, +R); штамм TA102 (*rfa*, +, +R) разбавлялся в 100 раз LB и инкубировался при 37°C в течение 16 часов.

Далее 100 мкл культуры вносилось в пробирку, содержащую тестируемые соединения (соединения брались по 10 мкл). Затем добавлялось 2 мл 0,6% верхнего агара (на 300 мл воды 1.8 г агара, 1.5 г хлорида натрия) с добавлением гистидина и биотина (на 50 мл топ агара 2.5 мл 0.5 мМ гистидина и 2.5 мл 0.5 мМ биотина), все тщательно перемешивалось вращательными движениями между ладонями и выливалось на чашку Петри с минимальным глюкозным агаром (на 510 мл воды 9 г агара, 60 мл среды А×10 (на 1 л воды 137.6 г фосфата калия двузамещенного, 45 г фосфата калия однозамещенного, 10 г сульфата аммония, 5 г цитрата натрия), 30 мл 40% глюкозы (на 100 мл воды 40 г глюкозы), 1 мл 20% сульфата магния (на 100 мл воды 20 г сульфата магния), 20 мг ампициллина). В экспериментах с метаболической активацией на каждые 2 мл топ агара добавлялось 0.5 мл S9 смеси (1 мл S9 фракции, 0.5 мл (1.65M KCl + 0.4 мл MgCl<sub>2</sub>) раствора, 0.125 мл 1 М глюкозо-6-фосфата, 1 мл 0.1 М NADP, 12.5 мл 0.2 М натрий-фосфатного буфера pH 7.75, 8.875 мл воды). Чашки оставались на некоторое время для высыхания агара, затем помещались в термостат на 48 часов при 37°C.

Спустя отведенное время проводился подсчет колоний, данных ревертантами, которые проросли в нижележащий слой минимального глюкозного агара. Каждый эксперимент в тесте Эймса был проведен дважды в трех повторностях. при проверке

антимутагенных свойств нами был введен коэффициент защитного эффекта **k**, вычисленный следующим образом:

$$k = \frac{N_{cp(\text{мут})}}{N_{cp(\text{мут+тт})}}$$

где  $N_{cp(\text{мут})}$  – среднее число колоний на чашках с мутагеном,  $N_{cp(\text{мут+тт})}$  – среднее количество колоний на чашках с мутагеном и тестируемым тритерпеновым соединением.

2.5. Методы оценки потенциальных противоопухолевых свойств. МТТ-тест, микроскопическое исследование клеточных культур

**МТТ-тест** проводился следующим образом [Mosmann, 1983]. 100 мкл клеточной суспензии (плотность  $10^6$  кл/мл) вносили в лунку 96-луночного планшета, планшет помещали в инкубатор при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  и содержании  $\text{CO}_2$  5%. Спустя сутки тестируемые соединения раскапывали по 1 мкл в каждую лунку, планшет снова помещался в инкубатор на 72 часа. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл красителя (5 мг 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (МТТ) на 1 мл буфера PBS). Спустя 3 часа раствор из лунок удалялся, образовавшийся осадок растворяли в 100 мкл изопропанола. Затем количество осадка определяли спектрофотометрически на планшетном спектрофотометре Multiskan RC.

Процент ингибирования вычислялся по формуле:

$$\text{Ингибирование (\%)} = 100 - [(T/M) \times 100]$$

где  $T$  – оптическая плотность осадка с тестируемым соединением,  $M$  – оптическая плотность осадка с DMSO (растворитель, отрицательный контроль). Каждый эксперимент выполнялся независимо 3 раза по 8 повторностей.

**Микроскопическое исследование** клеточных культур проводилось в лаборатории морфологии и функции клеточных структур ИЦиГ СО РАН. В 12-луночный планшет вносили по 1 мл клеточной суспензии в каждую лунку (плотность  $10^6$  кл/мл). Клетки помещали в инкубатор при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  и содержании  $\text{CO}_2$  5% на 12 часов для прикрепления, затем раскапывали тестируемое соединение по 10 мкл в каждую лунку. Инкубировали планшет в течение суток, затем наблюдали изменения морфологии с помощью микроскопа AxioStar Plus (Carl Zeiss). Фотографии препаратов сделаны с использованием камеры AxioCamICc3 (Carl Zeiss).

Препараты для конфокальной микроскопии готовились следующим образом. В 12-луночный планшет помещали покровные стекла на дно каждой лунки, вносили по 1 мл клеточной суспензии в каждую лунку (плотность  $10^6$  кл/мл). Клетки инкубировали в

течение 24 ч, затем отмывали ростовой средой. Далее в каждую лунку добавляли по 10 мкл исследуемого соединения. Перед фиксацией клетки окрашивали красителями согласно инструкции (CellMask Orange Plasma membrane Stain и MitoTracker Red, ThermoFischer Scientific). Спустя время, заданное экспериментом, покровные стекла убирали из планшета, тщательно отмывали фосфатным буфером и заливали параформальдегидом на ночь. Далее стекла накладывались на каплю антифейда на предметном стекле. Препарат промакивался фильтровальной бумагой, края покровного стекла фиксировались лаком. Микроскопия выполнена с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 META в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН и обработаны с помощью программного обеспечения Zen (Carl Zeiss).

## 2.6. Детекция апоптоза

**Детекция апоптоза для урсоловой и помоловой кислот** проводилась с помощью PE Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Pharmingen, США) согласно инструкции. Клетки линии U87 выращивались на 6-луночном планшете (конфлюентность 75%), затем обрабатывались тритерпеновыми кислотами в концентрации 50 мкМ в течение 48 и 24 ч. Отрицательным контролем были необработанные клетки, для положительного контроля клетки инкубировались 48 ч с доксорубицином в концентрации 0.2 мкМ. После окончания инкубации клетки снимались из лунок с помощью трипсина и дважды отмывались холодным PBS. Осажденные клетки суспендировались в 100 мкл 1× Аннексин V связывающего буфера. Далее к образцам добавляли по 5 мкл раствора FITC Аннексина V и пропидия йодида, инкубировали в темноте при комнатной температуре 25 мин, разводили в 400 мкл 1× Аннексин V связывающего буфера. Анализ образцов проводился немедленно на приборе BD FACSDiva (BD Biosciences, Сан-Хосе, США) О. А. Коваль в Лаборатории биотехнологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

**Детекция апоптоза для урсоловой кислоты, меченной FITC**, осуществлялась с помощью двойного окрашивания акридиновым оранжевым и бромистым этидием [Kasibhatla и др., ]. В 12-луночный планшет вносили по 1 мл клеточной суспензии U-87 в каждую лунку (плотность  $10^6$  кл/мл). Клетки инкубировали в с тестируемыми соединениями в концентрации 25 мкМ в течение 48 и 24 ч. Перед анализом клетки снимали трипсином и разводили питательной средой до концентрации  $10^6$  кл/мл. К 50 мкл полученной суспензии добавляли 2 мкл раствора бромистого этидия и акридинового оранжевого (раствор в PBS по 100 мкг/мл каждого). 10 мкл суспензии наносили на предметное стекло, накрывали покровным и анализировали немедленно на

микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss). На каждый образец подсчитывалось не менее 300 клеток, эксперимент проводили независимо 3 раза.

## 2.7. Методы статистической обработки

Статистический анализ данных бактериальной и культуральной тестов проводился с помощью статистического пакета PAST [Hammer, Harper, Ryan, 2001]. Для оценки достоверных различий между средними значениями в контрольной и экспериментальной выборках использован t-критерий Стьюдента. Ошибка измерения в каждой выборке определялась как среднеквадратичное отклонение от среднего значения при независимых измерениях одного образца. Во всех экспериментах ошибка измерения не превышала 10-20%.

## 2.8. Молекулярный докинг

Макромолекулы и лиганды были подготовлены с использованием программы UCSF Chimera 1.10.2 [Pettersen et al., 2004]. Структуры тритерпеновых кислот получены из базы данных PubChem (CID 64945 и CID 382831 соответственно). Для получения трехмерных структур использован алгоритм UFF [Rappe et al., 1992]. Молекулярный докинг выполнен в программе AutoDock Vina [Trott, Olson, 2010] в графическом интерфейсе PyRx 0.8. Для визуализации полученных результатов использована программа Accelrys Discovery Studio Visualizer 4.0.

Выбраны протеинкиназа B (PDB ID: 3OCB) [Blake et al., 2010] и MDM2 (PDB ID: 4HG7) [Anil et al., 2013] как потенциальные мишени для тритерпеновых кислот (референсными лигандами были (2S)-2-(4-хлоробензил)-3-оксо-3-[4-(7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-ил)пиперазин-1-ил]пропан-1-амин (XM1) и 4-((4S,5R)-4,5-бис(4-хлорофенил)-2-[4-метокси-2-(пропан-2-илокси)фенил]-4,5-дигидро-1H-имидазол-1-ил}карбонил)пиперазин-2-он (nutlin 3a) соответственно). Процедура докинга выполнена для жесткой конформации макромолекулы и гибкой конформации лиганда с использованием стандартных параметров AutoDock Vina. Наиболее низкие энергетические взаимодействия выбраны для визуализации.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение химического состава липофильного экстракта *Chamaenerion angustifolium* и выделение помоловой кислоты

3.1.1. Исследование динамики накопления экстрактивных веществ

**Получение суммарного экстракта и фракции свободных кислот.** Экстракты, богатые липофильными компонентами, были получены экстракцией измельченного сырья МТБЭ. В ходе исследования вегетативные органы фракционировали на листья и стебли. Выходы экстрактов из сырья сбора 2008-2010 гг. сведены в табл. 3.

Табл. 3. Выход экстрактивных веществ из сырья сбора 2008-2010 гг., полученных с помощью МТБЭ (% от веса воздушно-сухого сырья).

Год	Образец сырья	Выход экстрактивных веществ, %	
		июнь	сентябрь
2008	Иван-чай узколистый (листья)	3.95	5.26
	Иван-чай узколистый (стебли)	0.65	1.99
2009	Иван-чай узколистый (листья)	4.2	5.8
	Иван-чай узколистый (стебли)	0.7	4.1
2010	Иван-чай узколистый (листья)	11.67	*
	Иван-чай узколистый (стебли)	2.38	*

\*В сентябре 2010 года образцы сырья не были заготовлены из-за погодных условий

Показано, что в процессе вегетации количество экстрактивных веществ существенно увеличивается. В листьях иван-чая узколистого экстрактивных веществ содержится больше, чем в стеблях.

Следующим шагом являлось выделение фракции свободных кислот из суммарного экстракта (содержащего также связанные кислоты и нейтральные соединения), так как именно в ней содержатся целевые тритерпеновые компоненты. Для этого суммарный экстракт промывали раствором едкого натра, а затем водой до pH 7. Объединенные водные смывы подкисляли соляной кислотой. Целевые компоненты извлекались из полученной вытяжки МТБЭ. Полученные данные сведены в табл. 4.

Табл. 4. Выход фракции свободных кислот из МТБЭ-экстрактов (% от веса воздушно-сухого сырья)

Год	Образец сырья	Свободные кислоты, %
-----	---------------	----------------------

		июнь	сентябрь
2008	Иван-чай узколистый (листья)	1.0	1.2
	Иван-чай узколистый (стебли)	0.3	1.5
2009	Иван-чай узколистый (листья)	1.1	1.7
	Иван-чай узколистый (стебли)	0.25	0.35
2010	Иван-чай узколистый (листья)	1.2	*
	Иван-чай узколистый (стебли)	1.03	*

\* В сентябре 2010 года образцы сырья не были заготовлены из-за погодных условий

В процессе вегетации содержание свободных кислот в вегетативных органах иван-чая узколистого также увеличивается.

**Определение качественного и количественного состава фракции свободных кислот.** Идентификация состава фракции свободных кислот осуществлялась с помощью ХМС-анализа в Лаборатории физических методов исследования. Количественное содержание компонентов определялось по площади пика, соответствующего соединению. На хроматограммах фракций свободных кислот четко видны пики, соответствующие тритерпеновым кислотам (рис. 20, 21).

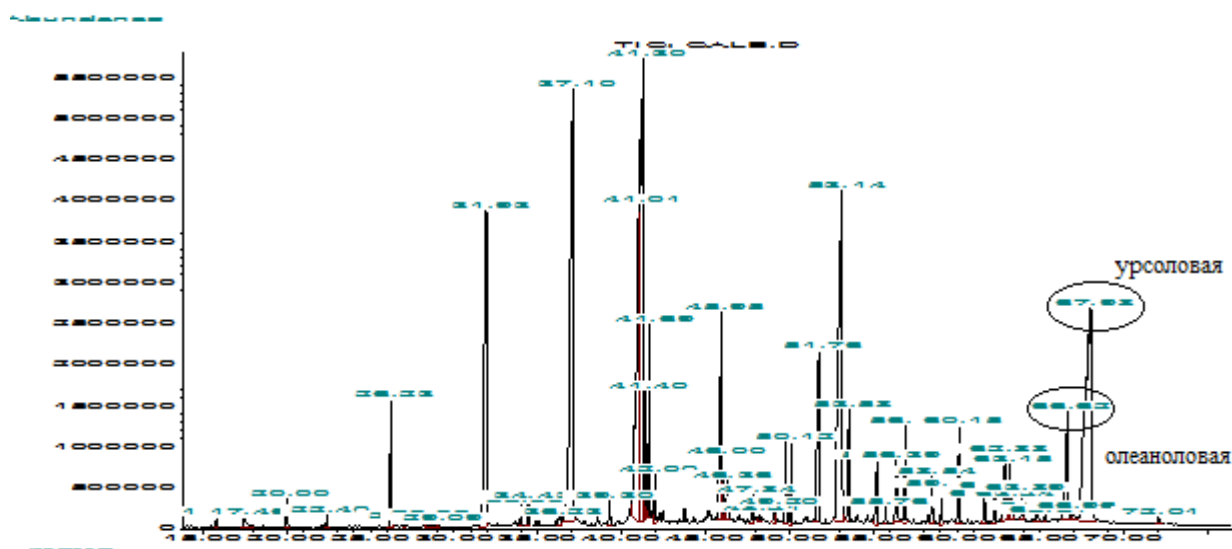


Рис. 20. Хроматограмма фракции свободных кислот листьев иван-чая узколистого.

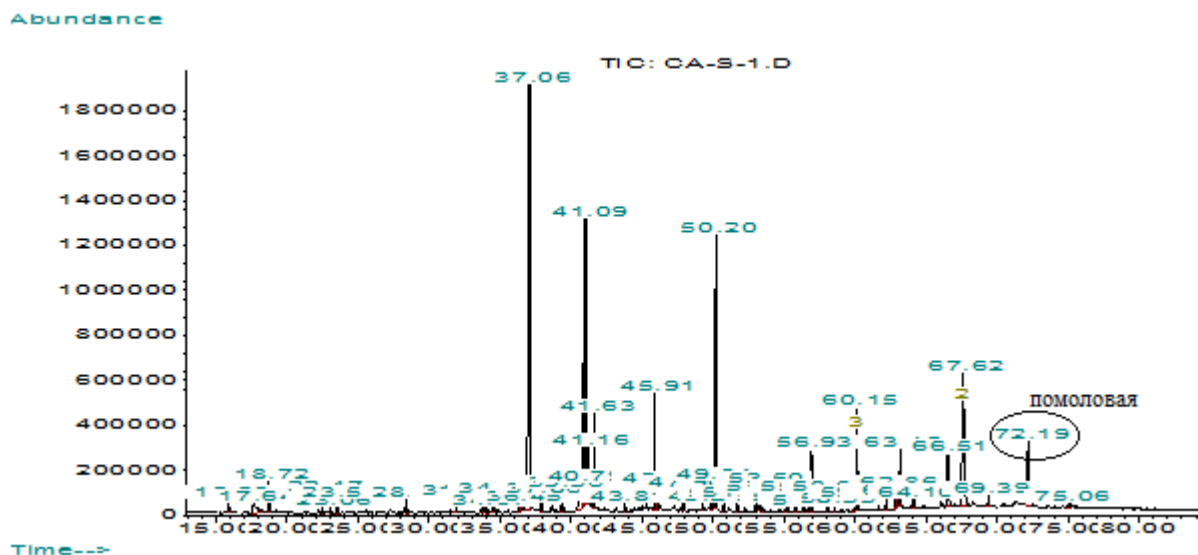


Рис. 21. Хроматограмма фракции свободных кислот стеблей иван-чая узколистного.

Подведем итоги хромато-масс-спектрометрическому анализу. Показано, что содержание экстрактивных веществ увеличивается в вегетативных органах иван-чая узколистного. В результате исследования состава фракции свободных кислот впервые обнаружено 6 новых для иван-чая узколистного тритерпеновых кислот: олеаноновая, урсоловая, помоловая, ацетилолеаноловая, ацетилурсоловая, бетулиновая. В целом же в составе липофильных компонентов иван-чая узколистного (*C. angustifolium*) впервые обнаружено более 80 соединений среди нейтральных компонентов и более 40 среди кислых, включая вышеперечисленные тритерпеновые кислоты.

Установлено, что листья иван-чая узколистного содержат значительное количество олеаноловой и урсоловой кислот, в стеблях накапливается преимущественно помоловая кислота. По содержанию двух последних компонентов иван-чай узколистный сопоставим с препаративными источниками – клюквой, брусникой, черникой для урсоловой кислоты [Кукина, Попов, 2007], хризобаланусом для помоловой [Fernandes et al., 2003]; таким образом, его можно рассматривать в качестве перспективного сырья для фармацевтической промышленности.

### 3.1.2. Разработка методики очистки тритерпеновых кислот

Выделение помоловой кислоты осуществлялась с помощью колоночной хроматографии на силикагеле Армосорб. Конечный выход целевого соединения составил 0.06% от веса воздушно-сухого сырья, чистота образца составляла 96%, оставшиеся 4% составляла смесь урсоловой и олеаноловой кислот.

Для дополнительной идентификации полученного образца был проведен ЯМР-анализ. Полученные данные соответствуют литературным [Cornelius et al., 2008; Lee et al., 2005] (Табл. 5, 6).

Табл. 5. Характеристичные сигналы  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров помоловой кислоты

Атом	Химсдвиг
H-3	3.46; dd; 1H
H-12	5.64; br s; 1H
H-18	3.09; d; 1H
H-23	1.05; s; 3H
H-24	1.26; s; 3H
H-25	0.94; s; 3H
H-26	1.13; s; 3H
H-27	1.76; s; 3H
H-29	1.48; d; 3H
H-30	1.15; d; 3H

Табл. 6. Сигналы  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров помоловой кислоты

№ атома	Химсдвиг	№ атома	Химсдвиг
1	39.5	16	26.9
2	28.6	17	48.8
3	78.7	18	55.1
4	39.9	19	73.2
5	56.3	20	42.8
6	19.4	21	27.4
7	34.1	22	39.0
8	40.8	23	17.0
9	48.3	24	29.3
10	37.8	25	16.0
11	24.5	26	17.2
12	128.5	27	25.2
13	140.4	28	181.1



14	42.6	29	27.6
15	29.8	30	17.4

Была отработана методика для выделения помоловой кислоты из сырья иван-чая узколистного в чистом виде (96%), данные подтверждены с помощью ХМС-анализа.

### 3.2. Изучение биологической активности помоловой кислоты

#### 3.2.1. Мутагенные и генотоксические свойства

В силу малого содержания в растительном сырье помоловая кислота до сих пор не была проверена на безопасность для генетического материала клетки.

Вначале осуществлялась проверка генотоксичности помоловой кислоты с помощью SOS-хромотеста. Эксперимент проводился по стандартной методике [Quillardet, Hofnung, 1985] с дополнениями, рекомендованными в работе [Mersch-Sundermann, Kevekordes, Mochayedí, 1991], на штамме *E. coli* PQ37, который позволяет регистрировать степень индукции SOS-ответа.

Конечный результат представлен в виде фактора индукции I(c), который считается по отношению активности β-галактозидазы (показывает уровень индукции SOS ответа в клетках) к активности щелочной фосфатазы (показывает количество выживших клеток). Все значения были нормированы на негативный контроль (активность соответствующих ферментов в пробе, содержащей DMSO). В качестве положительного контроля также был взят NQO в наименьшей рабочей концентрации. Помоловая кислоты исследовалась в двух концентрациях – 0.001 и 0.01 М. Результаты приведены в табл. 7.

Табл. 7. Проверка генотоксичности помоловой кислоты в SOS-хромотесте.

Соединение (М)	I(c) <sub>ср.</sub> ± σ
DMSO	1
NQO (0.0016)	2.96 ± 0.43
Помоловая кислота (0.001)	1.09 ± 0.25
Помоловая кислота (0.01)	0.88 ± 0.08

\*p-value ≤ 0.01

Как уже упоминалось выше, SOS-хромотест выявляет не далеко не все мутагены. Для более точной оценки собственно потенциальной мутагенности помоловой кислоты был поставлен тест Эймса.

Тестирование проводилось по методике, описанной Б. Эймсом [Maron, Ames, 1983]. В работе использовались штаммы *S. typhimurium* TA98 (*rfa*, *ΔuvrB*, +R) и TA102 (*rfa*,

+, +R), которые позволяют регистрировать мутации сдвига рамки считывания и нуклеотидной замены соответственно.

