

На правах рукописи

МАРКОВ АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**СПЕКТР БИОЛОГИЧЕСКИХ АКТИВНОСТЕЙ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТЫ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ
ДЕЙСТВИЯ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

к.б.н. **Логашенко Евгения Борисовна**

Официальные оппоненты:

Сорокина Ирина Васильевна, д.б.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, в.н.с.

Козлов Максим Викторович, к.х.н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, с.н.с.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича»

Защита состоится « » ноября 2015 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090 Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « »

2015 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. На сегодняшний день фармацевтическая промышленность испытывает недостаток в эффективных и безопасных лекарственных препаратах нового поколения, в первую очередь для лечения заболеваний, приводящих к инвалидизации, потере качества жизни или к летальному исходу.

Одним из актуальных способов поиска и разработки новых эффективных лекарственных препаратов является синтетическая трансформация молекул природных биологически активных соединений. Данные соединения характеризуются огромным разнообразием молекулярных структур, низкой токсичностью, способностью воздействовать на несколько специфических мишеней внутри клеток, что определяет широкий спектр их нативной биологической активности.

Одним из примеров природных метаболитов, использующихся в качестве платформы для создания новых лекарственных средств, является глицирретовая кислота (ГЛК) – тритерпеновое соединение, содержащееся в больших количествах в корне солодки (*Glycyrrhiza glabra L.*, *G. uralensis DC.* и др.). Широкий ареал распространения солодки на территории Российской Федерации и стран СНГ, легкий способ выделения ГЛК из растительного сырья, ее широкий спектр фармакологических активностей делают данное соединение перспективным в качестве стартовой молекулы для химической трансформации, что определяет актуальность данной работы.

В Новосибирском институте органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН (НИОХ СО РАН) путем химической трансформации молекулы ГЛК был синтезирован ряд ее новых производных.

Целью настоящей работы являлось исследование спектра биологических активностей новых синтетических аналогов ГЛК и изучение механизма их действия. В ходе исследования решались следующие задачи:

- 1) Исследование влияния синтетических аналогов ГЛК на жизнеспособность опухолевых клеток человека. Выявление лидерного соединения (ЛС), обладающего наибольшей цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток человека;
- 2) Изучение механизма гибели опухолевых клеток, вызванной действием ЛС. Исследование влияния ЛС на изменение паттерна экспрессии генов в опухолевых клетках человека;
- 3) Исследование противоопухолевой активности ЛС на моделях опухолевой прогрессии *in vivo*;
- 4) Исследование противовоспалительной активности ЛС *in vitro*, оценка антиэкссудативной активности ЛС на модели острого воспаления *in vivo* и исследование возможного механизма противовоспалительного действия ЛС;
- 5) исследование противовирусной активности ЛС на модели вируса гриппа А *in vitro* и *in vivo* и определение механизма его противогриппозного действия.

Научная новизна и практическая значимость работы. В результате проведенной работы выявлено новое производное ГЛК – метил 2-циано-3,12-

