М.Е. Неганова, А.В. Семаков, Е.Ф. Шевцова, С.Г. Клочков

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНАЛОГОВ ПРИРОДНЫХ АЛАНТОЛАКТОНОВ С ТРАНСФОРМИРОВАННЫМ УГЛЕРОДНЫМ СКЕЛЕТОМ С ЦЕЛЬЮ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ

ФГБУН ИФАВ РАН, Черноголовка, Московская область, Россия

Введение. По данным ВОЗ, с каждым годом увеличивается смертность от онкологических заболеваний. Сложность подбора способов адекватного лечения в данном случае определяется большим разнообразием патогенеза и этиологии опухолей, их развитием и симптоматикой. Поэтому в настоящее время поиск новых эффективных лекарственных препаратов для фармакологической коррекции онкологических заболеваний остается особо актуальной проблемой. Окислительный стресс и активация перекисного окисления играют важную роль в механизме элиминации опухолевых клеток, инициируя их гибель по механизму апоптоза. Для сесквитерпеновых лактонов характерен широкий спектр биологической активности, в том числе способность модулировать окислительно-восстановительные процессы в клетке.

Цель исследования. Синтез и изучение биологической активности аналогов природных алантолактонов с трансформированным углеродным скелетом, включая исследование влияния тестируемых соединений на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс, с целью поиска потенциальных противоопухолевых агентов с проапоптотическим механизмом действия.

Материалы и методы. В качестве исходных сесквитерпеновых лактонов для синтеза их аналогов использовали аланто- и изоалантолактоны, выделенные из растения девясил высокий (*Inula helenium L.*). Применяли методы кислотной изомеризации, перелактонизации, введения новых функциональных групп. Для приготовления гомогената мозга крыс в биологических экспериментах использовали самцов нелинейных беспородных крыс с массой тела 200–220 г. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с решениями комиссии по биоэтике ИФАВ РАН. Работа выполнялась на оборудовании Центра коллективного пользования ИФАВ РАН. Для оценки действия исследуемых веществ на ПОЛ гомогената мозга крыс, спонтанное и инициируемое ионами Fe (II), был применен модифицированный вариант ТБК-теста в плашечном формате. Измерения оптической плотности проводили на плашечном ридере Victor 3 (Perkin Elmer, Германия) при 540 нм.

Результаты. В ходе данной работы был синтезирован ряд аналогов природных алантолактонов с трансформированным углеродным скелетом (>30 соединений), включая соединения с диеноновой системой, перегруппированные эремофиланолиды и другие. При изучении влияния тестируемых соединений на ПОЛ гомогената мозга крыс, инициируемое ионами Fe (II), было показано, что лактоны SL-1, SL-7, SL-33 и SL-56a проявляют прооксидантный эффект, стимулируя ПОЛ более чем на 20 % относительно контроля. Схожая картина наблюдалась и при спонтанном ПОЛ. Активация окислительных процессов может рассматриваться как один из механизмов цитотоксического действия эффективных онколитиков.

Заключение. Таким образом, исследованные сесквитерпеновые лактоны, проявляющие прооксидантную, проапоптотическую активность, могут быть использованы в качестве основы для создания потенциальных противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-73-10461.

М.В. Нехорошев, Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова

СПИРУЛИНА – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

ФГБУН ИМБИ, Севастополь, Крым, Россия

Введение. Спирулина – один из самых распространенных объектов современной альготехнологии. Ежегодно в различных странах мира получают урожай спирулины, исчисляемый тоннами. Особый интерес биомасса спирулины представляет как источник ряда биологически активных соединений. Так, показано, что при ежедневном употреблении 1 г сухой спирулины в течение 12 мес у больных раком гортани наблюдалась 45 % регрессия опухоли. Высокий терапевтический эффект, вероятно, связан с наличием таких соединений, как фикобилипротеины и каротиноиды.

Цель исследования. Разработка технологии получения порошка с высоким содержанием фикобилипротеинов, а также комплекса каротиноидов, состоящего из миксоксантофилла и осцилоксантина.

Материалы и методы. Цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* культивировали в интенсивном квазинепрерывном режиме на питательной среде Заррука. Спирулину выращивали в фотобиореакторе типа «бассейн», глубина суспензии 10–12 см, рабочий объем суспензии 550 л. Источник освещения – лампы ДРЛ700, которые на поверхности суспензии давали 7 клк (28 Вт/м^2). Для извлечения фикобилипротеинов использовали метод горячей экстракции. Для получения комплекса каротиноидов липидный экстракт разбавляли водой и выдерживали 3 сут при $t = 5$ °C. После образования комплекса каротиноидов на границе фаз полученный комплекс фильтровали и промывали хлороформом. Каротиноиды идентифицировали методами HPLC, NMR и масс-спектрометрии.

Результаты. По результатам наших экспериментов была получена биомасса спирулины с 15 % содержанием фикобилипротеинов. При извлечении фикобилипротеинов был получен порошок синего цвета, содержащий 18 % С-фикоцианина. Выделенный нами каротиноидный комплекс состоял только из миксоксантофилла, осцилоксантина и белка. В комплексе миксоксантофилл и осцилоксантин находятся в соотношении 7 : 3. По данным японских исследователей, из 55 видов природных каротиноидов миксоксантофилл и осцилоксантин входят в лидирующую группу каротиноидов с высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам Raji.

Заключение. Разработанные нами методы позволяют в промышленных масштабах на базе существующих предприятий по производству спирулины получать продукты с высоким содержанием соединений, обладающих

противоопухолевым действием: фикоцианин и комплекс миксоксантофилла и осцилоксантина.