При проведении теста на мутагенный потенциал химического соединения подсчитывается количество выросших колоний на чашке. Исходный штамм не может расти на используемой селективной среде. В эксперименте на селективных средах вырастают только ревертанты – мутировавшие к исходному генотипу клетки. Важно отметить, что каждый используемый штамм *S. typhimurium* обладает собственной спонтанной частотой реверсий к «дикому типу». Для штамма *S. typhimurium* TA98 этот спонтанный фон равен 20-50 колоний-ревертантов на чашку, для штамма *S. typhimurium* TA102 – 250-400. Увеличение количества ревертантов свидетельствует о мутагенном (генотоксическом) эффекте, уменьшение количества ревертантов говорит о летальном (цитотоксическом) эффекте.

В тесте присутствует 2 контроля. В качестве отрицательного взят растворитель DMSO, в качестве положительного контроля – классический мутаген. Данные представлены в табл. 8.

Табл. 8. Проверка мутагенных свойств помоловой кислоты в тесте Эймса (штамм *S. typhimurium* TA98).

Соединение (М)	$N_{cp} \pm \sigma$
DMSO	$21 \pm 4$
NQO (0.0016)	$93 \pm 11^*$
Помоловая кислота (0.01)	$16 \pm 4$

\*p-value  $\leq 0.01$

Этот же эксперимент был проведен и на другом штамме *S. typhimurium* – TA102. Данный штамм позволяет оценивать точечные замены ДНК, типичные при действии окислителей или же при ионизирующем излучении. В качестве положительного контроля в данном эксперименте был взят другой мутаген, действующий как окислительный агент на молекулу ДНК – t-BuO<sub>2</sub>H. Результаты приведены в табл. 9.

Табл. 9. Проверка мутагенных свойств помоловой кислоты в тесте Эймса (штамм *S. typhimurium* TA102)

Соединение (М)	$N_{cp} \pm \sigma$
DMSO	$322 \pm 27$

t-BuO <sub>2</sub> H (11×10 <sup>-6</sup> )	760±36*
Помоловая кислота (0.01)	329±24

\*p-value ≤0.01

Из таблицы видно, что мутагенных свойств в этих экспериментах помоловая кислота не проявила.

Многие соединения могут проявлять мутагенный эффект при попадании в организм, проходя в нем цепь метаболических реакций. Добавление метаболической фракции в бактериальных тест-системах позволяет получить практически весь набор возможных метаболитов и проверить их на мутагенез.

Вначале был проведен SOS-хромотест для проверки помоловой кислоты в наибольшей доступной концентрации. Бензо[α]пирен, стандартный мутаген для тестов с метаболической активацией, был взят в качестве положительного контроля. Результаты сведены в табл. 10.

Табл. 10. Проверка генотоксических свойств помоловой кислоты с метаболической активацией в SOS-хромотесте.

Соединение (M)	I(c) <sub>cp</sub>
DMSO	1
Бензо[α]пирен (0.002)	2.7*
Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (0.01)	1.16

\*p-value ≤0.01

Далее для помоловой кислоты был проведен тест Эймса с метаболической активацией. Эксперимент проводился на штамме *S. typhimurium* TA98, в качестве положительного контроля здесь был также взят мутаген бензо[α]пирен. Результаты эксперимента представлены в табл. 11.

Табл. 11. Проверка мутагенных свойств помоловой кислоты с метаболической активацией в тесте Эймса (штамм *S. typhimurium* TA98).

Соединение (M)	N <sub>cp.</sub> ± σ
DMSO	60±11
Бензо[α]пирен (0.002)	154±17*

Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (0.01)	56±14
--	-------

\*p-value ≤0.01

Таким образом, было показано, что ни помоловая кислота, ни ее метаболиты не обладают генотоксическим эффектом. Из литературы известно, что пентациклические тритерпеновые кислоты обладают антимуtagenным эффектом [Furtado et al., 2008], поэтому далее решено было проверить защитные свойства помоловой кислоты.

### 3.2.2. Антимуtagenные свойства

Первым шагом защитные свойства оценивались с помощью SOS-хромотеста. Для этого в инкубируемые клетки были добавлены одновременно мутаген и помоловая кислота.

Результаты приведены в табл. 12.

Табл. 12. Проверка защитных свойств помоловой кислоты в SOS-хромотесте

Соединение (М)	I(c) <sub>cp.</sub> ± σ
NQO (0.016)	7.06±0.55
+ Помоловая кислота (0.01)	6.13±0.60
+ Помоловая кислота (0.001)	6.65±0.86*
NQO (0.003)	9.36±1.36
+ Помоловая кислота (0.01)	9.66±1.20
+ Помоловая кислота (0.001)	9.67±1.10
NQO (0.005)	10.35±1.26
+ Помоловая кислота (0.01)	10.31±1.14
+ Помоловая кислота (0.001)	10.08±1.11*

\*p-value ≤0.01

Небольшое увеличение среднего значения фактора индукции находится в пределах статистической погрешности. При наименьшей концентрации NQO помоловая кислота снизила фактор индукции достоверно.

Далее помоловая кислота была проверена на наличие антимуtagenных свойств в тесте Эймса. Результаты в табл. 13.

Табл. 13. Проверка защитных свойств помоловой кислоты в тесте Эймса (штамм *S. typhimurium* TA98).

Соединение (М)	N <sub>cp</sub> ± σ	k
----------------	---------------------	---

DMSO	23 ± 4	
NQO (0.0016)	88± 11	
+ Помоловая кислота (0.001)	61 ± 12*	1.45
+ Помоловая кислота (0.01)	69 ± 7	1.30
NQO (0.016)	287± 22	
+ Помоловая кислота (0.001)	242 ± 27*	1.17
+ Помоловая кислота (0.01)	243 ± 7	1.18
NQO (0.03)	425± 8	
+ Помоловая кислота (0.001)	462± 9	0.92
+ Помоловая кислота (0.01)	399 ± 99*	1.07

\*p-value ≤0.01

Показано, что помоловая кислота также обладает защитным эффектом против классического мутагена NQO при обеих проверенных концентрациях.

Далее защитные свойства помоловой кислоты были проверены с другим мутагеном – трет-бутил гидропероксидом, вызывающим окислительные повреждения ДНК. Данный эксперимент был проведен на штамме *S. typhimurium* TA102. Данные представлены в табл. 14.

Табл. 14. Проверка защитных свойств помоловой кислоты в тесте Эймса (штамм *S. typhimurium* TA102).

Соединение (M)	$N_{cp.} \pm \sigma$	<b>k</b>
DMSO	362±28	
t-BuO <sub>2</sub> H (19×10 <sup>-6</sup> )	820±25	
+Помоловая кислота (10 <sup>-2</sup> )	733±42*	1.12
+Помоловая кислота (10 <sup>-3</sup> )	801±26	1.02
+Помоловая кислота (10 <sup>-4</sup> )	791±32	1.04
+Помоловая кислота (10 <sup>-5</sup> )	790±22*	1.04
+Помоловая кислота (10 <sup>-6</sup> )	792±33	1.04
t-BuO <sub>2</sub> H (11×10 <sup>-6</sup> )	773±31	
+Помоловая кислота (10 <sup>-2</sup> )	396±69*	1.95
+Помоловая кислота (10 <sup>-3</sup> )	338±29*	2.29
+Помоловая кислота (10 <sup>-4</sup> )	331±35*	2.34

+Помоловая кислота ( $10^{-5}$ )	345±44*	2.24
+Помоловая кислота ( $10^{-6}$ )	695±26	1.11

\*p-value ≤0.01

Показано, что помоловая кислота также обладает защитным эффектом против мутагена t-BuO<sub>2</sub>H. Эффект статистически достоверен.

Показано, что в целом специфичность к t-BuO<sub>2</sub>H у помоловой кислоты гораздо выше по коэффициенту **k**, чем к NQO. С помощью этого же коэффициента можно определить рабочее окно концентраций, в котором ее эффект максимален –  $10^{-3}$ - $10^{-5}$  мкм/мкл.

Многие соединения теряют свои защитные свойства, пройдя через ряд метаболических реакций. В связи с этим были проверены защитные свойства метаболитов помоловой кислоты. Эксперимент был проведен как на клетках *E.coli* PQ37, так и на клетках *S. typhimurium* TA102. В качестве положительного контроля был выбран промутаген бензо[α]пирен, который проявляет свои мутагенные свойства лишь после метаболической активации. Результаты по метаболитам помоловой кислоты (помоловая кислота<sub>акт.</sub>) в табл. 15.

Табл. 15. Проверка защитных свойств помоловой кислоты после метаболической активации в SOS-хромотесте

Соединение (M)	I(c) <sub>ср.</sub> ± σ	<b>k</b>
Бензо[α]пирен (0.002)	1.32±0.35	
+ Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (0.001)	1.19±0.25	1.11
+ Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (0.01)	1.12±0.22	1.18
Бензо[α]пирен (0.004)	1.40±0.12	
+ Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (0.001)	1.34±0.21	1.04
+ Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (0.01)	1.28±0.12*	1.09
Бензо[α]пирен (0.008)	2.23±0.26	
+ Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (0.001)	2.03±0.21	1.10
+ Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (0.01)	1.63±0.29*	1.37

\*p-value ≤0.01

Показано, что метаболиты помоловой кислоты снижают мутагенное действие канцерогена бензо[α]пирена при всех исследованных концентрациях.

Эффект метаболитов помоловой кислоты (помоловая кислота<sub>акт.</sub>) был проверен и с помощью теста Эймса против мутагена t-BuO<sub>2</sub>H с использованием штамма *S. typhimurium* TA102. Результаты приведены в табл. 16.

Табл. 16. Проверка защитных свойств помоловой кислоты после метаболической активации в тесте Эймса (штамм *S. typhimurium* TA102).

Соединение (M)	N <sub>ср.</sub> ± σ	k
DMSO	353±25	
t-BuO <sub>2</sub> H (19×10 <sup>-6</sup> )	818±56	
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-2</sup> )	656±31*	1.25
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-3</sup> )	665±46*	1.23
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-4</sup> )	661±31*	1.24
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-5</sup> )	752±43*	1.09
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-6</sup> )	812±55	1.00
t-BuO <sub>2</sub> H (11×10 <sup>-6</sup> )	734±36	
+ Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-2</sup> )	641±25*	1.15
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-3</sup> )	632±39*	1.16
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-4</sup> )	640±43*	1.15
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-5</sup> )	658±46*	1.12
+Помоловая кислота <sub>акт.</sub> (10 <sup>-6</sup> )	686±27*	1.07

\*p-value ≤0.01

Показано, что защитные свойства помоловой кислоты по отношению к t-BuO<sub>2</sub>H сохраняются после метаболической активации.

Помоловая кислота была проверена на генотоксичность, показано отсутствие негативных свойств в бактериальных тест-системах, в том числе с метаболической активацией.

Помоловая кислота обладает значительным антимуtagenным эффектом, причем против окислительного агента трет-бутил гидропероксида ее эффект существенно выше, чем против 4-нитрохиолин-1-оксида.

В тестах с метаболической активацией было установлено, что метаболиты помоловой кислоты менее активны, нежели сама помоловая кислота.

### 3.2.3. Цитотоксические свойства

Наличие антиоксидантных свойств зачастую коррелирует с противораковыми, поэтому далее потенциальная цитотоксичность помоловой кислоты для онкотрансформированных клеток была проверена с помощью МТТ-теста. МТТ-тест основывается на способности митохондриальных ферментов превращать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Перевод формазана в раствор с помощью органического растворителя (изопропанола в нашем случае) и последующая фотометрия позволяют точно сопоставить изменение оптической плотности раствора по отношению к контролю с изменением количества жизнеспособных клеток, а в цитотоксических исследованиях оценить специфическую гибель клеток, индуцированную тем или иным цитотоксическим агентом [Mosmann, 1983].

Измеренная оптическая плотность в каждой лунке затем была отнормирована на значение оптической плотности в лунке с DMSO (или точке с нулевой концентрацией исследуемых соединений). Таким образом, конечный результат представлен в виде процента жизнеспособных клеток (в отсутствие тритерпеновых соединений количество жизнеспособных клеток было принято за 100%).

Цитотоксичность помоловой кислоты была проверена на панели постоянных онкотрансформированных культур: MCF-7, U87, HCT116 (p53+/+) и HCT116 (p53-/-). Результаты представлены в рис. 22-25.

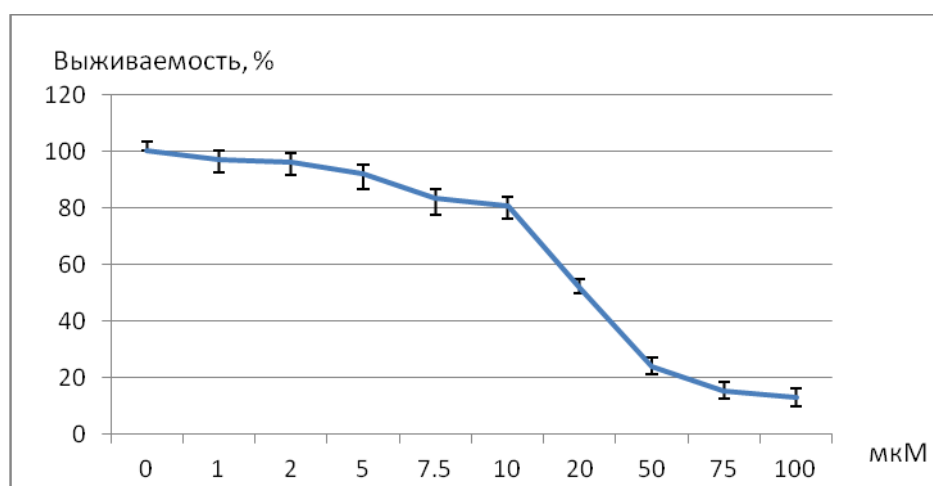


Рис. 22. Исследование цитотоксических свойств помоловой кислоты в МТТ-тесте на линии MCF-7 (рак молочной железы)



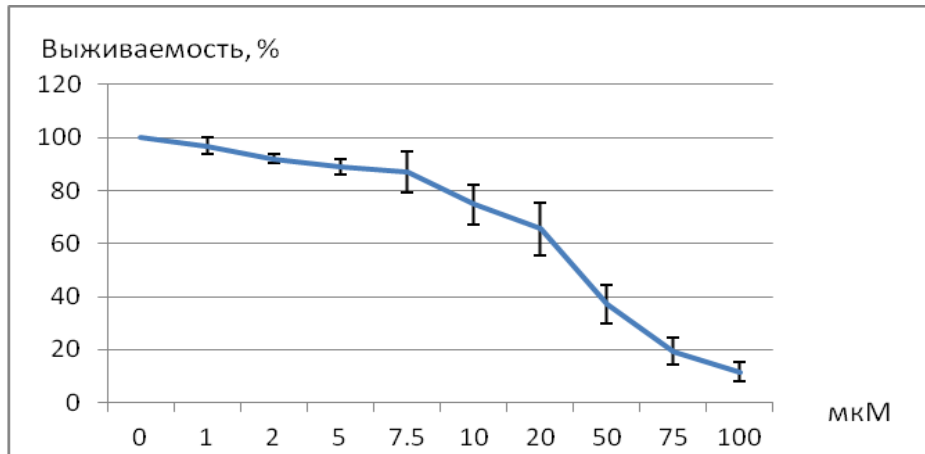


Рис. 23. Исследование цитотоксических свойств помоловой кислоты в МТТ-тесте на линии U87 (глиома)

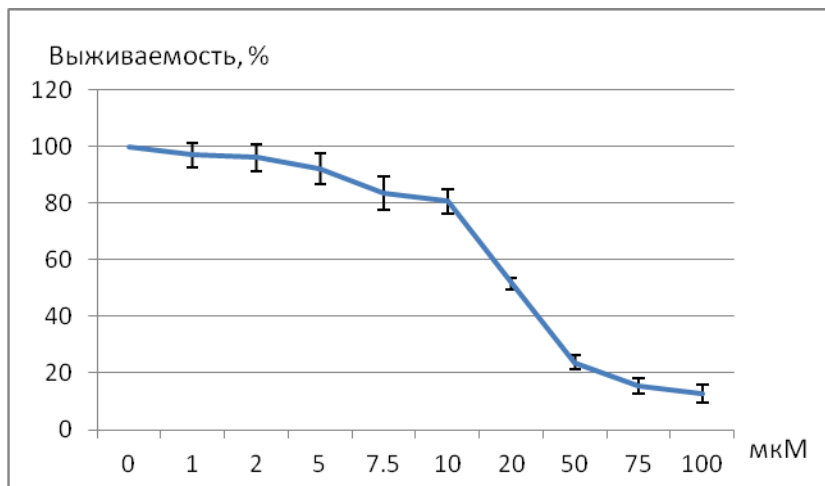


Рис. 24. Исследование цитотоксических свойств помоловой кислоты в МТТ-тесте на линии HCT116 (p53+/+) (рак толстой кишки)

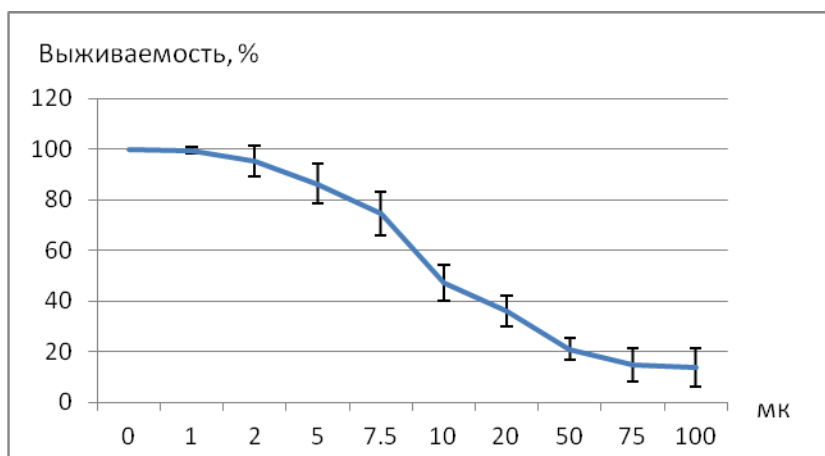


Рис. 25. Исследование цитотоксических свойств помоловой кислоты в МТТ-тесте на линии HCT116 (p53-/-) (рак толстой кишки)

Помимо постоянных, были проверены цитотоксические свойства помоловой кислоты и на первичных культурах (глиома). Результаты представлены на рис. 26.

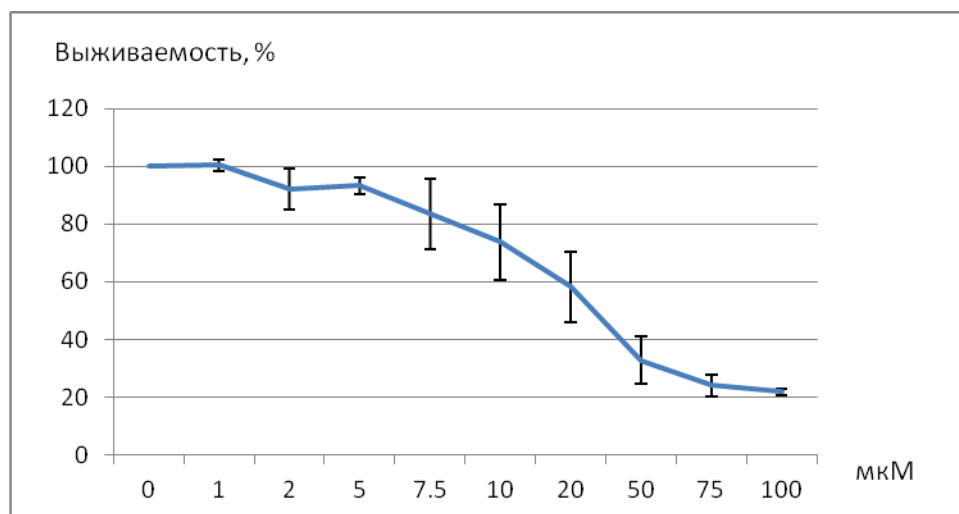


Рис. 26. Исследование цитотоксических свойств помоловой кислоты в МТТ-тесте на первичной культуре (глиома)

В качестве контроля были взяты человеческие эмбриональные фибробласты, линия MRC-5. Данные сведены в рис. 27

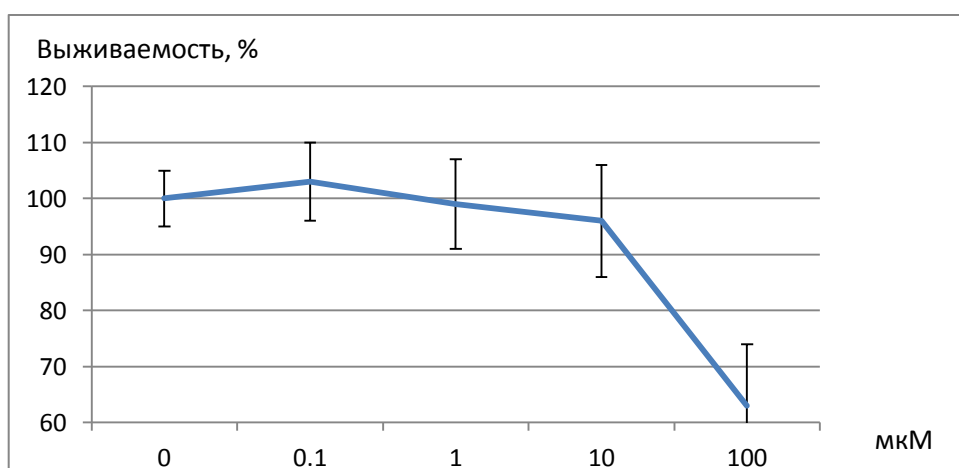


Рис. 27. Исследование цитотоксических свойств помоловой кислоты в МТТ-тесте на контрольной линии MRC-5.