диоксо-18βН-олеан-1(2),11(9)-диен-30-оат (солоксолон метил), обладающий широким спектром выраженных биологических активностей, и определены механизмы его действия. Показано, что солоксолон метил обладает высокой цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток, вызывая в них запуск митохондриального каспаз-зависимого пути апоптоза. Впервые проведен полнотранскриптомный анализ изменения уровня экспрессии генов в опухолевых клетках человека под действием солоксолон метила и выявлены доминирующие биологические процессы, запускаемые в результате данного действия, и потенциальные внутриклеточные мишени солоксолон метила. Выявлены функциональные группы, введение которых в молекулу ГЛК приводит к усилению цитотоксичности в отношении опухолевых клеток. Для синтетических аналогов ГЛК, содержащих 2-циано-1-ен-3-оновую структуру в кольце А, впервые показано, что замена нативной для ГЛК 11-оксо-12-еновой группировки в кольце С на 12-оксо-11-еновую структуру приводит к значительному увеличению антипролиферативного действия. В ходе работы изучен спектр биологических активностей солоксолон метила; в экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказаны его противоопухолевая, противовоспалительная и противовирусная активности. Впервые, для синтетических аналогов тритерпеноидов, содержащих 2-циано-1-ен-3-оновую структуру в кольце А, показана противогриппозная активность *in vitro* и *in vivo* и выяснен механизм противовирусного действия.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) Новые производные ГЛК обладают токсичностью в отношении опухолевых клеток *in vitro*. Наибольшую активность проявляют производные ГЛК, несущие 2-циано-1-ен-3-оновую структуру, среди которых выявлено лидерное соединение солоксолон метил (СМ), обладающее наибольшим уровнем цитотоксичности.
- 2) СМ вызывает стресс ЭПР и запуск апоптоза в опухолевых клетках.
- 3) СМ эффективно подавляет рост карциномы Кребс-2 на мышинной модели *in vivo*.
- 4) СМ обладает выраженной противовоспалительной и антиэкссудативной активностью на клеточных и мышинных моделях, соответственно.
- 5) СМ обладает противовирусной активностью *in vitro* в отношении вируса гриппа А, подавляя его проникновение внутрь клеток и ранние стадии жизненного цикла.
- 6) СМ эффективно подавляет развитие гриппозной пневмонии на мышинной модели *in vivo*.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 3 публикации в рецензируемых научных журналах. Результаты работы представлены и обсуждены на конференциях: «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2010), «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2010), 36-ом конгрессе FEBS «Biochemistry for tomorrow's medicine» (Турин, Италия, 2010), 31-ой европейской школе по медицинской химии «XXXI Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E. Duranti” National Seminar for PhD Students» (Урбино, Италия, 2010), международной конференции «Cell Signal-omics 2011: Integrated cellular pathology

Systems biology of human disease» (Люксембург, 2011), 2-ой международной конференции «Physico-chemical biology dedicated to the 85th anniversary of academician D.G. Knorre» (Новосибирск, 2011), международной конференции «Mechanisms of Cell Death: The Command to Die» (Фуэнхиrolа, Испания, 2013), международной конференции FEBS EMBO 2014 (Париж, Франция, 2014), 23-ем международном симпозиуме EFMC-ISMC 2014 (Лиссабон, Португалия, 2014), 7-ой международной школе молодых ученых «Systems biology and bioinformatics» (Новосибирск, 2015), международной конференции «MedChem 2015» (Новосибирск, 2015).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 177 страницах, содержит 36 рисунков, 11 таблиц. Библиография включает 424 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Первичный скрининг новых производных ГЛК

Химические производные ГЛК были синтезированы в Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН. Всего на испытания было передано 40 производных ГЛК (Рис. 1). На первом этапе исследований был проведен скрининг цитотоксичности синтезированных соединений в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека KB-3-1 *in vitro*. Ввиду того, что из 40 полученных производных 9 не растворимы в ДМСО, в скрининг включили 31 соединение. Значение IC_{50} соединений – концентрацию вещества, при которой наблюдается гибель 50% клеток – определяли с помощью МТТ-теста (Табл. 1). В результате скрининга выявлено 9 высокотоксичных производных ГЛК (**1a**, **1e**, **4b**, **5d**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6g**) ($IC_{50} = 0,1-10$ мкМ), 11 производных с умеренной токсичностью (**1c**, **1d**, **2d**, **3b**, **3d**, **3e**, **4c**, **4f**, **6a**, **7a**, **7c**) ($IC_{50} = 10-50$ мкМ) и 11 малотоксичных соединений (**1b**, **3c**, **4d**, **5c**, **5f**, **7b**, **7d**, **7f**, **7g**, **8**, **9**) ($IC_{50} > 50$ мкМ).