Л.Н. Николаевич[1], И.В. Руденкова[1], В.А. Гайдукевич[2], В.А. Книжников[2]

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЦИКЛОДИПЕПТИДА PRO–PHE НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ КЛОНОГЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

[1]Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь; [2]ИФОХ НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Введение. Клоногенные клетки опухоли обладают неограниченной пролиферативной способностью и высокой степенью выживаемости, за счет чего возможно повторное развитие опухоли. Поэтому исследование ответа клоногенных клеток на противоопухолевые препараты является перспективным направлением в поиске новых способов лечения онкологических заболеваний.

Цель исследования. Изучение цитотоксического действия циклодипептида Pro–Phe на клоногенные опухолевые клетки *in vitro*.

Материалы и методы. Исследования выполнены на клеточных линиях С6 (глиома крысы), HeLa (карцинома шейки матки человека), К562 (хроническая миелоидная лейкемия) и диплоидных клетках FL (амнион человека). Изучены цитотоксические эффекты цикло Pro–Phe в дозах 5, 50, 500, 1000, 5000 мкг методом МТТ-теста. Ингибирующую активность субстанции циклодипептида Pro–Phe проверяли на экспериментальной модели опухолевых и диплоидных клеток перевиваемых линий С6 и FL в дозах 50, 500, 5000 мкг/мл, а также на клоногенных опухолевых клетках С6к/к и FLк/к в аналогичных дозах. Цикло-Pro–Phe вводили в монослойную культуру клеток на 24 ч. После инкубации подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Ингибирующую активность рассчитывали по формуле: ИА = (К – О) / К × 100 %.

Результаты. Результаты исследований показали, что циклодипептид Pro–Phe характеризуется низкой степенью цитотоксичности. Индекс токсичности составляет 20–25 % при дозе 1000 мкг/мл. Обнаружено, что циклодипептид Pro–Phe не оказывает цитотоксического действия на диплоидные клетки амниона человека линии FL. На модели клоногенных клеток линии С6к/к показано, что цитотоксический эффект циклодипептида Pro–Phe наиболее выражен в дозе 1000 мкг/мл. Наибольшую чувствительность проявили клоногенные клетки С6к/к. Выживаемость клоногенных и неклоногенных клеток линии С6 составила 40 и 50 % соответственно.

Заключение. Результаты исследований показали, что по мере увеличения дозы цикло-Pro–Phe наблюдается подавление пролиферации опухолевых клоногенных клеток и увеличение частоты их гибели по механизму апоптоза. Модель клоногенных клеток может использоваться в качестве тест-системы *in vitro* для оценки цитотоксических, ингибирующих, антипролиферативных и апоптотических эффектов циклодипептидов на опухолевые клоногенные клетки.

С.И. Никулицкий, Е.Г. Тырсина

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ VEGF-R1 В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Преимуществом таргетной противоопухолевой терапии является избирательность токсического действия на злокачественные клетки с минимальным повреждением нормальных клеток, что предопределяет поиск новых различий между ними. Одним из кандидатов на эту роль может служить рецептор фактора роста эндотелия сосудов I типа (VEGF-R1), который присутствует в большинстве опухолевых клеток, но не представлен в нормальных. Причем, как выяснилось, активация VEGF-R1 усиливает такие проявления злокачественности, как инвазия, миграция, метастазирование и выживаемость опухолевых клеток.

Цель исследования. В свете вышеизложенного мы решили проверить следующие положения: действительно ли экспрессия VEGF-R1 характерна исключительно для опухолевых клеток; присутствует ли рецептор в клеточном ядре, что свидетельствовало бы о его функциональной активности; и, наконец, имеется ли связь между количеством VEGF-R1 и степенью агрессивности неопластических клеток. Для ответа на эти вопросы мы оценили содержание рецептора в нормальных и опухолевых клетках человека, а также при помощи разработанного нами подхода к иммунофлуоресцентной детекции белков в нативных клеточных ядрах на проточном цитометре определили уровень VEGF-R1 в ядрах клеток, различающихся по степени злокачественности.

Материалы и методы. Исследования проводили на 2 линиях опухолевых клеток – А431 (карцинома вульвы) и BRO (высокозлокачественная меланома). Контролем служила линия нормальных постнатальных фибробластов человека (ПФЧ). Локализацию и оценку содержания рецептора определяли при помощи иммуноцитохимического окрашивания (ИЦХ) и проточной цитофлуориметрии (FC). В ходе FC уровень VEGF-R1 в клетках и ядрах оценивали по величине ΔMFI – разности средней интенсивности флуоресценции между опытными и контрольными образцами.

Результаты. По данным иммуноцитохимического исследования VEGF-R1 визуализировался внутриклеточно и в опухолевых, и в нормальных клетках, однако интенсивность окраски в обеих злокачественных линиях была выше. Для выявления рецептора в ядре препараты перед фиксацией обрабатывали 0,05 % раствором тритона Х-100, что значительно уменьшало долю цитозольного VEGF-R1. В результате было выявлено наличие рецептора в ядрах исключительно опухолевых клеток. Результаты ИЦХ были подтверждены и дополнены количественными данными FC. Эксперименты с интактными клетками показали практически полное отсутствие VEGF-R1 на цитоплазматической мембране как в опухолевых клетках А431 (ΔMFI = 21,4) и BRO (ΔMFI = 14,4), так и в нормальных ПФЧ (ΔMFI = 15,8). В пермеабилизованных клетках рецептор регистрировали во всех 3 линиях, но в нормальных внутриклеточное