Итог по МТТ-тесту представлен в табл. 17 в виде концентраций, вызывающих 50% ингибирование роста клеток ( $IC_{50}$ ).

Табл. 17. Показатель цитотоксичности помоловой кислоты ( $IC_{50}$ ) на панели онкотрансформированных клеточных линий

Клеточная линия	IC <sub>50</sub> , мкМ
контроль (MRC-5)	158
MCF-7	23.38
U87	33.82
HCT116 (p53+/+)	35.82
HCT116 (p53-/-)	9.95
Первичная культура (глиома)	31.24

Сравнивая значения IC<sub>50</sub> для онкотрансформированных и нормальных клеток, можно сказать, что помоловая кислота проявила существенный цитотоксический эффект на всех тестируемых клеточных линиях, причем как постоянных, так и первичных. В качестве контроля использовались эмбриональные фибробласты, для них IC<sub>50</sub> находится выше предела растворимости помоловой кислоты в DMSO, что свидетельствует о селективном воздействии преимущественно на онкотрансформированные клетки.

#### 3.2.4. Исследование изменения морфологии клеток после обработки помоловой кислотой

Помимо МТТ-теста, был проведен анализ обработанных помоловой кислотой клеточных культур с помощью светового микроскопа. В эксперименте использовались те же самые концентрации, что и для МТТ-теста. В качестве отрицательного контроля представлены фотографии культуры, инкубированной с добавлением DMSO. Наиболее наглядные изменения морфологии клеток видны после инкубации с помоловой кислотой в концентрации 10 мкМ. Результаты обобщены в рисунках 28–31.

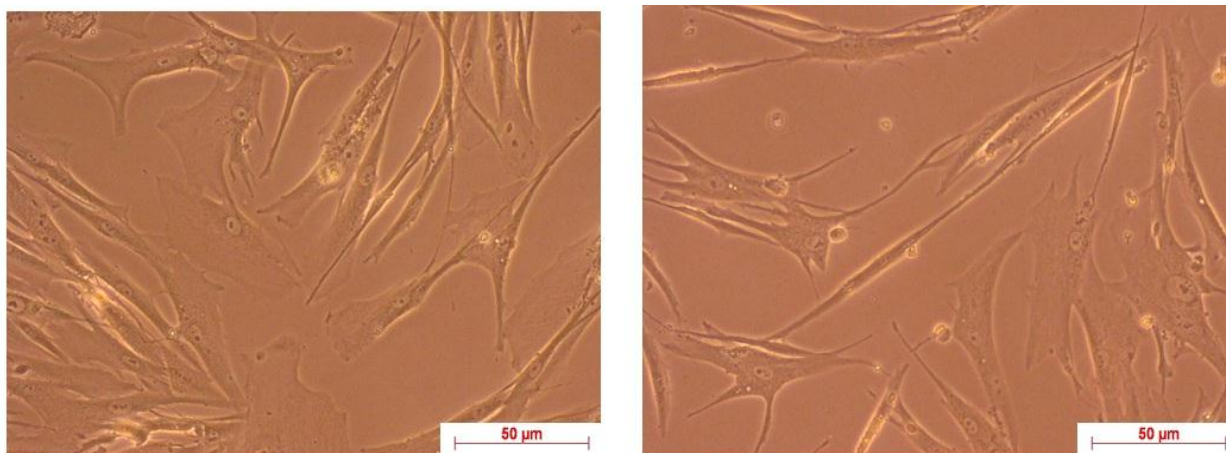


Рис. 28. Исследование изменений клеточной морфологии линии MRC-5 после добавления помоловой кислоты (слева) и DMSO (справа).

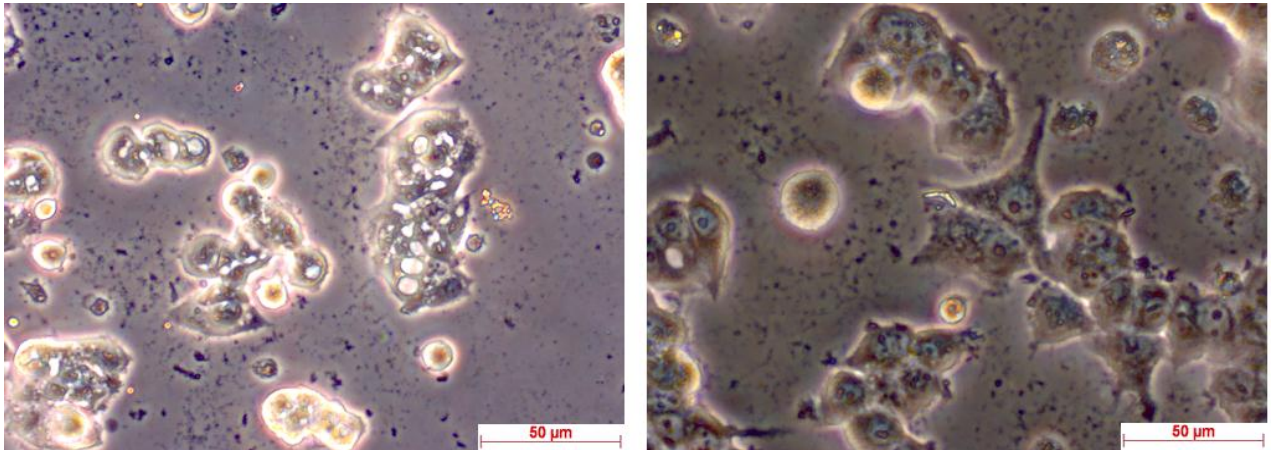


Рис. 29. Исследование изменений клеточной морфологии линии MCF-7 после добавления помоловой кислоты (слева) и DMSO (справа).

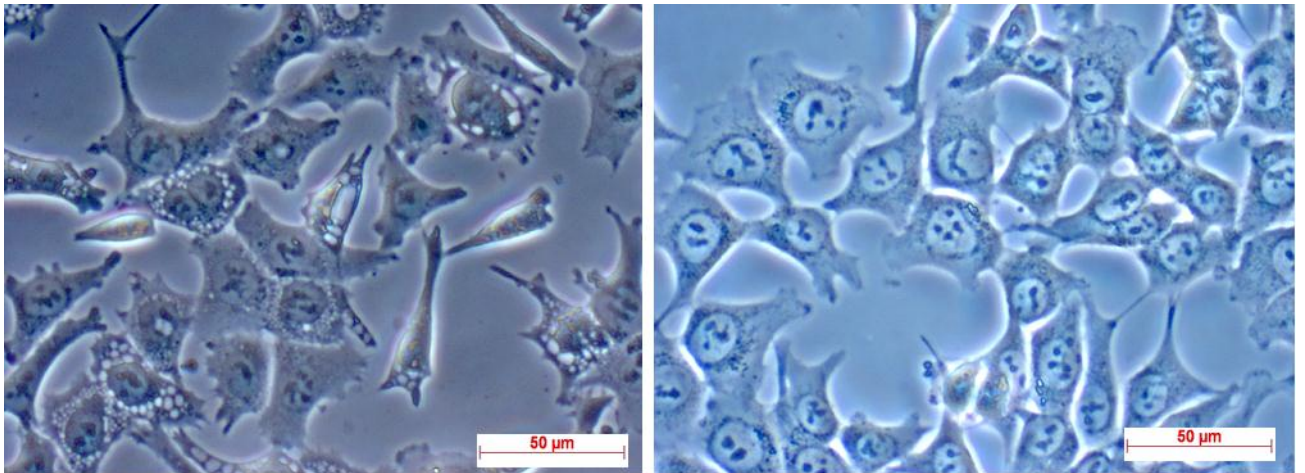


Рис. 30. Исследование изменений клеточной морфологии линии HCT116 (p53+/+) после добавления помоловой кислоты (слева) и DMSO (справа).

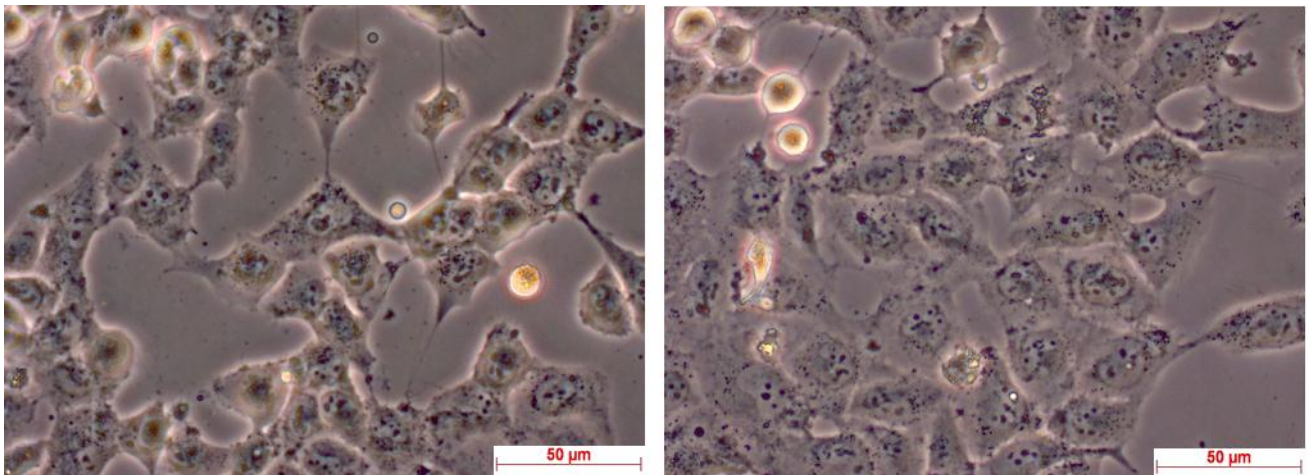


Рис. 31. Исследование изменений клеточной морфологии линии H1299 после добавления помоловой кислоты (слева) и DMSO (справа).

Хорошо видны изменения клеточной морфологии онкотрансформированных линий MCF-7 и HCT116, видно большое количество образовавшихся вакуолей, при этом сохраняется клеточное ядро. Такие изменения характерны для параптоза – клеточной смерти, сопровождаемой обильной вакуоляризацией. Другие же две линии, MRC-5 (контрольная линия фибробластов человека) и H1299 (также онкотрансформированная) не показали каких-либо изменений, что также показывает избирательность действия помоловой кислоты.

### 3.2.5. Проапоптотические свойства помоловой кислоты на глиомной линии U87

Одним из ключевых механизмов действия тритерпеновых соединений является индукция апоптоза. Зарегистрирована способность помоловой кислоты вызывать апоптоз в клетках эпителиального происхождения [Fernandes et al., 2005; Schinella et al., 2008; Yoo et al., 2012; Youn et al., 2012], поэтому далее были оценены проапоптотические свойства на линии нейрального происхождения U87-MG с помощью проточной цитофлуориметрии. Метод основан на различии в окраске клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза: FITC/аннексин V избирательно окрашивает фосфатидилсерин, который в нормальных клетках находится на внутренней стороне клеточной мембраны, поэтому клетки не окрашиваются. В раннем апоптозе фосфатидилсерин перемещается на наружную поверхность мембраны, окрашиваясь FITC/аннексин V. На более поздних стадиях апоптоза начинается деградация ядра, что проявляется в окрашивании как FITC/аннексин V, так и пропидий йодидом. И, наконец, некротические клетки окрашиваются только пропидий йодидом. Все комбинации окраски клеток (неокрашенные, окрашенные только FITC/аннексином V, окрашенные FITC/аннексином V и пропидий йодидом, окрашенные только пропидий йодидом) регистрируются прибором автоматически. Результаты представлены в табл. 18 и рис. 32.

Табл. 18. 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
DMSO	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



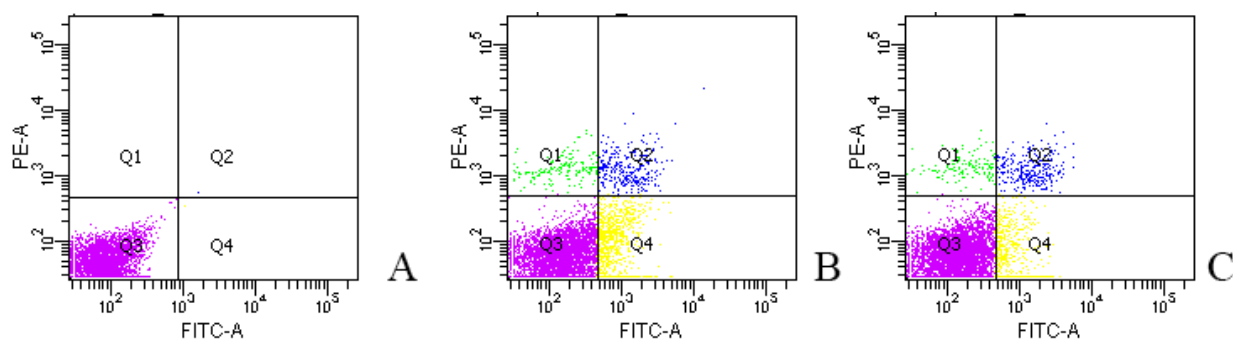


Рис. 32. Исследование стадий апоптоза клеток линии U87 с помощью проточной цитофлуориметрии после обработки помоловой кислотой в концентрации 50 мкМ: А) контроль, обработка DMSO; В) и С) – обработка помоловой кислотой в течение 24 и 48 ч соответственно. Q1 – некроз, Q2 – поздний апоптоз, Q3 – живые клетки, Q4 – ранний апоптоз.

Показано, что помоловая кислота способна индуцировать апоптоз в глиомных клетках. Отмечен высокая доля некротических клеток в контрольной популяции U87, однако для этой линии нормальным считается до 10% мертвых клеток.

Итак, 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%). Так как бактериальные тесты являются обязательным этапом в доклинических испытаниях, подтверждение безопасности потенциального препарата, в том числе на штаммах микроорганизмов, является необходимым условием для их дальнейших тестирований.

В этих же тест-системах был исследован защитный эффект помоловой кислоты. В SOS-хромотесте добавление исследуемого препарата в некоторых случаях несколько повышало фактор индукции, что может быть интерпретировано как усиление работы SOS-оперона и, в итоге, активацию репарации бактериальной ДНК. Очень хорошо себя зарекомендовала помоловая кислота в тесте Эймса: она существенно снижала мутагенный эффект NQO, но еще более выраженный защитный эффект она проявила как антиоксидант в тестах с t-BuO<sub>2</sub>H. В обоих случаях ингибирование было статистически достоверным. Имеются исследования, подтверждающие связь между антиоксидантными свойствами в бактериальных тестах и цитотоксичностью для онкотрансформированных клеток [Zakharova et al., 2010; Zakharova et al., 2011a; Zakharova et al., 2011b], поэтому полученные результаты по помоловой кислоте делают ее весьма перспективным ингибитором раковых клеток.

Ранее был показан цитотоксический эффект помоловой кислоты на клетках лейкозных линий K562 [Rumjanek et al., 2001] и HL-60 [Fernandes et al., 2005], а также раковых линиях молочной железы MCF-7 [Youn et al., 2012] и яичника SK-OV-3 [Yoo et al., 2012]. Также была показана способность помоловой кислоты запускать апоптоз в первичных культурах клеток, полученных от пациентов, больных хронической миелоидной лейкемией [Vasconcelos et al., 2007]. Проведенная работа расширила список клеточных линий, на которых была показана цитотоксичность помоловой кислоты: рак легкого H1299, глиома U87, рак толстой кишки HCT116 (p53<sup>+/+</sup> и p53<sup>-/-</sup>). Полученные данные по линии рака молочной железы, MCF-7, хорошо согласуются с литературными [Youn et al., 2012]. Анализ цитотоксичности с помощью МТТ-теста не выявил разницы между линиями, отличающимися по наличию гена p53. Также показано, что помоловая кислота ингибирует рост раковых клеток, полученных от больных с глиомой. В качестве контрольной линии использованы эмбриональные фибробласты MRC-5, для них токсичность была существенно ниже.

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

В литературных данных имеется не так много информации о механизмах противоракового действия помоловой кислоты. Это связано с тем, что источников ее наработки очень мало, и содержание по сравнению с другими тритерпеновыми кислотами невелико, а это существенно затрудняет процесс очистки. На данный момент основным способом ингибирования роста раковых клеток считается запуск апоптоза, причем как внешним сигнальным путем, так и митохондриальным [Fernandes et al., 2005; Vasconcelos et al., 2007; Yoo et al., 2012; Youn et al., 2012]. Данные получены на постоянных и первичных культурах. Помимо 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. Также она способна активировать каспазу-3, -9 и поли(АДФ-рибоза)-полимеразу. Также эти процессы сопровождались снижением активности синтазы жирных кислот и ацетил-СоА-карбоксилазы, а также ингибированием ключевых ферментов, участвующих в белковом

синтезе. Следует отметить, что множественная лекарственная устойчивость, обусловленная повышенным синтезом антиапоптозных белков Bcl-2 or Bcl-xL, преодолевается вышеперечисленными свойствами помоловой кислоты: активацией каспаз-3, -9 и нарушением целостности митохондриальной мембраны [Fernandes et al., 2007].

Что касается микроскопических данных о возможном параптозе, вызываемом помоловой кислотой, то имеются сведения о другом тритерпене, целастроле, который в зависимости от линии способен вызывать разные типы клеточной смерти: апоптоз, аутофагию и некроз. На линии HeLa были описаны все три типа [Wang et al., 2012]. Возможно, помоловая кислота действует сходным с целастолом образом, увеличивая уровень ионов  $Ca^{2+}$  в митохондриях и индуцируя стресс ЭПР посредством ингибирования протеасом. Показано, что нарушение работы митохондриального унипорта ионов  $Ca^{2+}$  тормозит их захват митохондриями, индуцируемый целастролом, нарушает набухание митохондрий и ЭПР, накопление полиубиквитированных белков и клеточную смерть. Ингибирование кальциевых рецепторов на ЭПР,  $IP_3$  рецепторов, также эффективно блокировало вызванное целастолом накопление  $Ca^{2+}$  и последующий параптоз. Таким образом, в данном исследовании показано, что опосредованное рецептором  $IP_3$  высвобождение ионов  $Ca^{2+}$  из ЭПР и его последующий приток в митохондрии через унипортер критически важно для индукции параптоза в раковых клетках [Mi et al., 2009]. 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.

3.3. Модельный эксперимент по получению флуоресцентно меченых тритерпеновых кислот и возможный механизм их действия

3.3.1. Предполагаемый механизм цитотоксического действия тритерпеновых кислот урсанового ряда

Присоединение радиоактивных или флуоресцентных меток является одним из самых распространенных методов, используемых в медицине, фармакологии и клеточной биологии, для выявления распределения исследуемых препаратов в целом организме и отдельных клетках, [Sameiro, Gonçalves, 2009]. В последние годы особую популярность приобрели именно флуоресцентные методы, достигнут большой прогресс в разработке новых способов мечения соединений и создании флюорофоров.

В биологических целях часто используют флуоресцеин, полициклический флюорофор с поглощением и флуоресцентным максимумом в видимой области



электромагнитного спектра ( $\lambda_{\text{abs}}$  490 нм и  $\lambda_{\text{em}}$  512 нм в водном растворе) [Haugland, Haugland, 2002]. Наибольшее распространение его производные получили для мечения белков посредством связывания с аминогруппами [Wu, Dovichi, 1989]. Его преимуществами являются сравнительно высокая абсорбционная способность, отличный флюоресцентный квантовый выход и высокая растворимость полученных конъюгатов в воде. Помимо этого, спектр поглощения и испускания флюоресцеина позволяет использовать его не только в флюоресцентной микроскопии, но и в конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и проточной цитометрии.

Самым популярным для мечения производным флюоресцеина является флюоресцеин изотиоцианат (FITC, рис. 33), применяемый для присоединения по  $\text{NH}_2$ - или  $\text{SH}$ -группам [Fülöp, Penke, Zarándi, 2001; Hoffmann et al., 2008]. В нашей работе мы также остановили свой выбор именно на этом красителе благодаря его доступности, возможности использовать в прижизненных исследованиях, а также простой реакции мечения. Для этого нам потребовалось ввести в урсоловую кислоту аминогруппу.

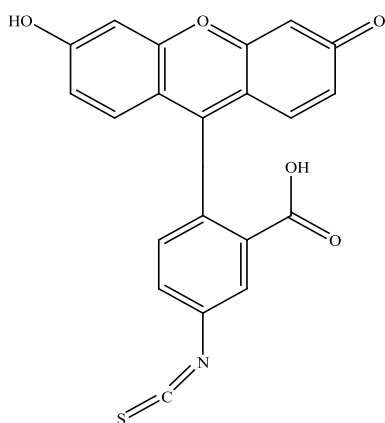


Рис. 33. Флюоресцеин изотиоцианат (FITC)

В качестве модельного соединения была выбрана структурно похожая урсоловая кислота, которая от помоловой отличается отсутствием третичной  $\text{OH}$ -группы в 19 положении и гораздо большей доступностью. Так как она изучена гораздо лучше, чем помоловая, это позволит сопоставить полученные результаты с имеющимися данными более полно. Помоловая кислота используется только в молекулярном моделировании для сравнения.