Анализ взаимосвязи «структура-активность» синтезированных производных ГЛК позволил выявить следующие закономерности:

- этерификация карбоксильной группы в положении С30 ГЛК (производное (**1a**)), приводит к значительному усилению цитотоксичности;
- удаление кето-группы из кольца С приводит к снижению растворимости производных в ДМСО, как это было отмечено для (**1f**, **3f**, **1-5g**);
- замена С3 окси-группы на кето-группу в кольце А (соединения (**3c-e**)) может привести к снижению цитотоксичности производных;
- удаление кратной связи из кольца С может усилить антипролиферативную активность, как это отмечено для производных (**1e**, **3e**);
- наибольшую цитотоксичность производных обеспечивает наличие в кольце А 2-циано-1-ен-3-оной структуры в комплексе с дополнительной двойной связью в кольце Е (**6b**), 12-оксо-11-еновой (**6c**) и 19-оксо-18-еновой (**6d**) структурами, кето-группой в положении С12 (**6e**) или 11(12),18(26)-диеновым (**6g**) фрагментом.

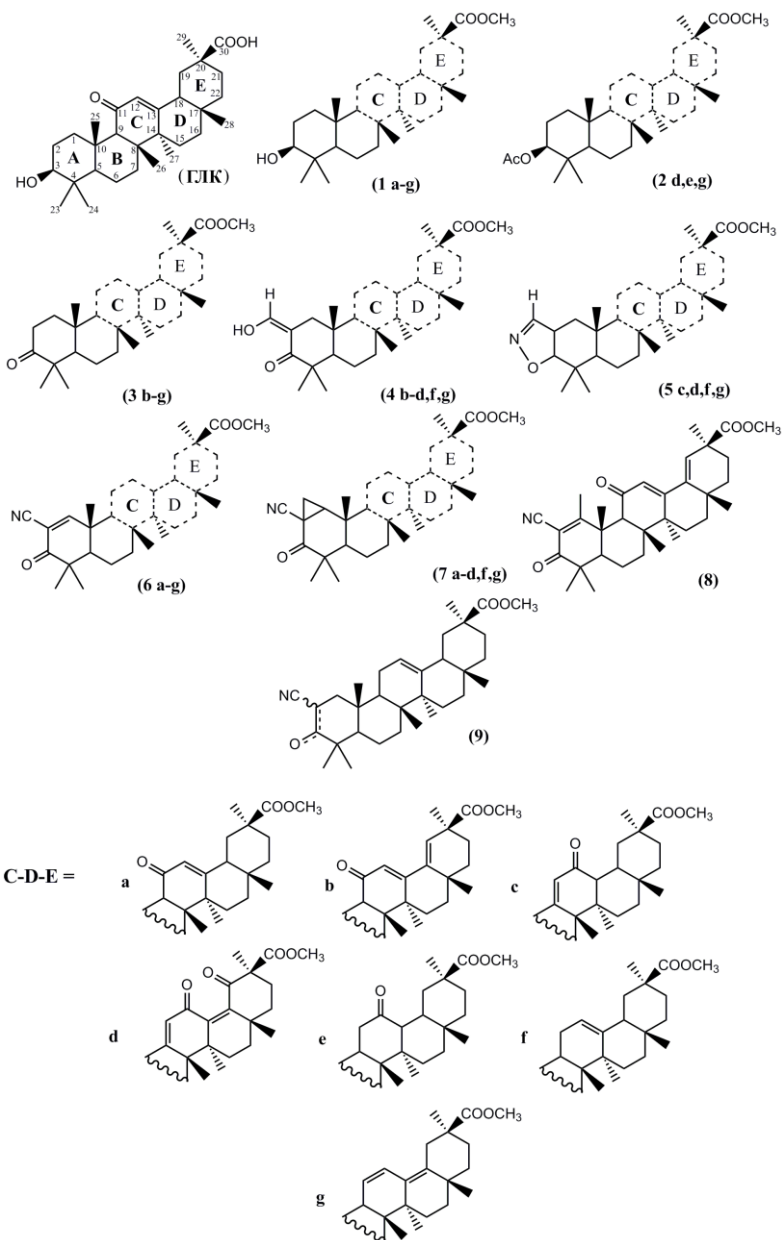


Рис. 1. Структуры новых производных ГЛК

Таблица 1. Цитотоксичность новых производных ГЛК. Данные приведены для клеток эпидермоидной карциномы человека KB-3-1