Согласно литературным данным, при индукции апоптоза малыми биологически активными молекулами, в том числе тритерпеновыми кислотами, через внешний сигнальный путь потенциальными мишенями могут быть протеинкиназа В 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]. Мы оценили взаимодействие между урсоловой и помоловой кислотами с Akt1 и MDM2, используя молекулярное моделирование. Результаты представлены в табл. 19, рис. 34, 35.

Табл. 19. Энергии связывания урсоловой и помоловой кислот с Akt1 и MDM2, вычисленные с помощью AutoDock Vina.

Лиганд	Энергия связывания, ккал/моль	
	Akt1	MDM2
Референсный	-8.7	-8.3
урсоловая	-8.9	-8.1
помоловая	-8.6	-8.0

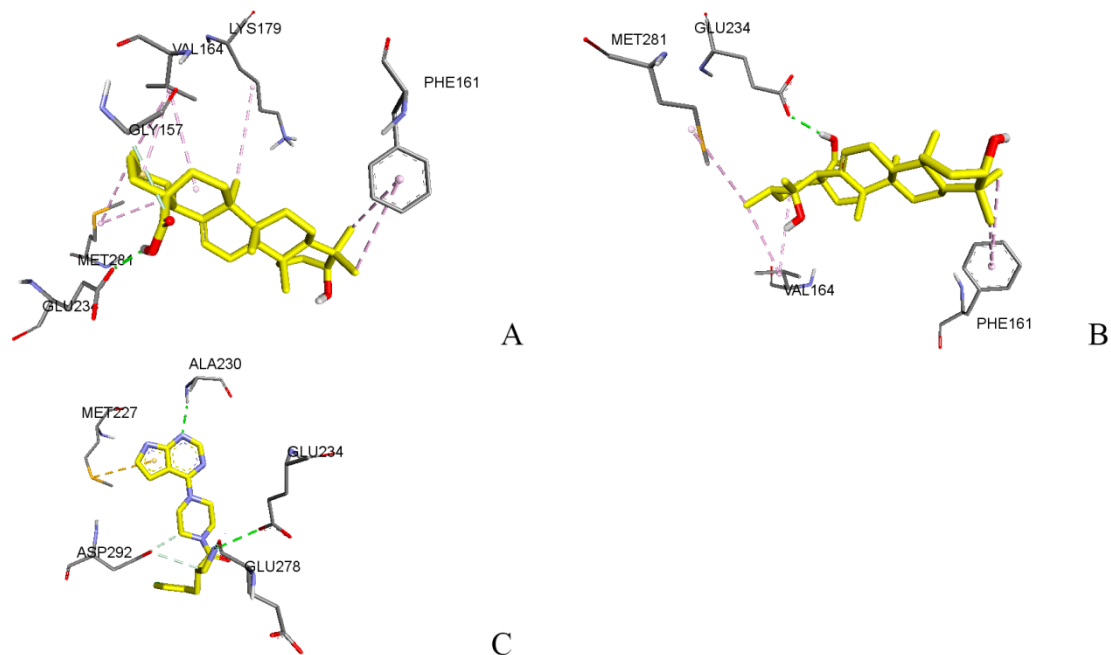


Рис. 34. Взаимодействие тритерпеновых кислот с Akt1: А) урсоловая; В) помоловая; С) референсный лиганд. Водородные связи выделены зеленым цветом.

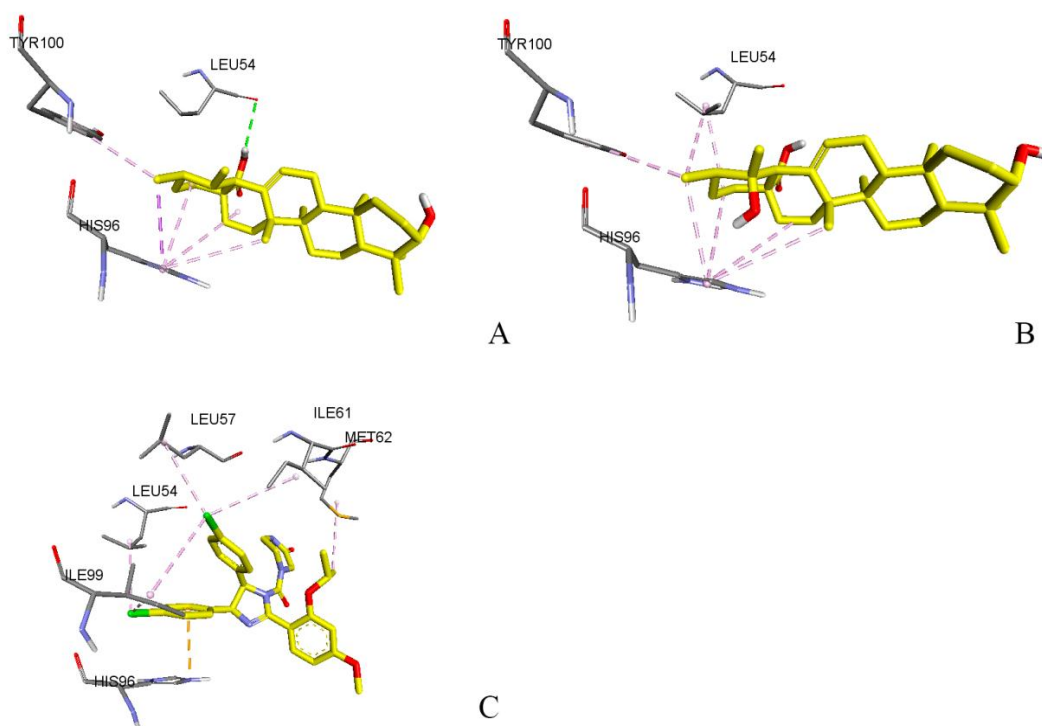


Рис. 35. Взаимодействие тритерпеновых кислот с MDM2: А) урсоловая; В) помоловая; С) референсный лиганд. Водородные связи выделены зеленым цветом

Предсказанные энергии связывания урсоловой и помоловой кислот сопоставимы с референсными лигандами, что может свидетельствовать об участии исследуемых соединений в активации внешнего пути запуска апоптоза посредством этих макромолекул. Показано, что обе кислоты связываются с Akt1 с помощью водородной связи между карбоксильной группой и GLU234 (Рис. 2). Карбоксильная группа тритерпеновых кислот также участвует в образовании связи между урсоловой и помоловой кислотами и MDM2 (Рис. 3), однако природа связи для кислот отличается: урсоловая связывается через водородную связь с LEU54, а помоловая – посредством гидрофобного взаимодействия. Взаимодействие как для тритерпеновых кислот, так и для референсных лигандов осуществляется посредством одних и тех же аминокислотных остатков, что указывает на верно выбранный сайт связывания.

Наши результаты о важности карбоксильной группы для цитотоксичности подтверждаются литературными данными: введение заместителей по карбоксильной группе урсоловой кислоты может существенно снизить цитотоксический эффект [Wang et al., 2012; Wang et al., 2000], поэтому, основываясь на результатах молекулярного моделирования и имеющихся данных, для модификаций была выбрана гидроксильная группа в 3-ем положении.

Для теоретического обоснования идеи, что после введения метки FITC связывание урсановых тритерпеновых кислот с выбранными макромолекулами сохранится, был проведен молекулярный докинг, позволяющий оценить энергию связывания белковой макромолекулы с потенциальным лигандом и сделать вывод о наличии или отсутствии взаимодействия. Расчетные энергии связывания меченых эпимеров урсоловой кислоты с Akt1 и MDM2 представлены в табл. 20, визуализация взаимодействий между лигандами и макромолекулами на рис. 36, 37.

Табл. 20. Результаты молекулярного моделирования взаимодействия эпимеров урсоловой кислоты с потенциальными мишенями, выполненного в AutoDock Vina

Лиганд	Расчетная энергия связывания, ккал/моль	
	Akt1	MDM2
Референсный	-8.8	-8.8
$\alpha$ -эпимер	-10.4	-7.4
$\beta$ -эпимер	-9.7	-8.9

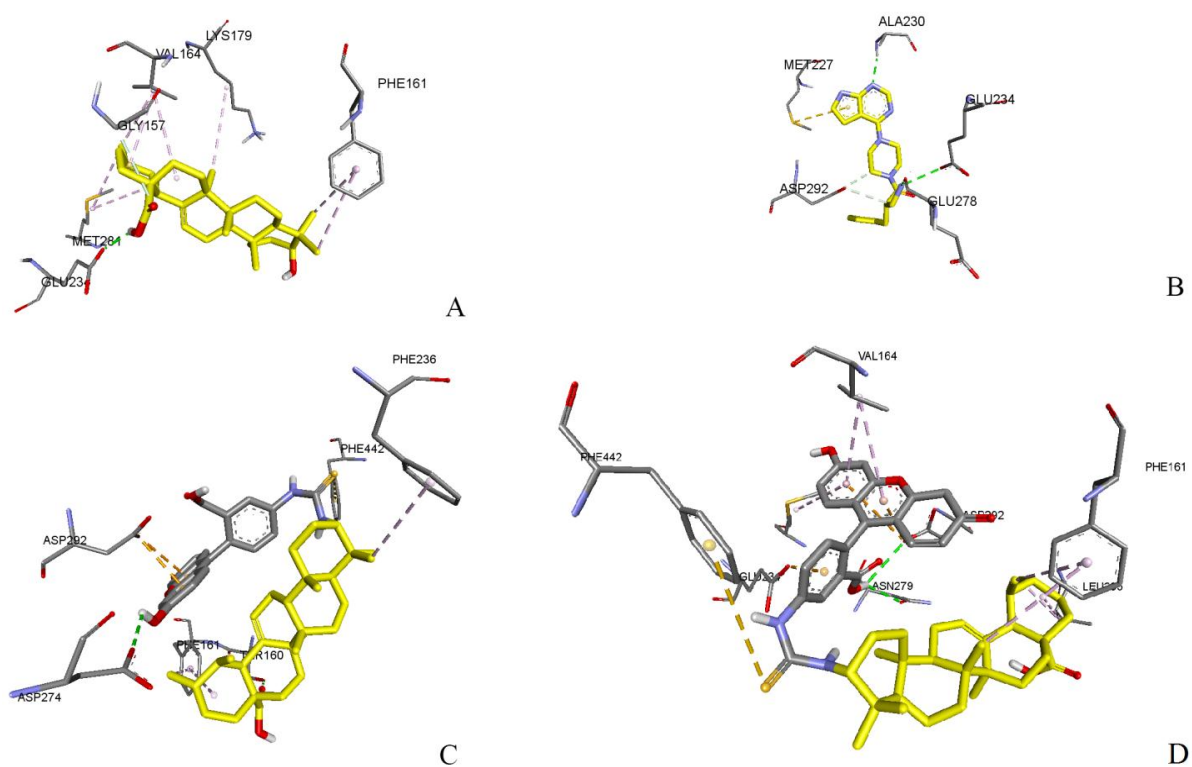


Рис. 36. Взаимодействие эпимеров урсоловой кислоты с Akt1: А) урсоловая; В) референсный лиганд; С)  $\alpha$ -эпимер; D)  $\beta$ -эпимер. Водородные связи выделены зеленым цветом

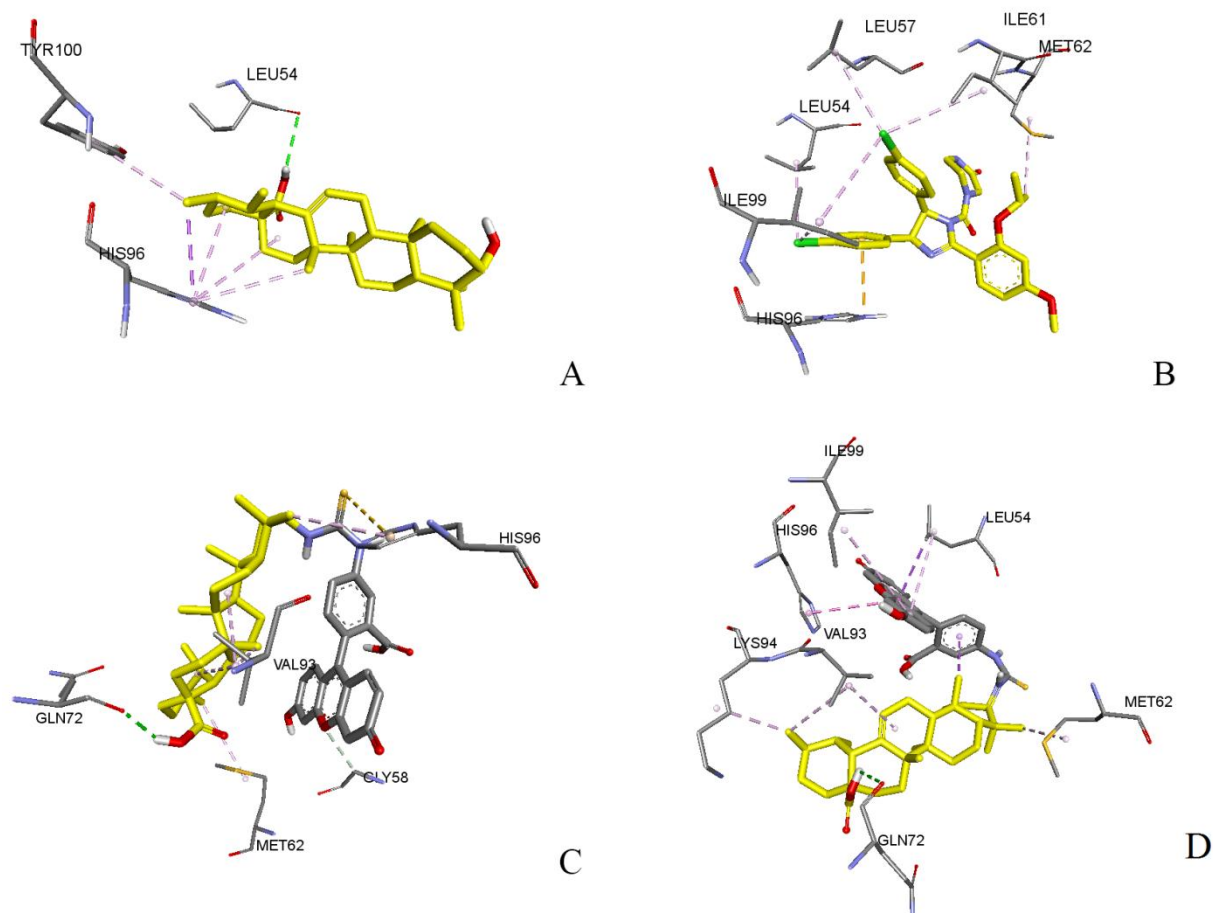


Рис. 37. Взаимодействие эпимеров урсоловой кислоты с MDM2: А) урсоловая; В) референсный лиганд; С)  $\alpha$ -эпимер; D)  $\beta$ -эпимер. Водородные связи выделены зеленым цветом

По результатам докинга взаимодействие при введении метки не только сохранится, но и усилится, так что если предположение об Akt1 и MDM2 как мишенях для тритерпеновых кислот урсанового ряда соответствует действительности, можно ожидать усиления цитотоксических свойств.

### 3.3.2. Синтез и характеристика флюоресцентно меченой урсоловой кислоты

Вначале были получены эпимеры урсоловой кислоты с  $\text{NH}_2$ -группой в 3-ем положении для последующего введения флюоресцентной метки. Продукт каждого этапа до мечения охарактеризован с помощью ЯМР-анализа. Данные подтверждают получение

нужного соединения (рис. 38–43). Для эимеров дополнительно была измерена температура плавления, результат совпадает с литературным [Brieskorn, Eschelbach, 1979].

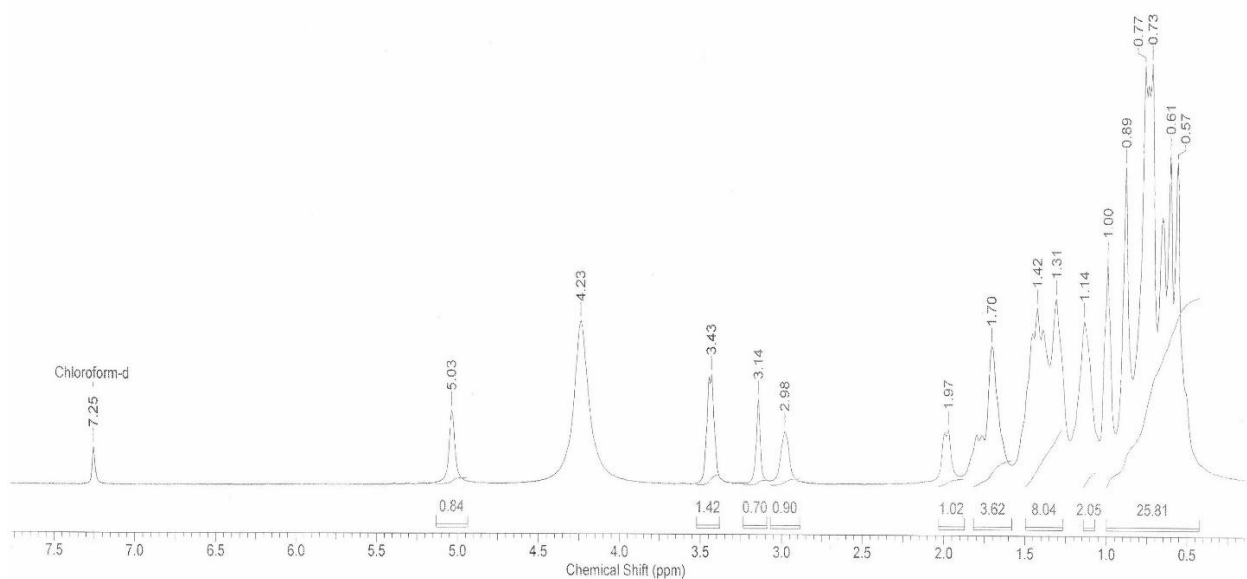


Рис. 38.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр урсоловой кислоты

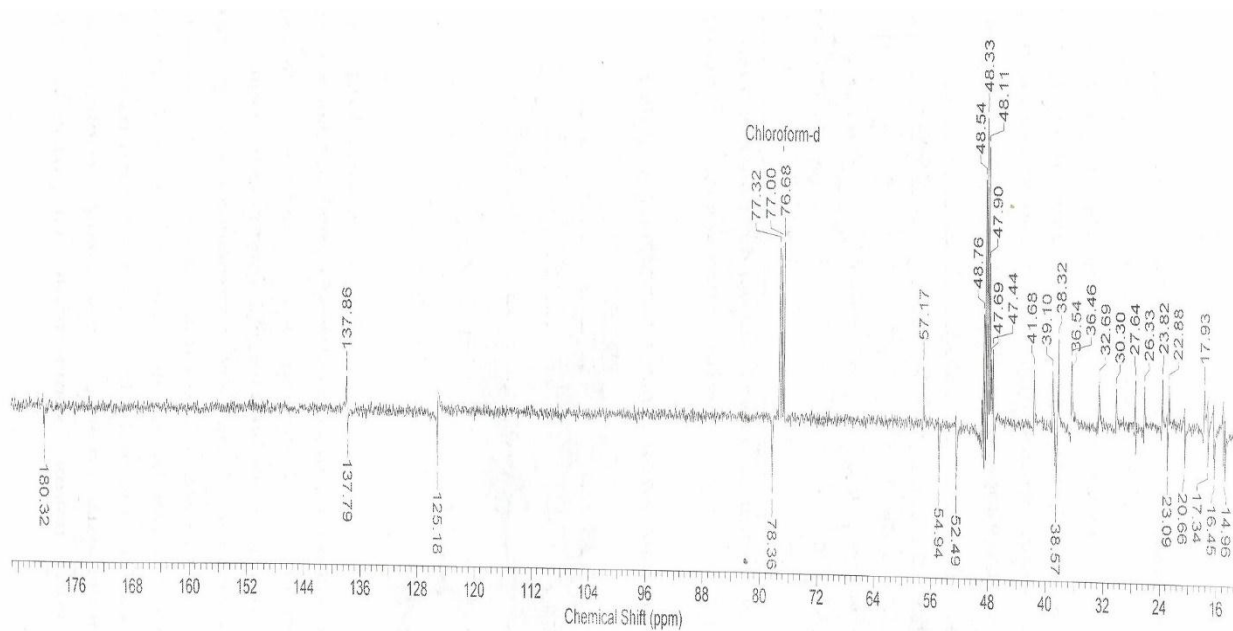
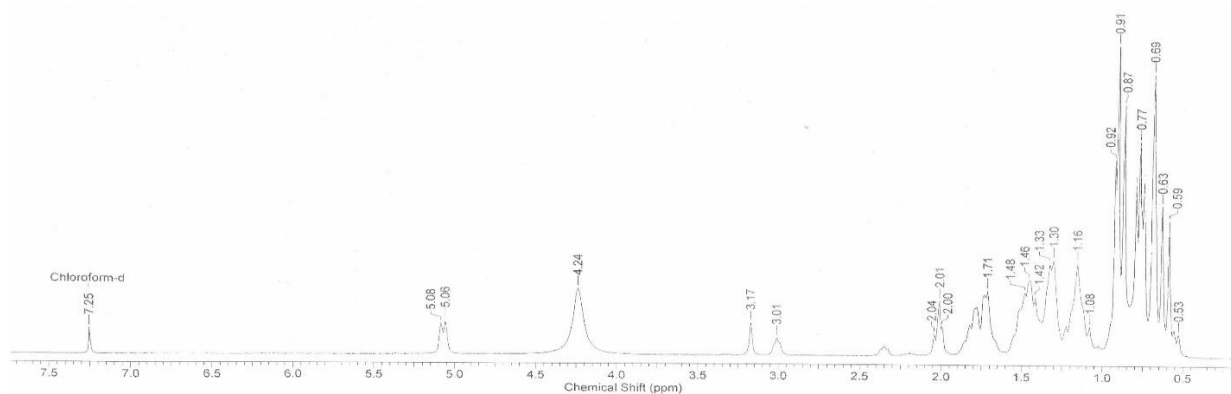
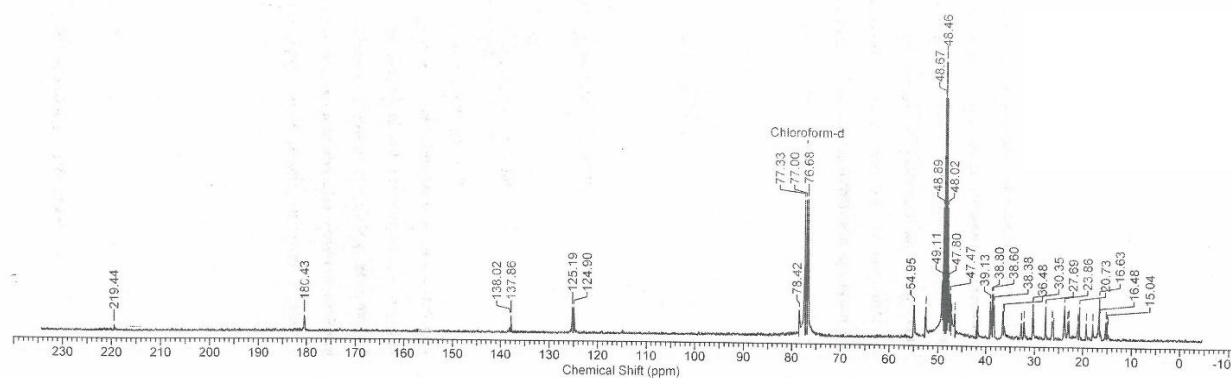
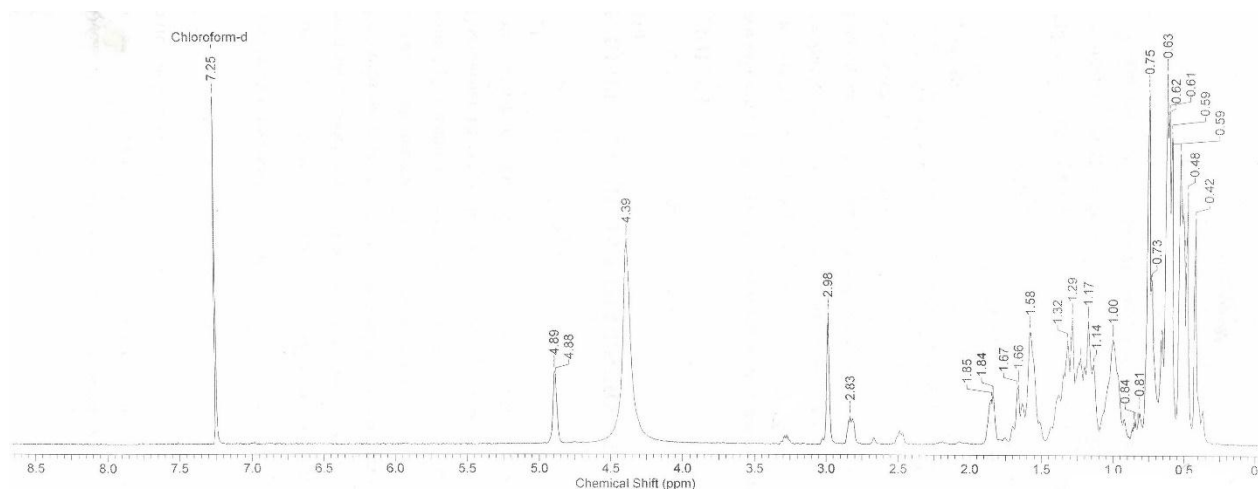
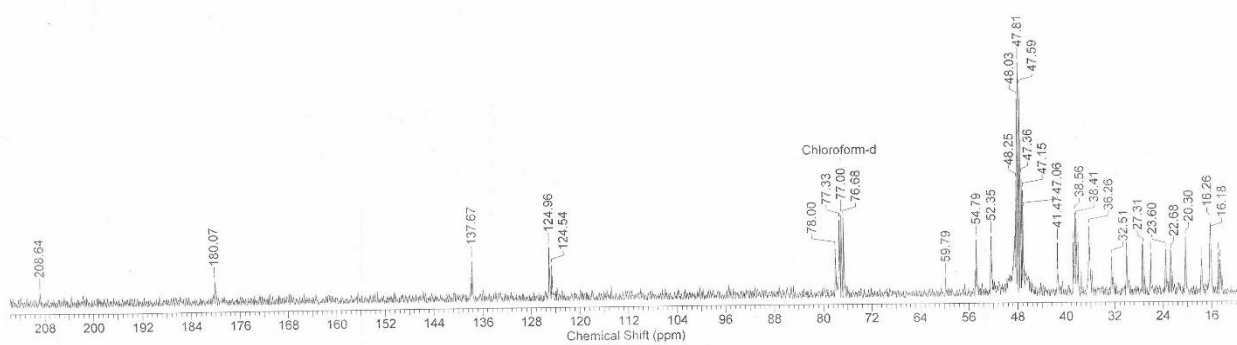


Рис. 39.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр урсоловой кислоты

Рис. 40.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр оксоуроловой кислотыРис. 41.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр оксоуроловой кислотыРис. 42.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр смеси эпимеровРис. 43.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр смеси эпимеров

Состав и строение полученных соединений подтверждены данными ЯМР-спектров, которые зарегистрировали появление в продуктах реакции сигналов, соответствующих системе сопряженных связей FITC (рис. 44–47).

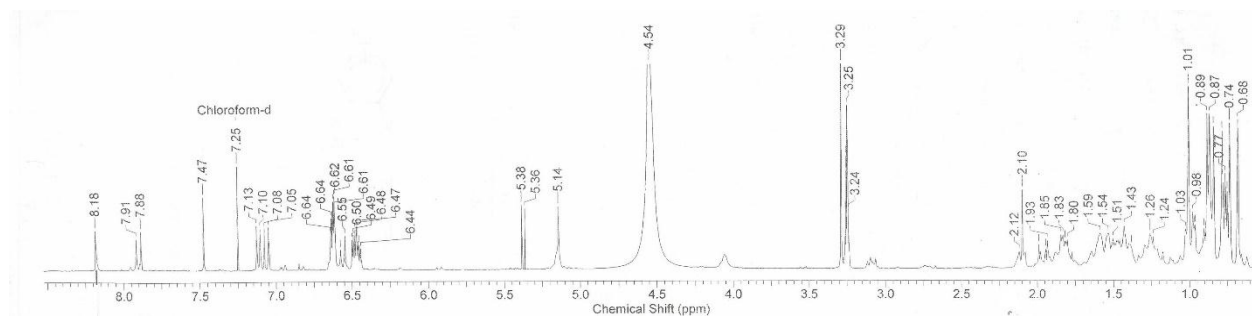


Рис. 44.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр  $\alpha$ -эпимера

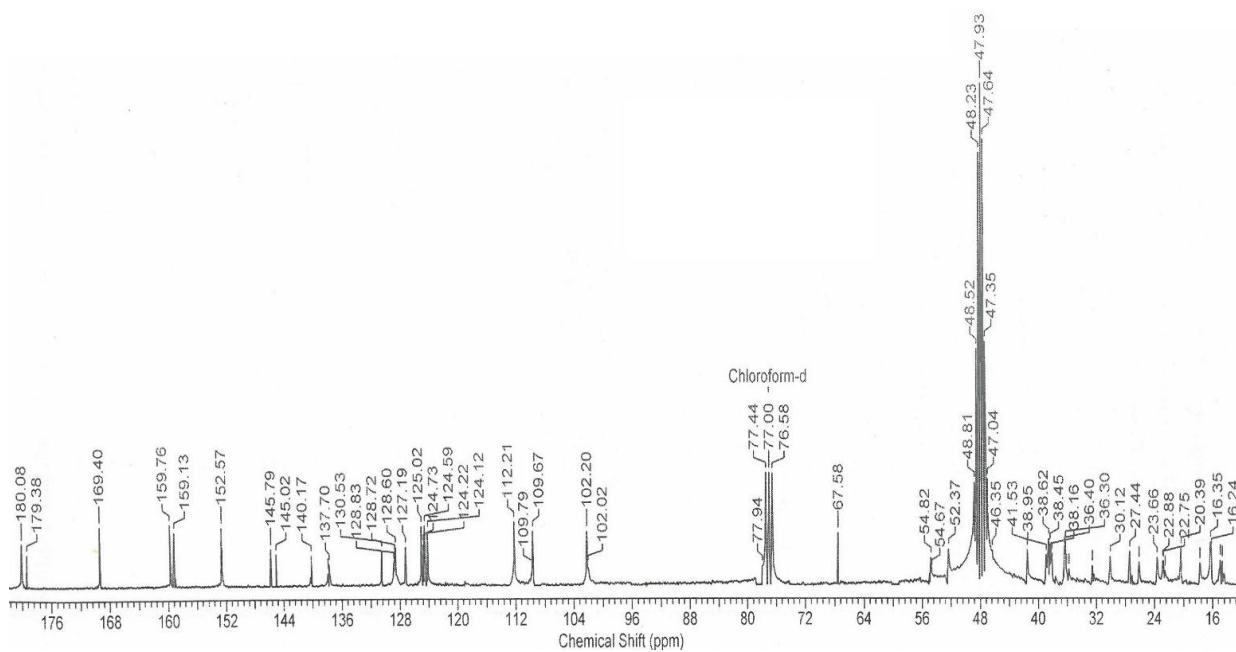
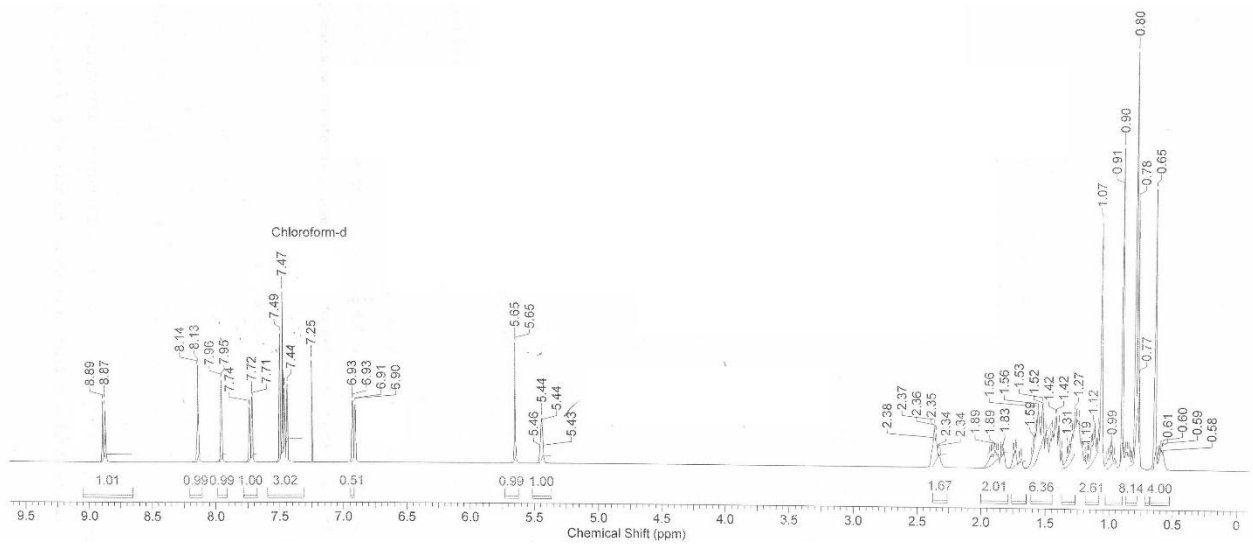
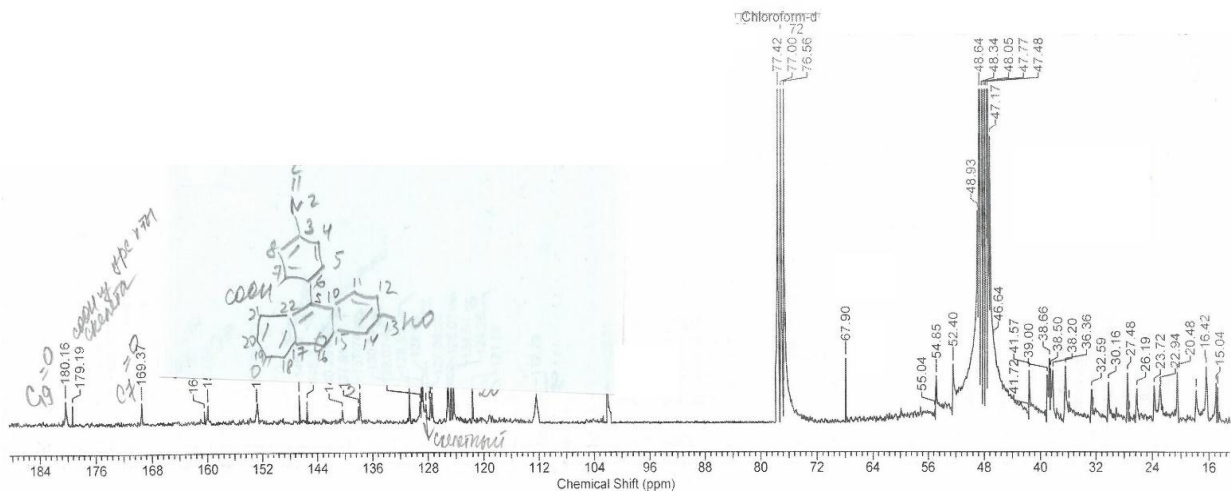
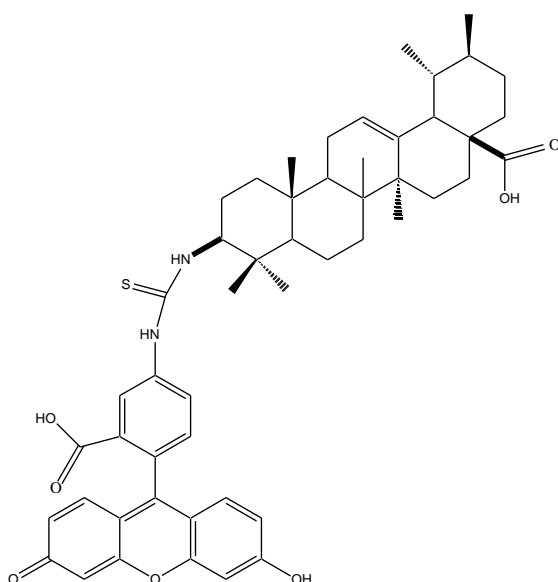
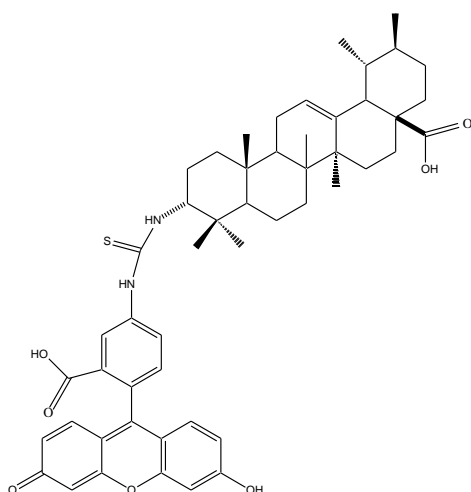


Рис. 45.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр  $\alpha$ -эпимера



Рис. 46.  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр  $\beta$ -эпимераРис. 47.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр  $\beta$ -эпимера

Исходя из полученных данных, химическая структура полученных эпимеров выглядит следующим образом (рис. 48, 49).

Рис. 48.  $\alpha$ -эпимер меченой урсоловой.Рис. 49.  $\beta$ -эпимер меченой урсоловой кислоты

Для дополнительной характеристики вышеописанных структур был проведен элементный анализ, подтверждающий соотношение элементов при данных структурах. Результаты в табл. 21.

Табл. 22. Элементный анализ меченой урсоловой кислоты

Атом	Процентное содержание	
	Вычислено	Найдено
C	72.03	71.78
H	6.91	6.81
N	3.43	3.40
S	3.92	3.82

### 3.3.3. Сравнение цитотоксичности нативной и меченой урсоловой кислоты

Следующим этапом была проверка изменения свойств в условиях *in vitro*. Для этого для урсоловой кислоты был проведен МТТ-тест, данные сведены в табл. 23, рис. 509, 51.

Табл. 23. Показатель цитотоксичности урсоловой кислоты в сравнении с помоловой ( $IC_{50}$ ) на панели онкотрансформированных клеточных линий

Клеточная линия	$IC_{50}$ , мкМ	
	урсоловая	помоловая
контроль (человеческие лимфоциты)	90.89	158
MCF-7	25.05	23.38
U87	43.82	23.38

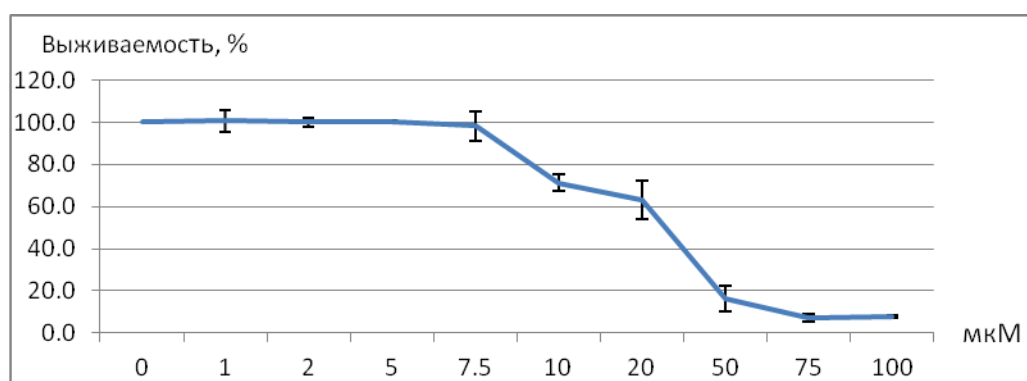


Рис. 50. Исследование цитотоксических свойств урсоловой кислоты в МТТ-тесте на линии MCF-7.

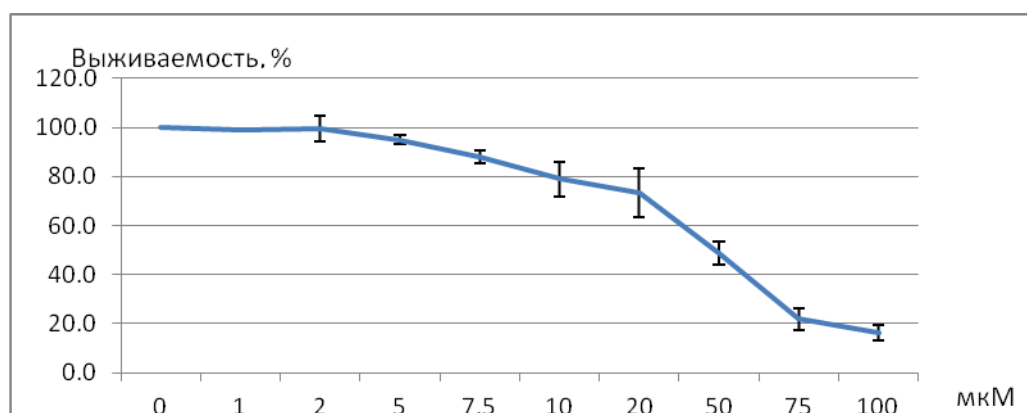


Рис. 51. Исследование цитотоксических свойств урсоловой кислоты в МТТ-тесте на линии U87.

Далее на этих же линиях были проверены цитотоксические свойства полученного конъюгата: Суммарная концентрация соединений составляла 50 мкМ, но соотношение метки постепенно менялось от 0 до 100%, остальную долю составляла нативная урсоловая кислота. Все эксперименты повторялись независимо трижды по 8 повторов в эксперименте. Результаты представлены в рис. 52, 53.