Соед.*	IC ₅₀ , мкМ	Соед.	IC ₅₀ , мкМ	Соед.	IC ₅₀ , мкМ	Соед.	IC ₅₀ , мкМ
ГЛК	>100	3b	27,0±1,2	5c	>100	7a	43,3±2,7
1a	6,8±0,5	3c	>100	5d	8,1±0,7	7b	>100
1b	>100	3d	16,1±3,7	5f	>100	7c	29,5±1,3
1c	10,9±2,3	3e	25,2±0,6	5g	Н.р.	7d	>100
1d	10,7±1,7	3f	Н.р.	6a	20,0±0,6	7f	>100
1e	6,8±3,5	3g	Н.р.	6b	4,0±0,2	7g	>100
1f	Н.р.**	4b	6,3±0,2	6c	0,3±0,1	8	>100
1g	Н.р.	4c	18,1±1,5	6d	1,0±0,1	9	80,0±0,9
2d	47,0±16,2	4d	>100	6e	5,5±0,7		
2e	Н.р.	4f	40,0±0,7	6f	Н.р.		
2g	Н.р.	4g	Н.р.	6g	2,2±0,3		

* Соед. – название исследуемого соединения; ** Н.р. – не растворяется в ДМСО.

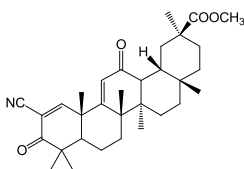


Рис. 2. Структурная формула солоксолон метила

Наибольшей цитотоксичностью среди исследованных производных обладало соединение (**6c**) (метил 2-циано-3,12-диоксо-18βH-олеан-1(2),11(9)-диен-30-оат, или солоксолон метил) (IC₅₀ = 0,3±0,1 мкМ), характеризующееся наличием 2-циано-1-ен-3-оной структуры в кольце А и заменой нативного для ГЛК 11-оксо-12-енового фрагмента на 12-оксо-11-еновый фрагмент в кольце С (Рис. 2). Полученные данные показывают, что высокий уровень цитотоксичности солоксолон метила (далее СМ) определяет поляризация двойных связей в кольцах А и С сильными электрон-акцепторными циано- и кето-группами, приводящая к формированию в положениях С1 и С9 молекулы электрофильных сайтов (акцепторов Михаэля). Удаление акцепторов Михаэля из положения С1 или С9 молекулы СМ путем формирования циклопропанового кольца (**7c**) или насыщения кратной связи (**6e**), соответственно, приводит к значительному снижению цитотоксичности производных.

Таким образом, в результате проведенного скрининга было выявлено лидерное соединение СМ, обладающее наибольшим уровнем цитотоксичности в отношении клеток KB-3-1. Дальнейшие исследования в рамках настоящей работы были проведены на примере указанного производного.

2. Цитотоксичность СМ в отношении опухолевых клеток различного гистогенеза

Антипролиферативное действие СМ в отношении опухолевых клеток различного гистогенеза проводили с помощью МТТ-теста через 24 ч инкубации клеток в присутствии 0,1-10 мкМ СМ. Показано, что СМ оказался высокотоксичным для всех использованных линий опухолевых клеток, в том числе для клеток KB-8-5, характеризующихся фенотипом множественной лекарственной устойчивости (Табл. 2).

Таблица 2. Цитотоксичность СМ в отношении опухолевых клеток человека и мыши различного гистогенеза*

<i>Клеточная линия</i>	<i>IC₅₀, мкМ</i>
KB-3-1	0,3±0,1
HeLa	1,3±0,1
MCF-7	5,0±0,3
SK-N-MC	0,8±0,1
HepG2	2,4±0,4
HuTu-80	0,7±0,2
KB-8-5	1,2±0,1
MH-22a	2,5±0,2