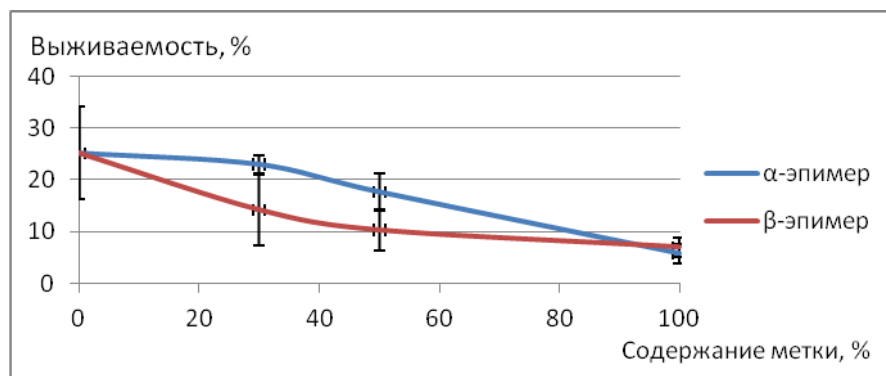


Рис. 52. Исследование цитотоксических свойств меченой урсоловой кислоты в МТТ-тесте на линии MCF-7

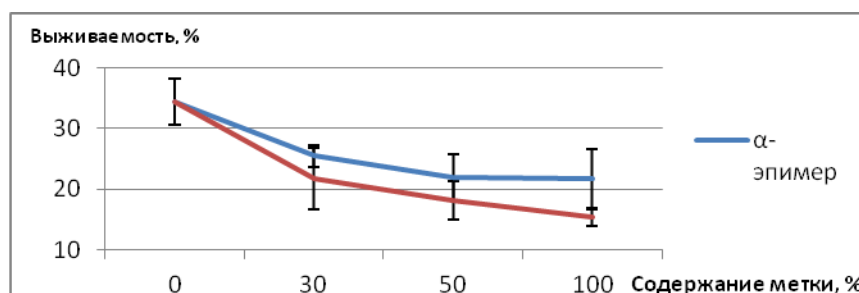


Рис. 53. Исследование цитотоксических свойств меченой урсоловой кислоты в МТТ-тесте на линии U87.

В экспериментах *in vitro* подтверждено, что введение метки усиливает цитотоксические свойства урсоловой кислоты, однако более выраженным эффектом обладает β-эпимер, который был подвергнут более детальному исследованию на наличие проапоптотических свойств на клетках линии MCF-7. Эта линия является достаточно изученной, в том числе при обработке тритерпеновыми соединениями, что позволит наиболее полно сопоставить полученные результаты с уже имеющимися данными.

### 3.3.4. Сравнение проапоптотических свойств нативной и меченой урсоловой кислоты

Детекция апоптоза производилась с помощью двойного окрашивания акридиновым оранжевым и бромистым этидием через 24 и 48 ч после обработки клеток линии MCF-7 меченой урсоловой кислотой в концентрации 25 мкМ. Фотографии сделаны на микроскопе Axio Observer (Carl Zeiss), анализ проводился визуально. Результаты в табл. 24 и рис. 54.

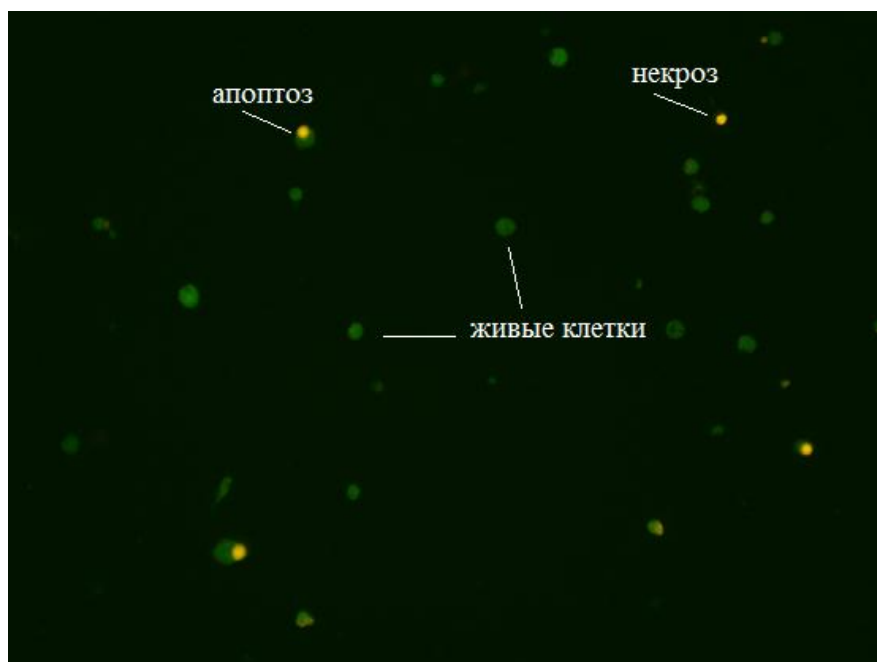


Рис. 54. Исследование проапоптотической активности меченой урсоловой кислоты на клетках линии MCF-7. Живые клетки окрашиваются в зеленый цвет акридиновым оранжевым, при апоптозе ядро клетки окрашивается красным бромистым этидием, цитоплазма – зеленым. Мертвые клетки окрашиваются только бромистым этидием.

Табл. 24. Детекция апоптоза с помощью окрашивания бромистым 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

Таким образом, мы показали, что введение метки усиливает проапоптотические свойства урсоловой кислоты, что согласуется с данными по увеличению цитотоксичности при включении метки FITC.

### 3.3.5. Исследование динамики проникновения и внутриклеточного распределения меченой урсоловой кислоты

Был проведен анализ клеток линии MCF-7, обработанных  $\beta$ -эпимером, с помощью конфокальной флюоресцентной микроскопии. Так как спустя 24 часа после обработки уже наблюдался существенный апоптотический эффект, клетки исследовались в первые сутки после обработки с интервалом в 3 ч. Для выявления изменения клеточной морфологии были использованы дополнительные красители: DAPI, CellMask Orange и MitoTracker Red. Такое сочетание визуализирует изменения в структуре плазмалеммы, внутренних мембранных органоидов (ЭПР), митохондрий и ядра.

Результаты конфокальной флюоресцентной микроскопии приведены на рис. 55.

Время, ч	DAPI+урсоловая*+CellMask Orange	DAPI+ урсоловая*+MitoTracker Red
3		
6		

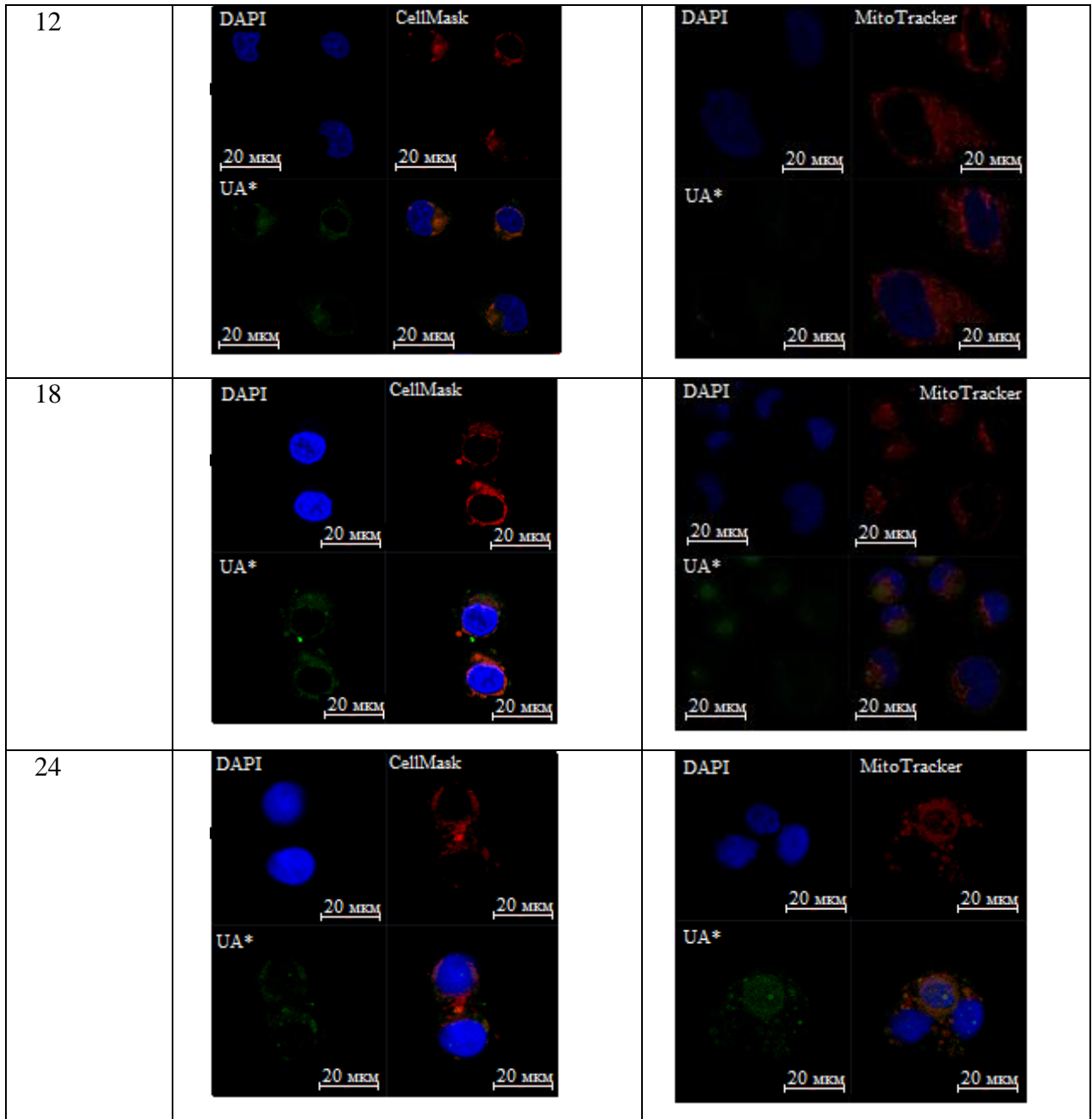


Рис. 55. Анализ проникновения и распределения меченой урсоловой кислоты в клетках линии MCF-7.

Появление сигнала меченой урсоловой кислоты в клетках линии MCF-7 регистрируется спустя 6 ч после обработки, затем сигнал усиливается с течением времени. После 12 ч инкубации с меченой урсоловой кислотой распределение ее сигнала визуально перекрывается с сигналом красителя CellMask Orange, что позволяет предположить локализацию метки на внутренних мембранных органеллах (ЭПР, комплекс Гольджи, эндосомы). С 18 ч локализация сигнала от меченой урсоловой кислоты начинает совпадать с MitoTracker Red, это может свидетельствовать о связывании препарата с рецепторами митохондрий. Наконец, спустя 24 ч сигнал обнаруживается не только на внутренних

мембранах и митохондриях, но и внутри ядра. Обработка изображений с помощью программы Zen (Carl Zeiss) визуализировала перекрывание сигналов от меченой урсоловой кислоты (FITC) с CellMask Orange и MitoTracker Red, что позволило убедиться в их колокализации (Рис. 56).

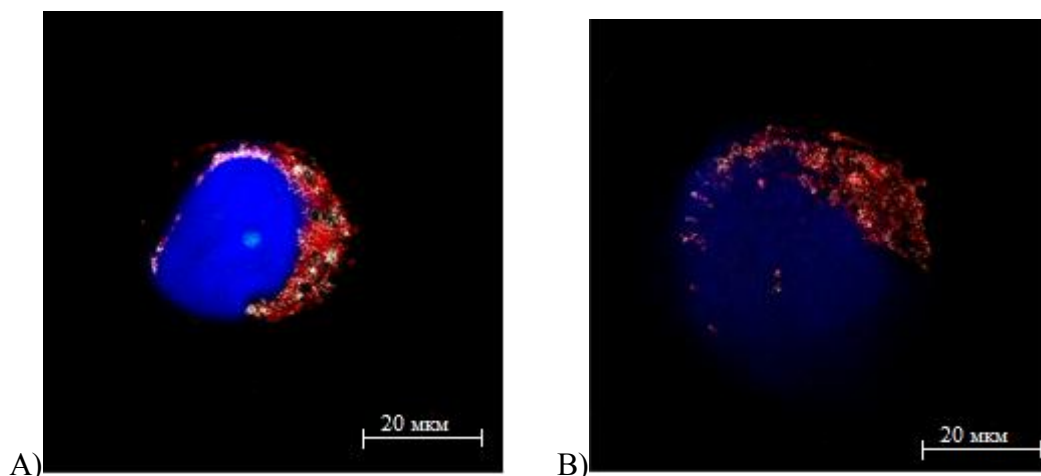


Рис. 56. Колокализация сигналов меченой урсоловой кислоты на клетках линии MCF-7. Белым цветом помечено перекрывание сигналов от меченой урсоловой кислоты и: А) CellMask Orange; В) и MitoTracker Red. Ядра окрашены DAPI.

Как уже упоминалось выше, для урсоловой кислоты с помощью биоинформатических подходов был предсказан ряд мишеней, в частности, Akt1 и MDM2 [He et al., 2015], имеются и экспериментальные данные, подтверждающие влияние урсоловой кислоты на эти белки [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]. Эксперимент по отслеживанию динамики проникновения и распределения меченой урсоловой кислоты показал, что после проникновения в клетку она изначально локализуется на внутренних мембранах, где и находится предполагаемая мишень Akt1 – белок, ингибирующий апоптоз. Его ингибирование урсоловой кислотой может индуцировать 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 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

Частота возникновения раковых опухолей в последнее время стремительно растет. Несмотря на снижение смертности при онкологических заболеваниях, они все еще входят в тройку самых опасных. В связи с этим исследование механизма перспективных противоопухолевых препаратов для дальнейшей разработки не только новых лекарств, но и принципиально новых стратегий в борьбе с этим заболеванием является очень актуальной задачей.

Соединения тритерпенового ряда хорошо зарекомендовали себя благодаря избирательной цитотоксической активности, которая подтвердилась в модельных экспериментах на животных. На данный момент некоторые полусинтетические производные тритерпеноидов находятся в стадии клинических испытаний. Стоит отметить, что, несмотря на избирательную цитотоксичность, тритерпеновые соединения рассматриваются не как самостоятельные противоопухолевые агенты, а как поддерживающие препараты при химиотерапии: они позволяют в разы снизить дозы препарата, снижая при этом негативные воздействия химиотерапии на организм; многие тритерпеновые соединения способны преодолевать синдром лекарственной резистентности опухоли. Противовоспалительное действие тритерпеновых соединений также способствует более эффективному лечению онкологических заболеваний.

В рамках данной работы была выделена в чистом виде помоловая кислота – тритерпеновое соединение урсанового ряда. Как и другие тритерпены, она обладает цитотоксическим и противовоспалительным эффектом, однако наиболее выражена ее способность преодолевать синдром лекарственной устойчивости. В силу того, что в растительном сырье она встречается редко и в небольших количествах, ее биологическая активность все еще изучена очень слабо. В условиях Западной Сибири мы впервые обнаружили источник помоловой кислоты с высоким содержанием помоловой кислоты – иван-чай узколистный (*C. angustifolium*), что делает его весьма привлекательной культурой для фармацевтической промышленности. Из его сырья был получен образец помоловой кислоты с чистотой 96%, который используется в биологических исследованиях. Впервые исследована безопасность помоловой кислоты в бактериальных тест-системах. Показано, что как помоловая кислота, так и ее метаболиты не обладают генотоксическими или мутагенными свойствами. Кроме этого, помоловая кислота проявила существенный антиоксидантный эффект.

Была расширена панель клеточных линий, для которых показана избирательная цитотоксичность помоловой кислоты. С помощью микроскопического исследования клеточных культур, обработанных помоловой кислотой, было показано, что механизм ее

цитотоксического действия зависит от наличия гена p53: для линий с нормальной работой этого гена отмечены морфологические изменения, характерные для параптоза – одного из программируемых путей клеточной смерти. В целом же помоловая кислота проявила цитотоксичность на клетках как с нормальным геном p53, так и дефицитных по этому гену. Впервые была показана способность помоловой кислоты индуцировать апоптоз в клетках глиального происхождения – U87.

С помощью молекулярного моделирования был предложен возможный механизм действия тритерпеновых кислот, который учитывает полученные результаты и литературные данные: в качестве наиболее вероятных кандидатов для связывания с тритерпеновыми кислотами предложены протеинкиназа B, Akt1, и E3 убиквитин-протеин лигаза, MDM2. Мишень Akt1 участвует как в индукции апоптоза внешним и митохондриальным путем, так и в запуске параптоза и аутофагии.

Для проверки гипотезы, основанной на молекулярном моделировании был предложен новый подход, основанный на введении флюоресцентной метки в молекулу тритерпеновых кислот урсанового ряда. В результате модельного эксперимента по получению урсоловой кислоты, меченной FITC, удалось зарегистрировать ее проникновение внутрь клеток и накопление эписмера вначале на внутренних мембранах, а затем на митохондриях, в единичных клетках сигнал наблюдался и в ядре. Сопоставляя результаты конфокальной микроскопии и моделирования, можно предположить, что наиболее вероятной мишенью для тритерпеновых кислот может являться Akt1 – ключевой белок внешнего сигнального пути, принимающий участие в регуляции внутреннего сигнального пути и аутофагии, и локализующийся преимущественно на внутренних клеточных мембранах. MDM2 локализуется в ядрышках клетки, но сигнала, соответствующего распределению меченого эписмера в ядрышках, не было обнаружено. Появление метки в митохондриях и некоторых ядрах клеток можно объяснить начинающимся апоптозом, который сопровождается нарушением целостности митохондриальной и ядерной мембран, однако триггером этих событий служит взаимодействие эписмера с Akt1.

## 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 эпитмера внутрь онконтрансформированных 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.

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор благодарит за помощь к. х. н. Т. П. Кукину, к. х. н. Т. А. Ваганову, д. х. н. Е. В. Малыхина (группа функциональных материалов НИОХ СО РАН); А. В. Липееву (лаборатория медицинской химии, НИОХ СО РАН); Д. С. Баева (лаборатория фармакологических исследований НИОХ СО РАН); В. В. Кандаурову и О. И Сальникову (лаборатория физических методов исследования НИОХ СО РАН), Т. А. Добринскую (лаборатория микроанализа НИОХ СО РАН); О. А. Коваль (лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН); Н. В. Губанову и К. Е. Орищенко (сектор клеточных технологий ИЦиГ СО РАН); С. И. Байбородина и Т. Е. Алешину (ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abate C. и др. Fluorescent Derivatives of  $\sigma$  Receptor Ligand 1-Cyclohexyl-4-[3-(5-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)propyl]piperazine (PB28) as a Tool for Uptake and Cellular Localization Studies in Pancreatic Tumor Cells // *J Med Chem*. 2011. Т. 54. № 16. С. 5858–5867.
2. Aggarwal B.B., Takada Y., Oommen O. V. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2004. Т. 13. № 10. С. 1327–1338.
3. Anil B. и др. The structure of an MDM2-Nutlin-3a complex solved by the use of a validated MDM2 surface-entropy reduction mutant // *Acta Crystallogr*. 2013. Т. 69. С. 1358–1366.
4. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation. // *Science*. 1998. Т. 281. № 5381. С. 1305–8.
5. Atlashkin V. и др. Deletion of the SNARE *vti1b* in Mice Results in the Loss of a Single SNARE Partner, Syntaxin 8 // *Mol. Cell. Biol*. 2003. Т. 23. № 15. С. 5198–5207.
6. Axe E.L. и др. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. // *J. Cell Biol*. 2008. Т. 182. № 4. С. 685–701.
7. Barnes K.R. и др. Fate of a bioactive fluorescent wortmannin derivative in cells. // *Bioconjug. Chem*. 2008. Т. 19. № 1. С. 130–7.
8. Blake J.F. и др. Discovery of pyrrolopyrimidine inhibitors of Akt // *Bioorg Med Chem Lett*. 2010. Т. 20. № 19. С. 5607–5612.
9. Blommaert E.F. и др. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. // *Eur. J. Biochem*. 1997. Т. 243. № 1–2. С. 240–6.
10. Boya P. и др. Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis // *Mol. Cell. Biol*. 2005. Т. 25. № 3. С. 1025–1040.
11. Brand M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. // *Exp. Gerontol*. 2010. Т. 45. № 7–8. С. 466–72.
12. Bravo R. и др. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2012. Т. 44. № 1. С. 16–20.
13. Brieskorn C.H., Eschelbach H. Glykamine von Ursol- und 18P-Glycyrrhetinsäure // *Arch. Pharm. Res*. 1979. Т. 312. С. 752–762.
14. Bröker L.E., Kruyt F.A.E., Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. // *Clin. Cancer Res*. 2005. Т. 11. № 9. С. 3155–62.
15. Canu N. и др. Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells // *J. Neurochem*. 2005. Т. 92. № 5. С. 1228–1242.
16. Cao S.S., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. // *Antioxid. Redox Signal*. 2014. Т. 21. № 3. С. 396–413.

17. Castro-Obregón S. и др. A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death // *Cell Death Differ.* 2002. Т. 9. № 8. С. 807–817.
18. Chang N.C. и др. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1. // *EMBO J.* 2010. Т. 29. № 3. С. 606–18.
19. Chaturvedi P.K., Bhui K., Shukla Y. Lupeol: connotations for chemoprevention // *Cancer Lett.* 2008. Т. 263. № 1. С. 1–13.
20. Chau B.N. и др. Aven, a Novel Inhibitor of Caspase Activation, Binds Bcl-xL and Apaf-1 // *Mol. Cell.* 2000. Т. 6. № 1. С. 31–40.
21. Chicheportiche Y. и др. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. // *J. Biol. Chem.* 1997. Т. 272. № 51. С. 32401–10.
22. Chinnaiyan A.M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. // *Neoplasia.* 1999. Т. 1. № 1. С. 5–15.
23. Chintharlapalli S. и др. Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome-dependent and -independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors. // *BMC Cancer.* 2011. Т. 11. С. 371.
24. Christoforidis S. и др. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. // *Nat. Cell Biol.* 1999. Т. 1. № 4. С. 249–52.
25. Clarke P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. // *Anat. Embryol. (Berl).* 1990. Т. 181. № 3. С. 195–213.
26. Cornelius W.W. и др. Antimicrobial Marine Natural Products from the Sponge, *Axinella infundibuliformis* // *Rec. Nat. Prod.* 2008. Т. 2. № 4. С. 116–127.
27. Cory S., Adams J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. // *Nat. Rev. Cancer.* 2002. Т. 2. № 9. С. 647–56.
28. Crawford K.W., Bowen W.D. Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. // *Cancer Res.* 2002. Т. 62. № 1. С. 313–322.
29. Criollo A. и др. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. // *Cell Death Differ.* 2007. Т. 14. № 5. С. 1029–39.
30. Dal Canto M.C., Gurney M.E. Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. // *Am. J. Pathol.* 1994. Т. 145. № 6. С. 1271–9.
31. Díaz J.F. и др. Macromolecular accessibility of fluorescent taxoids bound at a paclitaxel binding site in the microtubule surface. // *J. Biol. Chem.* 2005. Т. 280. № 5. С. 3928–37.
32. Du C. и др. Smac, a Mitochondrial Protein that Promotes Cytochrome c-Dependent Caspase Activation by Eliminating IAP Inhibition // *Cell.* 2000. Т. 102. № 1. С. 33–42.

33. Dufner A. и др. Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Т. 19. № 6. С. 4525–34.
34. Ekman R. The Suberin Monomers and Triterpenoids from the Outer Bark of *Betula verrucosa* Ehrh. // *Holzforschung*. 1983. Т. 37. № 4. С. 205–211.
35. Es-saady D. и др. Inhibitory effect of ursolic acid on B 16 proliferation through cell cycle arrest // *Cancer Lett.* 1996. Т. 106. С. 193–197.
36. Feng Z. и др. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. Т. 102. № 23. С. 8204–8209.
37. Fernandes J. и др. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: Cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines // *Cancer Lett.* 2003. Т. 190. № 2. С. 165–169.
38. Fernandes J. и др. Pomolic acid triggers mitochondria-dependent apoptotic cell death in leukemia cell line // *Cancer Lett.* 2005. Т. 219. № 1. С. 49–55.
39. Fernandes J. и др. Pomolic acid may overcome multidrug resistance mediated by overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 proteins // *Cancer Lett.* 2007. Т. 245. № 1–2. С. 315–320.
40. Filimonenko M. и др. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease // *J. Cell Biol.* 2007. Т. 179. № 3. С. 485–500.
41. Fimia G.M. и др. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. // *Nature*. 2007. Т. 447. № 7148. С. 1121–5.
42. Fombonne J. и др. Epidermal growth factor triggers an original, caspase-independent pituitary cell death with heterogeneous phenotype. // *Mol. Biol. Cell.* 2004. Т. 15. № 11. С. 4938–48.
43. Fombonne J. и др. A novel paraptosis pathway involving LEI/L-DNaseII for EGF-induced cell death in somato-lactotrope pituitary cells. // *Apoptosis*. 2006. Т. 11. № 3. С. 367–75.
44. Frieden M. и др. Ca(2+) homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1. // *J. Biol. Chem.* 2004. Т. 279. № 21. С. 22704–14.
45. Frolova T. и др. Isolation of pomolic acid from *Chamaenerion angustifolium* and the evaluation of its potential genotoxicity in bacterial test systems. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2014. Т. 40. № 1. С. 82–88.
46. Fujita N. и др. The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy // *Mol. Biol. Cell.* 2008a. Т. 19. № 5. С. 2092–2100.
47. Fujita N. и др. An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure // *Mol. Biol. Cell.* 2008b. Т. 19. № 11. С. 4651–4659.



48. Fulda S. и др. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors // *Cancer Res.* 1997. Т. 57. С. 4956–4964.
49. Fulda S. и др. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid // *J Biol Chem.* 1998. Т. 273. С. 33942–33948.
50. Fulda S. Betulinic acid: a natural product with anticancer activity // *Mol Nutr Food Res.* 2009. Т. 53. С. 140–146.
51. Fulda S., Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. // *Drug Discov. Today.* 2009. Т. 14. № 17–18. С. 885–90.
52. Fülöp L., Penke B., Zarándi M. Synthesis and fluorescent labeling of beta-amyloid peptides. // *J. Pept. Sci.* 2001. Т. 7. № 8. С. 397–401.
53. Furtado R.A. и др. Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon. // *Toxicol. Pathol.* 2008. Т. 36. № 4. С. 576–80.
54. Furuya N. и др. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. // *Autophagy.* 2005. Т. 1. № 1. С. 46–52.
55. Galgon T., Wohlrab W., Dräger B. Betulinic acid induces apoptosis in skin cancer cells and differentiation in normal human keratinocytes // *Exp Dermatol.* 2005. Т. 14. С. 736–743.
56. García M.L., Fernández A., Solas M.T. Mitochondria, motor neurons and aging. // *J. Neurol. Sci.* 2013. Т. 330. № 1–2. С. 18–26.
57. Garrido C. и др. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. // *Cell Death Differ.* 2006. Т. 13. № 9. С. 1423–33.
58. Gerhauser C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components // *Planta Med.* 2008. Т. 74. № 13. С. 1608–1624.
59. Gerl R., Vaux D.L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. // *Carcinogenesis.* 2005. Т. 26. № 2. С. 263–70.
60. Gertsch J. и др. Making Epothilones Fluoresce: Design, Synthesis, and Biological Characterization of a Fluorescent N12-Aza-Epothilone (Azathilone). // *Chembiochem.* 2009. Т. 10. № 15. С. 2513–21.
61. Glen A.T. и др. Triterpenoid constituents of rose-bay willow-herb // *J. Chem. Soc. C.* 1967. Т. 6. С. 510–515.
62. Gruenwald J., Brendler T., Jaenicke C. PDR for Herbal Medicines. Montvale: Medical Economics Company, 2000. 1106 с.
63. Gutierrez M.G. и др. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. // *J. Cell Sci.* 2004. Т. 117. № Pt 13. С. 2687–97.
64. Hailey D.W. и др. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during

- starvation. // *Cell*. 2010. Т. 141. № 4. С. 656–67.
65. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // 2001.
66. Hanada T. и др. The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy // *J. Biol. Chem.* 2007. Т. 282. № 52. С. 37298–37302.
67. Harmand P.O. и др. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells // *Int. J. Cancer*. 2005. Т. 114. № 1. С. 1–11.
68. Hartwig C.L. и др. Investigating the Antimalarial Action of 1,2,4-Trioxolanes with Fluorescent Chemical Probes // *J Med Chem*. 2011. Т. 54. № 23. С. 8207–8213.
69. Hata K. и др. Anti-leukemia activities of Lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupane triterpene // *Toxicol. Lett.* 2003. Т. 143. № 1. С. 1–7.
70. Haugland R.P., Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research products. : Molecular Probes, 2002. 966 с.
71. Hayashi-Nishino M. и др. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. // *Nat. Cell Biol.* 2009. Т. 11. № 12. С. 1433–7.
72. He W. и др. A bioinformatic and mechanistic study elicits the antifibrotic effect of ursolic acid through the attenuation of oxidative stress with the involvement of ERK, PI3K/Akt, and p38 MAPK signaling pathways in human hepatic stellate cells and rat liver. // *Drug Des. Devel. Ther.* 2015. Т. 9. С. 3989–4104.
73. Hemelaar J. и др. A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L // *J. Biol. Chem.* 2003. Т. 278. № 51. С. 51841–51850.
74. Hiermann A., Bucar F. Studies of *Epilobium angustifolium* extracts on growth of accessory sexual organs in rats // *J. Ethnopharmacol.* 1997. Т. 55. № 3. С. 179–183.
75. Hiermann A., Mayr K. The investigation of active compounds from *Epilobium* species. The occurrence of sitosterol derivatives in *Epilobium angustifolium* L. and *Epilobium parviflorum* Schreb // *Sci. Pharm.* 1985. Т. 53. С. 39–44.
76. Hill M.M. и др. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. // *EMBO J.* 2004. Т. 23. № 10. С. 2134–45.
77. Hoa N.T. и др. Human monocytes kill M-CSF-expressing glioma cells by BK channel activation. // *Lab. Invest.* 2007. Т. 87. № 2. С. 115–29.
78. Hoffmann C. и др. Fluorescein isothiocyanate-labeled human plasma fibronectin in extracellular matrix remodeling // *Anal. Biochem.* 2008. Т. 372. № 1. С. 62–71.
79. Hsu H., Xiong J., Goeddel D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. // *Cell*. 1995. Т. 81. № 4. С. 495–504.

80. Huang L. и др. Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus* // *Planta*. 2012. Т. 236. № 5. С. 1571–1581.
81. Huyke C. и др. Treatment of actinic keratoses with a novel betulin-based oleogel. A prospective, randomized, comparative pilot study. // *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2009. Т. 7. № 2. С. 128–33.
82. Igney F.H., Krammer P.H. DEATH AND ANTI-DEATH: TUMOUR RESISTANCE TO APOPTOSIS // *Nat. Rev. Cancer*. 2002. Т. 2. № 4. С. 277–288.
83. Inbal B. и др. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death // *J. Cell Biol.* 2002. Т. 157. № 3. С. 455–468.
84. Itakura E. и др. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. // *Mol. Biol. Cell*. 2008. Т. 19. № 12. С. 5360–72.
85. Jadus M.R. и др. Human U251MG glioma cells expressing the membrane form of macrophage colony-stimulating factor (mM-CSF) are killed by human monocytes in vitro and are rejected within immunodeficient mice via paraptosis that is associated with increased expression of thre // *Cancer Gene Ther.* 2003. Т. 10. № 5. С. 411–20.
86. Jäger S. и др. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. // *J. Cell Sci.* 2004. Т. 117. № Pt 20. С. 4837–48.
87. Jäger S. и др. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. // *Planta Med.* 2007. Т. 73. № 2. С. 157–62.
88. Jäger S., Laszczyk M.N., Scheffler A. A preliminary pharmacokinetic study of betulin, the main pentacyclic triterpene from extract of outer bark of birch (*Betulae alba cortex*). // *Molecules*. 2008. Т. 13. № 12. С. 3224–35.
89. Jedinák A. и др. Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. // *Zeitschrift für Naturforschung. C, J. Biosci.* 2006. Т. 61. № 11–12. С. 777–82.
90. Jia L. и др. Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells // *Br. J. Haematol.* 1997. Т. 98. № 3. С. 673–685.
91. Juan H., Sametz W., Hiermann A. Anti-inflammatory effects of a substance extracted from *Epilobium angustifolium* // *Agents Actions*. 1988. Т. 23. С. 106–107.
92. Juan M.E. и др. Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. // *Mol. Nutr. Food Res.* 2008. Т. 52. № 5. С. 595–9.
93. Junco J.J. и др. Ursolic acid and resveratrol synergize with chloroquine to reduce melanoma cell viability // *Melanoma Res.* 2015. Т. 25. № 2. С. 103–112.
94. Kabeya Y. и др. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing // *EMBO J.* 2000. Т. 19. № 21. С. 5720–5728.

95. Kametaka S. и др. Structural and functional analyses of APG5 a gene involved in autophagy in yeast // *Gene*. 1996. Т. 178. № 1. С. 139–143.
96. Kashiwagi H. и др. Sigma-2 receptor ligands potentiate conventional chemotherapies and improve survival in models of pancreatic adenocarcinoma. // *J. Transl. Med.* 2009. Т. 7. С. 24.
97. Kashyap D., Tuli H.S., Sharma A.K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential // *Life Sci.* 2016.
98. Kasibhatla S. и др. Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis // *Cold Spring Harb. Protoc.*
99. Kasperczyk H. и др. Betulinic acid as new activator of NF-kappaB: molecular mechanisms and implications for cancer therapy. // *Oncogene*. 2005. Т. 24. № 46. С. 6945–56.
100. Kassi E. и др. Ursolic acid triggers apoptosis and Bcl-2 downregulation in MCF-7 breast cancer cells. // *Cancer Invest.* 2009. Т. 27. № 7. С. 723–33.
101. Kassi E., Moutsatsou P. Glucocorticoid receptor signaling and prostate cancer. // *Cancer Lett.* 2011. Т. 302. № 1. С. 1–10.
102. Kataoka T. и др. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. // *J. Immunol.* 1998. Т. 161. № 8. С. 3936–42.
103. Kessler J.H. и др. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types // *Cancer Lett.* 2007. Т. 251. С. 132–145.
104. Kihara A. и др. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. // *EMBO Rep.* 2001. Т. 2. № 4. С. 330–5.
105. Kim D.S.H.L., Pezzuto J.M., Pisha E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998. Т. 8. № 13. С. 1707–1712.
106. Kimura S., Noda T., Yoshimori T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes // *Cell Struct. Funct.* 2008.
107. King K.L., Cidlowski J.A. Cell cycle regulation and apoptosis. // *Annu. Rev. Physiol.* 1998. Т. 60. С. 601–17.
108. Kischkel F.C. и др. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. // *EMBO J.* 1995. Т. 14. № 22. С. 5579–88.
109. Klionsky D.J. и др. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. // *Autophagy*. 2008. Т. 4. № 2. С. 151–75.
110. Köchl R. и др. Microtubules Facilitate Autophagosome Formation and Fusion of Autophagosomes with Endosomes // *Traffic*. 2006. Т. 7. № 2. С. 129–145.
111. Korolchuk V.I. и др. Autophagy Inhibition Compromises Degradation of Ubiquitin-

- Proteasome Pathway Substrates // *Mol. Cell*. 2009. Т. 33. № 4. С. 517–527.
112. Kroemer G. и др. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. // *Cell Death Differ.* 2009. Т. 16. № 1. С. 3–11.
113. Kroemer G., Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. Т. 9. № 12. С. 1004–1010.
114. Kuma A. и др. The role of autophagy during the early neonatal starvation period // *Nature*. 2004. Т. 432. № 7020. С. 1032–1036.
115. Landmesser L., Pilar G. Fate of ganglionic synapses and ganglion cell axons during normal and induced cell death. // *J. Cell Biol.* 1976. Т. 68. № 2. С. 357–74.
116. Laszczyk M. и др. Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (*betulae cortex*). // *Planta Med.* 2006. Т. 72. № 15. С. 1389–95.
117. Laszczyk M.N. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy // *Planta Med.* 2009. Т. 75. № 15. С. 1549–1560.
118. Lee D. и др. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products // *Pharmacol. Ther.* 2016. Т. 162. С. 120–133.
119. Lee I. и др. Ursolic acid-induced changes in tumor growth, O<sub>2</sub> consumption, and tumor interstitial fluid pressure. // *Anticancer Res.* 2001. Т. 21. № 4A. С. 2827–33.
120. Lee J.-A. и др. ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. , 2007a. 1561-1567 с.
121. Lee S.B. и др. ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase // *EMBO Rep.* 2007b. Т. 8. С. 360–365.
122. Lee S.Y. и др. Nutlin-3 induces BCL2A1 expression by activating ELK1 through the mitochondrial p53-ROS-ERK1/2 pathway // *Int J Oncol.* 2014. Т. 45. № 2.
123. Lee T.-H. и др. Triterpene Acids from the Leaves of *Planchonella Duclitan* (Blanco) *Bakhuizen* // *J. Chinese Chem. Soc.* 2005. Т. 52. № 6. С. 1275–1280.
124. Lee T.K. и др. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-kappaB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model. // *Cancer Res.* 2007c. Т. 67. № 18. С. 8800–9.
125. Leng S. и др. Ursolic acid promotes cancer cell death by inducing Atg5-dependent autophagy // *Int. J. Cancer.* 2013. Т. 133. № 12. С. 2781–2790.
126. Levi J. и др. Fluorescent Fructose Derivatives for Imaging Breast Cancer Cells // *Bioconjug Chem.* 2007. Т. 18. № 3. С. 628–634.
127. Li J., Liang X., Yang X. Ursolic acid inhibits growth and induces apoptosis in gemcitabine-resistant human pancreatic cancer via the JNK and PI3K / Akt / NF- $\kappa$ B pathways // *Oncol. Rep.*

2012. Т. 28. С. 501–510.

128. Liang C. и др. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. // *Nat. Cell Biol.* 2006. Т. 8. № 7. С. 688–99.

129. Liang C. и др. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking // *Nat. Cell Biol.* 2008. Т. 10. № 7. С. 776–787.

130. Liby K.T., Yore M.M., Sporn M.B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. // *Nat. Rev. Cancer.* 2007. Т. 7. № 5. С. 357–369.

131. Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid // *J Ethnopharmacol.* 1995. Т. 49. № 2. С. 57–68.

132. Liu W.K. и др. Apoptotic activity of betulinic acid derivatives on murine melanoma B16 cell line // *Eur J Pharmacol.* 2004. Т. 498. С. 71–78.

133. Lohrum M.A. и др. Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. // *Nat. Cell Biol.* 2000. Т. 2. № 3. С. 179–81.

134. Loo G. van и др. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. // *Cell Death Differ.* 2002. Т. 9. № 1. С. 20–6.

135. Lowe S.W., Lin A.W. Apoptosis in cancer. // *Carcinogenesis.* 2000. Т. 21. № 3. С. 485–95.

136. Lu C.-C. и др. Ursolic acid triggers nonprogrammed death (necrosis) in human glioblastoma multiforme DBTRG-05MG cells through MPT pore opening and ATP decline. // *Mol. Nutr. Food Res.* 2014. Т. 58. № 11. С. 1–11.

137. Lu X. и др. Ursolic acid attenuates diabetic mesangial cell injury through the up-regulation of autophagy via miRNA-21/PTEN/Akt/mTOR suppression. // *PLoS One.* 2015. Т. 10. № 2. С. e0117400.

138. Luo S., Rubinsztein D.C. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. // *Cell Death Differ.* 2010. Т. 17. № 2. С. 268–77.

139. Luo Z., Zang M., Guo W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. // *Future Oncol.* 2010. Т. 6. № 3. С. 457–70.

140. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. // *Am. J. Pathol.* 1995. Т. 146. № 1. С. 3–15.

141. Manu K. a., Kuttan G. Ursolic acid induces apoptosis by activating p53 and caspase-3 gene expressions and suppressing NF- $\kappa$ B mediated activation of bcl-2 in B16F-10 melanoma cells // *Int. Immunopharmacol.* 2008. Т. 8. С. 974–981.

142. Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. // *Mutat. Res.* 1983. Т. 113. № 3–4. С. 173–215.

143. Martin R. и др. Acidic triterpenes compromise growth and survival of astrocytoma cell lines by regulating reactive oxygen species accumulation // *Cancer Res.* 2007. Т. 67. С. 3741–3751.
144. Matsunaga K. и др. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages // *Nat. Cell Biol.* 2009. Т. 11. № 4. С. 385–396.
145. Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Mochayedi S. Sources of variability of the *Escherichia coli* PQ37 genotoxicity assay (SOS chromotest). // *Mutat. Res.* 1991. Т. 252. № 1. С. 51–60.
146. Mi Q. и др. Use of the in vivo hollow fiber assay in natural products anticancer drug discovery. // *J. Nat. Prod.* 2009. Т. 72. № 3. С. 573–80.
147. Mimnaugh E.G. и др. Endoplasmic reticulum vacuolization and valosin-containing protein relocalization result from simultaneous hsp90 inhibition by geldanamycin and proteasome inhibition by velcade. // *Mol. Cancer Res.* 2006. Т. 4. № 9. С. 667–81.
148. Miyashita T. и др. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. // *Oncogene.* 1994. Т. 9. № 6. С. 1799–805.
149. Mizushima N. и др. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. // *J. Cell Sci.* 2003. Т. 116. № Pt 9. С. 1679–88.
150. Mizushima N. и др. Autophagy fights disease through cellular self-digestion // *Nature.* 2008. Т. 451. № 7182. С. 1069–1075.
151. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // *J. Immunol. Methods.* 1983. Т. 65. № 1–2. С. 55–63.
152. Mullauer F.B., Kessler J.H., Medema J.P. Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion // *Apoptosis.* 2009. № 14. С. 191–202.
153. Murtaza I. и др. Suppression of cFLIP by lupeol, a dietary triterpene, is sufficient to overcome resistance to TRAIL-mediated apoptosis in chemoresistant human pancreatic cancer cells. // *Cancer Res.* 2009. Т. 69. № 3. С. 1156–65.
154. Nakatogawa H., Ichimura Y., Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion // *Cell.* 2007. Т. 130. № 1. С. 165–178.
155. Nemoto T. и др. The Mouse APG10 Homologue, an E2-like Enzyme for Apg12p Conjugation, Facilitates MAP-LC3 Modification // *J. Biol. Chem.* 2003. Т. 278. № 41. С. 39517–39526.
156. Neto C.C., Amoroso J.W., Liberty A.M. Anticancer activities of cranberry phytochemicals: An update // *Mol. Nutr. Food Res.* 2008. Т. 52. № SUPPL. 1. С. 18–27.