* Указанные в таблице данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

3. Определение механизма гибели опухолевых клеток под действием СМ

3.1 Исследование проапоптотической активности СМ

Для выяснения механизма антипролиферативного действия СМ в отношении опухолевых клеток проанализировали его влияние на индукцию апоптоза, используя метод селективного окрашивания клеток конъюгатом аннексин-FITC. Клетки KB-3-1 инкубировали в присутствии СМ (0,3 или 1 мкМ; 4, 18 или 24 ч). В качестве контроля использовали клетки, инкубированные в тех же условиях, но в отсутствие СМ. Показано, что инкубация клеток в присутствии СМ в течение 4 ч почти не вызывает изменения состава клеточной популяции по сравнению с контролем – процент клеток в состоянии апоптоза в контроле и опыте не превышал 10%. Увеличение времени инкубации до 18–24 ч приводит к значительному повышению доли клеток в состоянии апоптоза (Табл. 3), причем уровень активации апоптоза напрямую зависел, как от времени инкубации клеток в присутствии СМ, так и от его концентрации.

Таблица 3. Количество клеток в стадии апоптоза после инкубации в присутствии СМ*

	4 ч	18 ч	24 ч
ДМСО**	2,2	6,8	8,4
СМ, 0,3 мкМ	5,2	21,8	49,7
СМ, 1 мкМ	7,3	47,3	89,2

* Приведен процент клеток в состоянии апоптоза в исследуемом образце. Данные проточной цитофлуориметрии. Событий в каждом образце не менее 10000. ** ДМСО – контрольные клетки, инкубированные в присутствии 0,1% ДМСО.

3.2 Исследование влияния СМ на мембранный потенциал митохондрий

Для определения способности СМ индуцировать митохондриальный путь апоптоза, было исследовано его влияние на мембранный потенциал митохондрий (МПМ). Клетки KB-3-1 инкубировали в присутствии СМ (1 мкМ) в течение 6 ч, после чего окрашивали катионным красителем JC-1, способным накапливаться в трансмембранном просвете поляризованных митохондрий и флуоресцировать в оранжевой области ($\lambda = 590$ нм). При снижении МПМ происходит смещение спектра флуоресценции JC-1 в зелено-желтую область ($\lambda = 527$ нм), что позволяет

определять уровень изменения МПМ с помощью методов флуоресцентного анализа.

С помощью проточной цитофлуориметрии было установлено, что большинство контрольных клеток (инкубированных в отсутствие СМ) имело высокий уровень флуоресценции в канале FL2 (оранжевый спектр), т.е. характеризовались наличием высокополяризованных митохондрий. Инкубация клеток в присутствии СМ приводила к значительному снижению уровня флуоресценции в канале FL2 по сравнению с контролем (Рис. 3), что свидетельствует о снижении МПМ под действием СМ. Таким образом, можно утверждать, что СМ запускает апоптоз опухолевых клеток по митохондриальному пути, вызывая деполяризацию митохондрий.

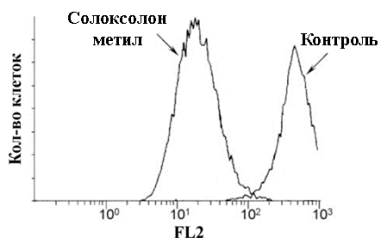


Рис. 3. Влияние СМ на МПМ клеток KB-3-1. Проточная цитофлуориметрия. Цитограмма JC-1 в клетках KB-3-1, инкубированных в присутствии 0,1% ДМСО (контроль) или 1 мкМ СМ (опыт) в течение 6 ч. Событий в каждом образце не менее 10000.

3.3 Влияние СМ на распределение клеток по фазам клеточного цикла

Для оценки влияния СМ на распределение клеток по фазам клеточного цикла, клетки KB-3-1 после инкубации с СМ (0,3 мкМ, 18 ч) окрашивали PI и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра. На основании полученных данных построена диаграмма, характеризующая распределение клеток по фазам клеточного цикла (фаза Sub-G1, соответствующая апоптозу, фазы G1, S и G2/M) (Рис. 4).

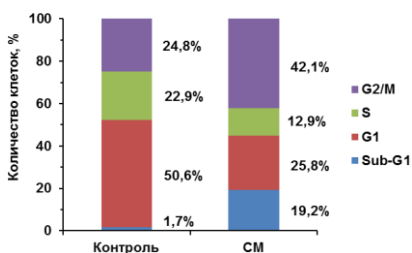


Рис. 4. Распределение клеток KB-3-1 по фазам клеточного цикла. **Контроль** и **СМ** – клетки, инкубированные в присутствии 0,1% ДМСО и 0,3 мкМ СМ, соответственно, в течение 18 ч. Клетки в фазе Sub-G1 соответствуют анеуплоидным клеткам, т.е. клеткам на стадии апоптоза.

Как видно из Рис. 4, СМ вызывал 11-кратное увеличение количества клеток в фазе Sub-G1. Помимо этого, СМ вызывал остановку клеточного цикла на фазе G2/M – количество клеток, находящихся в данной фазе, увеличивалось с 24,8% в контроле до 42,1% в опыте. Увеличение популяции клеток в Sub-G1 и G2/M фазах при действии СМ сопровождалось снижением доли клеток в фазах G1 и S в 1,8 и 2 раза по сравнению с контролем, соответственно.

Полученные данные свидетельствуют в пользу проапоптотического действия СМ и согласуются с данными, полученными выше (см. раздел 2.1). Остановка клеточного цикла под действием исследуемого соединения вносит весомый вклад в его антипролиферативное действие.

3.4 Влияние СМ на активацию каспаз

Для оценки способности СМ вызывать активацию каспаз, клетки KB-3-1 после инкубации в присутствии СМ (0,3 или 1 мкМ, 18 ч) окрашивали с помощью CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker («Promega Inc.», США) и анализировали на проточном цитофлуориметре. Показано, что в контрольных клетках наблюдался слабый зеленый сигнал – только 9% клеток в популяции характеризовалось наличием активных каспаз. Инкубация клеток в присутствии СМ приводила к значительному росту числа клеток с активными каспазами до 51 и 85% для 0,3 и 1 мкМ СМ, соответственно (Рис. 5).

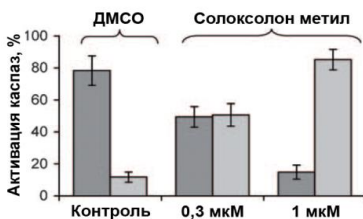


Рис. 5. Активация каспаз в клетках KB-3-1, вызванная действием СМ. Соотношение клеток KB-3-1 с неактивными (темные столбцы) и активными (светлые столбцы) каспазами после инкубации в присутствии 0,1% ДМСО (контроль), 0,3 мкМ и 1 мкМ СМ в течение 18 ч. Данные проточной цитофлуориметрии. Событий в каждом образце не менее 10000.

Таким образом, на основании полученных данных нами было доказано, что гибель опухолевых клеток под действием СМ происходит в результате запуска митохондриального каспаз-зависимого апоптоза.

4. Полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в клетках KB-3-1, инкубированных в присутствии СМ

Для более детального исследования противоопухолевого действия СМ *in vitro* и выявления возможных внутриклеточных процессов, запускаемых исследуемым производным, исследовано его влияние на изменение паттерна экспрессии генов в опухолевых клетках с помощью кДНК-микрочипирования. Для этого клетки KB-3-1 инкубировали в присутствии СМ (1 мкМ) в течение 1, 2, 3, 4, 6 и 10 ч., контролем служили интактные клетки. кДНК-микрочипирование проводили на микроматрице HumanHT-12 v4 BeadChip («illumina», США) в ЗАО «Геноаналитика» (Москва). Статистическая и биоинформационная обработка полученных данных проводилась лично с использованием платформы GeneXplain («GeneXplain», Германия).