157. Newmeyer D.D. и др. Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. // *Cell Death Differ.* 2000. Т. 7. № 4. С. 402–7.
158. Nikolettou V. и др. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2013. Т. 1833. № 12. С. 3448–3459.
159. Noda Y. и др. Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing // *Chem Pharm Bull.* 1997. Т. 45. С. 1665–1670.
160. Numata A. и др. Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, Goreishi. // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 1989. Т. 37. № 3. С. 648–51.
161. Ostensfeld M.S. и др. Effective Tumor Cell Death by  $\sigma$ -2 Receptor Ligand Siramesine Involves Lysosomal Leakage and Oxidative Stress // *Cancer Res.* 2005. Т. 65. № 19. С. 8975–8983.
162. Ovesná Z. и др. Pentacyclic triterpenoic acids: New chemoprotective compounds. Minireview // *Neoplasma.* 2004. Т. 51. № 5. С. 327–333.
163. Pattingre S. и др. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy // *Cell.* 2005. Т. 122. № 6. С. 927–939.
164. Peter M.E., Krammer P.H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis // *Curr Opin Immunol.* 1998. Т. 5. С. 545–51.
165. Petiot A. и др. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. // *J. Biol. Chem.* 2000. Т. 275. № 2. С. 992–8.
166. Petronelli A., Pannitteri G., Testa U. Triterpenoids as new promising anticancer drugs // *Anticancer. Drugs.* 2009. Т. 20. № 10. С. 880–892.
167. Pettersen E.F. и др. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis // *J Comput Chem.* 2004. Т. 25. № 13. С. 1605–1612.
168. Pisha E. и др. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis // *Nat Med.* 1995. Т. 1. С. 1046–1051.
169. Prasad S., Kalra N., Shukla Y. Induction of apoptosis by lupeol and mango extract in mouse prostate and LNCaP cells. // *Nutr. Cancer.* 2008. Т. 60. № 1. С. 120–30.
170. Proikas-Cezanne T. и др. Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. - PubMed - NCBI // *FEBS Lett.* 2007. Т. 581. № 18. С. 3396–3404.
171. Pyo J.S. и др. Anti-cancer effect of Betulin on a human lung cancer cell line: a pharmacoproteomic approach using 2 D SDS PAGE coupled with nano-HPLC tandem Mass Spectrometry. // *Planta Med.* 2009. Т. 75. № 2. С. 127–31.
172. Qu X. и др. Autophagy Gene-Dependent Clearance of Apoptotic Cells during Embryonic



Development // Cell. 2007. T. 128. № 5. C. 931–946.

173. Quillardet P., Hofnung M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. // Mutat. Res. 1985. T. 147. № 3. C. 65–78.

174. Rabi T., Bishayee A. Terpenoids and breast cancer chemoprevention // Breast Cancer Res. Treat. 2009. T. 115. № 2. C. 223–239.

175. Rabi T., Shukla S., Gupta S. Betulinic acid suppresses constitutive and TNFalpha-induced NF-kappaB activation and induces apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. // Mol. Carcinog. 2008. T. 47. № 12. C. 964–73.

176. Raphael T.J., Kuttan G. Effect of naturally occurring triterpenoids ursolic acid and glycyrrhizic acid on the cell-mediated immune responses of metastatic tumor-bearing animals. // Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2008. T. 30. № 2. C. 243–55.

177. Rappe A.K. и др. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations // J. Am. Chem. Soc. 1992. T. 114. C. 10024–10035.

178. Ravikumar B. и др. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis // Hum. Mol. Genet. 2006. T. 15. № 7. C. 1209–1216.

179. Ravikumar B. и др. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. // Nat. Cell Biol. 2010a. T. 12. № 8. C. 747–57.

180. Ravikumar B. и др. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. // Physiol. Rev. 2010b. T. 90. № 4. C. 1383–435.

181. Rubio-Moscardo F. и др. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. // Blood. 2005. T. 106. № 9. C. 3214–22.

182. Rumjanek V.M. и др. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. // An. da Acad. Bras. Ciências. 2001. T. 73. № 1. C. 57–69.

183. Rusten T.E. и др. ESCRTs and Fab1 Regulate Distinct Steps of Autophagy. , 2007. 1817-1825 с.

184. Rzeski W. и др. Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells // 2006. № 374. C. 11–20.

185. Saelens X. и др. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. // Oncogene. 2004. T. 23. № 16. C. 2861–74.

186. Sakahira H., Enari M., Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. // Nature. 1998. T. 391. № 6662. C. 96–9.

187. Saleem M. и др. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. // Oncogene. 2004. T. 23. № 30. C. 5203–14.

188. Saleem M. и др. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of

- human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. // *Carcinogenesis*. 2005a. Т. 26. № 11. С. 1956–64.
189. Saleem M. и др. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. // *Carcinogenesis*. 2005b. Т. 26. № 11. С. 1956–64.
190. Saleem M. и др. A novel dietary triterpene Lupeol induces fas-mediated apoptotic death of androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumor growth in a xenograft model. // *Cancer Res*. 2005c. Т. 65. № 23. С. 11203–13.
191. Saleem M. и др. Lupeol inhibits growth of highly aggressive human metastatic melanoma cells in vitro and in vivo by inducing apoptosis. // *Clin. Cancer Res*. 2008. Т. 14. № 7. С. 2119–27.
192. Sameiro M., Gonçalves T. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes // *Chem. Rev*. 2009. Т. 109. № 1. С. 190–212.
193. Sarkar S. и др. Trehalose, a Novel mTOR-independent Autophagy Enhancer, Accelerates the Clearance of Mutant Huntingtin and  $\alpha$ -Synuclein // *J. Biol. Chem*. 2007. Т. 282. № 8. С. 5641–5652.
194. Sawada N. и др. Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. // *Br. J. Cancer*. 2004. Т. 90. № 8. С. 1672–8.
195. Scaffidi C. и др. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. // *J. Biol. Chem*. 1999. Т. 274. № 3. С. 1541–8.
196. Schimmer A.D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. // *Cancer Res*. 2004. Т. 64. № 20. С. 7183–90.
197. Schinella G. и др. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya* // *Planta Med*. 2008. Т. 74. № 3. С. 215–220.
198. Schmalbruch H. The early changes in experimental myopathy induced by chloroquine and chlorphentermine. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 1980. Т. 39. № 1. С. 65–81.
199. Schuler M., Green D.R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. // *Biochem. Soc. Trans*. 2001. Т. 29. № Pt 6. С. 684–8.
200. Schweichel J.U., Merker H.J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. // *Teratology*. 1973. Т. 7. № 3. С. 253–66.
201. Scott R.C., Juhász G., Neufeld T.P. Direct Induction of Autophagy by Atg1 Inhibits Cell Growth and Induces Apoptotic Cell Death // *Curr. Biol*. 2007. Т. 17. № 1. С. 1–11.
202. Seglen P.O., Gordon P.B. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1982. Т. 79. № 6. С. 1889–92.

203. Selzer E. и др. Effects of betulinic acid alone and in combination with irradiation in human melanoma cells // *J Invest Dermatol.* 2000. Т. 114. С. 935–940.
204. Selzer E. и др. Betulinic acid-induced Mcl-1 expression in human melanoma— mode of action and functional significance // *Mol Med.* 2002. Т. 8. С. 877–884.
205. Setzer W.N., Setzer M.C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. // *Mini Rev. Med. Chem.* 2003. Т. 3. № 6. С. 540–556.
206. Shah B.A., Qazi G.N., Taneja S.C. Boswellic acids: a group of medicinally important compounds. // *Nat. Prod. Rep.* 2009. Т. 26. С. 72–89.
207. Shanmugam M.K. и др. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies // *Biochem. Pharmacol.* 2013. Т. 85. № 11. С. 1579–1587.
208. Shen S. и др. Ursolic acid induces autophagy in U87MG cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress // *Chem. Biol. Interact.* 2014. № May.
209. Shimizu S. и др. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes // *Nat. Cell Biol.* 2004. Т. 6. № 12. С. 1221–1228.
210. Shin H.-W. и др. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. // *J. Cell Biol.* 2005. Т. 170. № 4. С. 607–18.
211. Shin S.W., Kim S.Y., Park J.-W. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. Т. 1823. № 2. С. 451–7.
212. Shin Y.G. и др. Determination of betulinic acid in mouse blood, tumor and tissue homogenates by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. // *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1999. Т. 732. № 2. С. 331–6.
213. Singh G.B. и др. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. // *J. Pharm. Pharmacol.* 1992. Т. 44. № 5. С. 456–8.
214. Skopinski P. и др. Suppression of angiogenic activity of sera from diabetic patients with non-proliferative retinopathy by compounds of herbal origin and sulindac sulfone. // *Int. J. Mol. Med.* 2004. Т. 14. № 4. С. 707–11.
215. Slee E.A., Adrain C., Martin S.J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. // *J. Biol. Chem.* 2001. Т. 276. № 10. С. 7320–6.
216. Sohn K.-H. и др. Anti-angiogenic activity of triterpene acids // *Cancer Lett.* 1995. Т. 94. № 2. С. 213–218.
217. Sou Y. -s. и др. The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice // *Mol. Biol. Cell.* 2008. Т. 19. № 11. С. 4762–4775.
218. Sperandio S. и др. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. // *Cell Death Differ.* 2004. Т. 11. № 10. С. 1066–75.

219. Sperandio S. и др. Identification of new modulators and protein alterations in non-apoptotic programmed cell death // *J. Cell. Biochem.* 2010. Т. 111. № 6. С. 1401–1412.
220. Sperandio S., Belle I. de, Bredesen D.E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Т. 97. № 26. С. 14376–81.
221. Srivastava R.K. и др. Linkage of curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis by cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1). // *Cell Cycle.* 2007. Т. 6. № 23. С. 2953–61.
222. Su M. и др. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer // *J. Oncol.* 2013. Т. 2013. С. 1–14.
223. Suliman A. и др. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. // *Oncogene.* 2001. Т. 20. № 17. С. 2122–33.
224. Sultana N. Clinically useful anticancer, antitumor, and antiwrinkle agent, ursolic acid and related derivatives as medicinally important natural product. // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2011. Т. 26. № July 2010. С. 616–642.
225. Sultana N., Ata A. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2008. Т. 23. № 6. С. 739–756.
226. Sun Q. и др. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Т. 105. № 49. С. 19211–6.
227. Takacs-Vellai K. и др. Inactivation of the Autophagy Gene bec-1 Triggers Apoptotic Cell Death in *C. elegans*. , 2005. 1513-1517 с.
228. Takahashi Y. и др. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. // *Nat. Cell Biol.* 2007. Т. 9. № 10. С. 1142–51.
229. Tan Y., Yu R., Pezzuto J.M. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006. Т. 374. С. 11–20.
230. Tanida I. и др. HsAtg4B/HsApg4B/Autophagin-1 Cleaves the Carboxyl Termini of Three Human Atg8 Homologues and Delipidates Microtubule-associated Protein Light Chain 3- and GABAA Receptor-associated Protein-Phospholipid Conjugates // *J. Biol. Chem.* 2004. Т. 279. № 35. С. 36268–36276.
231. Tanida I., Ueno T., Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy // *Int. J. Biochem.* 2004.
232. Trott A. и др. Activation of heat shock and antioxidant responses by the natural product celastrol: transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule. // *Mol. Biol. Cell.* 2008. Т. 19. № 3. С. 1104–12.
233. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of docking with a

- New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading // *J Comput Chem*. 2010. T. 31. С. 455–461.
234. Turmaine M. и др. Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. T. 97. № 14. С. 8093–7.
235. UCHIYAMA Y. Autophagic Cell Death and Its Execution by Lysosomal Cathepsins. // *Arch. Histol. Cytol.* 2001. T. 64. № 3. С. 233–246.
236. Udeani G.O. и др. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. // *Biopharm. Drug Dispos.* 1999. T. 20. № 8. С. 379–83.
237. Ustundag Y., Bronk S.F., Gores G.J. Proteasome inhibition-induces endoplasmic reticulum dysfunction and cell death of human cholangiocarcinoma cells. // *World J. Gastroenterol.* 2007. T. 13. № 6. С. 851–7.
238. Valamanesh F. и др. Glucocorticoids induce retinal toxicity through mechanisms mainly associated with paraptosis. // *Mol. Vis.* 2007. T. 13. С. 1746–57.
239. Vannuvel K. и др. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. // *J. Cell. Physiol.* 2013. T. 228. № 9. С. 1802–18.
240. Vasconcelos F.C. и др. Pomolic acid-induced apoptosis in cells from patients with chronic myeloid leukemia exhibiting different drug resistance profile // *Invest. New Drugs.* 2007. T. 25. № 6. С. 525–533.
241. Vassilev L.T. и др. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. // *Science (80-. )*. 2004. T. 303. № 5659. С. 844–848.
242. Vicencio J.M. и др. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. // *Cell Death Differ.* 2009. T. 16. № 7. С. 1006–17.
243. Wachsberger P.R. и др. Betulinic acid sensitization of low pH adapted human melanoma cells to hyperthermia // *Int J Hyperth.* 2002. T. 18. С. 153–164.
244. Wakabayashi T. Megamitochondria formation - physiology and pathology. // *J. Cell. Mol. Med.* 2002. T. 6. № 4. С. 497–538.
245. Wang W.-B. и др. Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90. // *J. Cell. Physiol.* 2012. T. 227. № 5. С. 2196–206.
246. Wang Y. и др. A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. // *Mol. Endocrinol.* 2000. T. 14. № 10. С. 1550–6.
247. Wang Y. и др. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. // *J. Cell Sci.* 2004. T. 117. № Pt 8. С. 1525–32.
248. Wang Y. и др. Retinal ganglion cell death is triggered by paraptosis via reactive oxygen

- species production: a brief literature review presenting a novel hypothesis in glaucoma pathology. // *Mol. Med. Rep.* 2014. T. 10. № 3. С. 1179–83.
249. Webb J.L., Ravikumar B., Rubinsztein D.C. Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004. T. 36. № 12. С. 2541–2550.
250. Wei T. и др. Activation of autophagy and paraptosis in retinal ganglion cells after retinal ischemia and reperfusion injury in rats. // *Exp. Ther. Med.* 2015. T. 9. № 2. С. 476–482.
251. Wei Y. и др. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. // *Mol. Cell.* 2008. T. 30. № 6. С. 678–88.
252. Wick W. и др. Betulinic acid- induced apoptosis in glioma cells: a sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing // *J Pharmacol Exp Ther.* 1999. T. 289. С. 1306–1312.
253. Williams A. и др. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway // *Nat. Chem. Biol.* 2008. T. 4. № 5. С. 295–305.
254. Wu S., Dovichi N.J. High-sensitivity fluorescence detector fluorescein isothiocyanate derivatives of amino acids separated by capillary zone electrophoresis. // *J. Chromatogr.* 1989. T. 480. С. 141–155.
255. Xavier C.P.R. и др. Ursolic acid induces cell death and modulates autophagy through JNK pathway in apoptosis-resistant colorectal cancer cells. // *J. Nutr. Biochem.* 2013. T. 24. № 4. С. 706–12.
256. Xu R., Fazio G.C., Matsuda S.P.T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity // *Phytochemistry.* 2004. T. 65. № 3. С. 261–291.
257. Xue L., Fletcher G.C., Tolkovsky A.M. Autophagy Is Activated by Apoptotic Signalling in Sympathetic Neurons: An Alternative Mechanism of Death Execution // *Mol. Cell. Neurosci.* 1999. T. 14. № 3. С. 180–198.
258. Yamamoto A. и др. Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E Cells. // *Cell Struct. Funct.* 1998. T. 23. № 1. С. 33–42.
259. Yang E. и др. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces bax and promotes cell death // *Cell.* 1995. T. 80. № 2. С. 285–291.
260. Yang H. и др. Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. // *Cancer Res.* 2006. T. 66. № 9. С. 4758–65.
261. Yang Q. и др. BMK1 is involved in the regulation of p53 through disrupting the PML-MDM2 interaction. // *Oncogene.* 2013. T. 32. № 26. С. 3156–64.

262. Ylä-Anttila P. и др. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. // *Autophagy*. 2009. Т. 5. № 8. С. 1180–5.
263. Yoo K.H. и др. Pomolic acid induces apoptosis in SK-OV-3 human ovarian adenocarcinoma cells through the mitochondrial-mediated intrinsic and death receptor-induced extrinsic pathways // *Oncol. Lett.* 2012. Т. 5. № 1. С. 386–390.
264. Yoon M.J. и др. Simultaneous mitochondrial Ca(2+) overload and proteasomal inhibition are responsible for the induction of paraptosis in malignant breast cancer cells. // *Cancer Lett.* 2012. Т. 324. № 2. С. 197–209.
265. Yoon M.J. и др. Release of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells. // *Oncotarget*. 2014. Т. 5. № 16. С. 6816–31.
266. Youn S.H. и др. Anticancer properties of pomolic acid-induced AMP-activated protein kinase activation in MCF7 human breast cancer cells // *Biol. Pharm. Bull.* 2012. Т. 35. № 1. С. 105–110.
267. Young A.R.J. и др. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. // *J. Cell Sci.* 2006. Т. 119. № Pt 18. С. 3888–900.
268. Yu F. и др. Functional characterization of amyriin synthase involved in ursolic acid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaf epidermis // *Phytochemistry*. 2013. Т. 91. № August. С. 122–127.
269. Yu L. и др. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. // *Science*. 2004. Т. 304. № 5676. С. 1500–2.
270. Zaidi A.U. и др. Chloroquine-induced neuronal cell death is p53 and Bcl-2 family-dependent but caspase-independent. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2001. Т. 60. № 10. С. 937–45.
271. Zakharova O.A. и др. Cytotoxicity of new n-butylamino and sulfur-containing derivatives of polyfluorinated 1,4-naphthoquinone. // *Eur. J. Med. Chem.* 2010. Т. 45. № 1. С. 270–4.
272. Zakharova O.D. и др. Cytotoxicity of new polyfluorinated 1,4-naphthoquinones with diverse substituents in the quinone moiety. // *Bioorg. Med. Chem.* 2011. Т. 19. № 1. С. 256–60.
273. Zhang P. и др. Oleanolic acid induces apoptosis in human leukemia cells through caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage. // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2007. Т. 39. № 10. С. 803–9.
274. Zhang X. и др. p21 induction plays a dual role in anti-cancer activity of ursolic acid. // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2016. Т. 241. № 5. С. 501–8.
275. Zhao C. и др. Autophagy-dependent EIF2AK3 activation compromises ursolic acid-induced apoptosis through upregulation of MCL1 in MCF-7 human breast cancer cells. // *Autophagy*. 2013. Т. 9. № 2. С. 196–207.

276. Zheng X. и др. Characterisation of Two Oxidosqualene Cyclases Responsible for Triterpenoid Biosynthesis in *Ilex asprella* // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Т. 16. № 2. С. 3564–3578.
277. Zhong Y. и др. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1–phosphatidylinositol-3-kinase complex // *Nat. Cell Biol.* 2009. Т. 11. № 4. С. 468–476.
278. Zuco V. и др. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells // *Cancer Lett.* 2002. Т. 175. С. 17–25.
279. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. СПб: Товарищество научных изданий КМК, 2009. 520 с.
280. Королёва А.С., Красноборов, И. М. Пеньковская Е.Ф. Определитель растений Новосибирской области. Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1973. 368 с.
281. Красноборов И.М., Ломоносова М.Н., Шауло Д.Н. Определитель растений Новосибирской области. Новосибирск: Наука. Сибирское предприятие РАН, 2000. 492 с.
282. Кукина Т.П., Попов С.А. Содержание и распределение урсоловой и олеаноловой кислот в плодах, жомках и шротах клюквы болотной // *Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья.* Барнаул: , 2007. С. 310–313.
283. Полежаева И.В. Изучение экстракции сжиженной углекислотой надземной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub // «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». Барнаул: Материалы IV Всероссийской конференции, 2007. С. 66–70.
284. Полежаева И.В., Полежаева Н.И., Левданский В.А. Сравнительное исследование химического состава кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) Holub // *Вестник КрасГУ, серия «Естественные науки».* 2005. Т. 2. С. 130–133.
285. Полежаева И.В., Полежаева Н.И., Н М.Л. Исследование минерального комплекса вегетативной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub // *Химия растительного сырья.* 2005. Т. 4. С. 67–70.
286. Сапегин Л.М., Дайнеко Н.М., Тимофеев С.Ф. Радиоактивное загрязнение растений в Чечерском районе Гомельской области // *Растительные ресурсы.* 2008. Т. 4. С. 85–91.
287. Шмонов А.М. Возможности использования рекультивированных земель Кузбасса для создания заготовительной базы облепихового сырья. Новосибирск: Наука, 1991. 191–189 с.
288. Якубов В.В. и др. Дары лесов Камчатки: обзор литературы по теме «Сохранение и рациональное использование недревесных ресурсов лесов Камчатки». Москва: МСОП, 2003. 72 с.