Данные по уровням экспрессии генов были нормализованы с использованием стандартных протоколов. С помощью гипергеометрического анализа были рассчитаны относительные изменения уровней экспрессии генов в опыте по сравнению с контролем при $p \leq 0,001$ (p – порог достоверности изменений). Для дальнейшего функционального анализа были отобраны гены, уровень экспрессии которых изменялся под действием СМ в 2 раза и более по сравнению с контролем. В результате было выявлено 269 дифференциально

экспрессирующихся генов (далее ДЭГ): для 229 генов наблюдалось повышение уровня экспрессии, а для 40 генов – снижение экспрессии.

Как видно из Табл. 4, в течение первых двух часов действие СМ мало меняет паттерн экспрессии генов в клетках. Заметные изменения транскриптома начинают наблюдаться к 3 ч инкубации с СМ, когда происходит значительное возрастание количества ДЭГ. Необходимо отметить, что под действием СМ преимущественно происходит повышение уровней экспрессии генов, а значительное количество ингибируемых генов (34 гена) было выявлено лишь после 10 ч инкубации клеток с исследуемым соединением (Табл. 4).

Таблица 4. Количество ДЭГ в клетках КВ-3-1 в зависимости от времени инкубации клеток с СМ ($p \leq 0,001$).

Гены \ Время, ч	1	2	3	4	6	10
	Активируемые	0	1	31	27	58
Ингибируемые	3	1	2	3	0	34

4.1 Функциональный анализ ДЭГ

Для выявления внутриклеточных процессов, запускаемых под действием СМ, была проведена функциональная аннотация ДЭГ в базе данных Gene Ontology по словарю «Биологические процессы», и был определен список наиболее перепредставленных терминов генных онтологий (GO) для временных точек, в которых обогащение терминами GO давало достоверные результаты ($p < 0,05$) (Рис. 6 а,б).

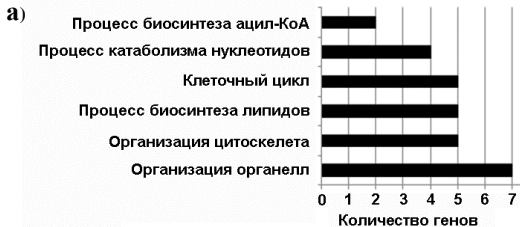
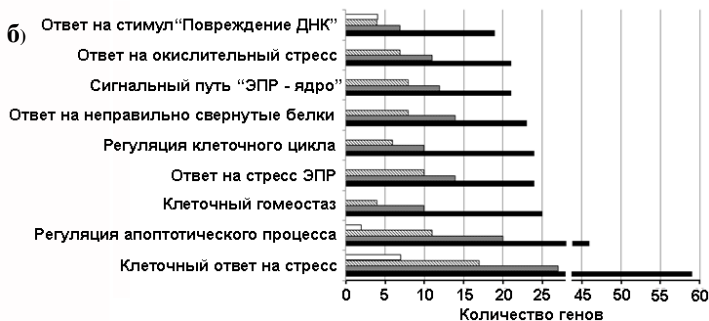


Рис. 6. Значимые термины генных онтологий, объединяющие гены, экспрессия которых: а) понижается при инкубации клеток КВ-3-1 в присутствии 1 мкМ СМ в течение 10 ч; б) повышается при инкубации клеток КВ-3-1 в присутствии 1 мкМ СМ в течение □ - 3 ч, ▨ - 4 ч, ▩ - 6 ч, ■ - 10 ч ($p < 0,05$).



На рис. 6а представлены результаты обогащения терминами GO генов, ингибированных под действием СМ в точке 10 ч. Гены, характеризующиеся сниженной экспрессией, группируются в следующие термины GO: организация органелл и цитоскелета (*Capzb, Dag1, Ltprel4, Nefh, Rhou, Tubg1*), клеточный цикл (*E2f2, Leprel4, Rhou, Skp2, Tubg1*), процесс катаболизма нуклеотидов (*Acly, Dctpp1, Pde8b, Rhou, Tubg1*), процессы биосинтеза ацил-КоА (*Acly, Fasn*) и липидов (*Acly, Fasn, Ptges, Scarb1, Srebfl*).

Результаты обогащения терминами GO дифференциально активированных генов, выявленных для временных точек 3, 4, 6 и 10 ч, представлены на Рис. 6б. В данном случае наибольшее обогащение наблюдалось по генам, ассоциированным с клеточным ответом на стресс (*Ddit3, Dnajb9, Etv5, Herpud1, Hmox1, Hyoul, Igfbp1, Nupr1, Trib3, Vimp* и др.) и регуляцией процесса апоптоза (*Anxa1, Adm, Bex2, Cdkn1a, Ddit3, Dnajb9, Ifit2, Ifit3, Igfbp3, Phlda1* и др.), что свидетельствует о способности СМ оказывать стрессорное воздействие на опухолевые клетки, приводящее впоследствии к запуску их апоптотической гибели. Данный факт согласуется с наличием у СМ проапоптотической активности, установленной нами ранее.

Кроме того, под действием СМ наблюдается экспрессия генов, связанных с ответом клетки на неправильно свернутые белки и вызываемый ими стресс ЭПР (*Asns, Atf4, Ddit3, Dnajb9, Edem1, Herpud 1, Hyoul, Ppp1r15a, Trib3, Xbp1* и др.). Известно, что в случае накопления в просвете ЭПР большого количества белков с некорректной пространственной структурой может происходить гибель клеток по пути апоптоза. Таким образом, стресс ЭПР может играть важную роль в реализации проапоптотической активности СМ.

Одной из причин нарушения правильной укладки белка и последующего запуска стресса ЭПР, является окислительный стресс. Функциональный анализ ДЭГ выявил высокое обогащение по генам, связанным с ответом клетки на этот процесс (*Anxa1, Ddit3, Fos, Gclc, Gclm, Hmox1, Idh1, Klf2, Lcn2, Slc7a11* и др.), что согласуется с полученными ранее данными по способности СМ вызывать в опухолевых клетках синтез активных форм кислорода (АФК). Кроме этого, была отмечена высокая экспрессия генов, ассоциированных с термином GO «Ответ на стимул «Повреждение ДНК»» (*Bcat1, Cdc14b, Cdkn1a, Ddit3, Eid3, Gadd45a, Hmox1, Ier3, Ifi16, Ikbkg* и др.), что также может косвенно свидетельствовать о способности СМ вызывать окислительный стресс, так как известно, что АФК являются одним из важных источников повреждения клеточных макромолекул, в том числе ДНК.

Проведенный функциональный анализ выявил также обогащение по генам, вовлеченным в процесс регуляции клеточного цикла (*Anxa, Asns, Bcat1, Bex2, Cdc14b, Cdkn1a, Ctgf, Gadd45a, Ier3, Irf1* и др.). В частности, показано, что СМ приводит к повышению экспрессии генов *Cdc14b*, кодирующего регулятор G2/M контрольной точки клеточного цикла, и *Cdkn1a*, белковый продукт которого способен приводить к остановке клеточного цикла на фазах G1 и G2, что

согласуется со способностью исследуемого соединения вызывать остановку клеточного цикла в фазе G2/M, отмеченную нами ранее.

Таким образом, результаты полнотранскриптомного анализа экспрессии генов в клетках KB-3-1, инкубированных в присутствии СМ, подтверждают полученные ранее данные и свидетельствуют о способности СМ вызывать множественные преобразования в регуляторном аппарате клеток. При действии СМ наблюдались количественные изменения мРНК генов, задействованных в разнообразных клеточных процессах, среди которых наиболее значимыми являлись регуляция апоптоза, стресс ЭПР, окислительный стресс и защитные механизмы, адаптирующие опухолевые клетки к стрессовым условиям, вызванным действием СМ.

5. Спектр биологических активностей СМ

Известно, что пентациклические тритерпеноиды способны одновременно воздействовать на несколько специфических мишеней внутри клеток, что определяет широкое разнообразие их фармакологических свойств. В рамках данной работы изучены противоопухолевая, противовоспалительная и противовирусная активности СМ, так как процессы злокачественной трансформации клеток, воспаления и вирусного заражения тесно связаны между собой общими сигнальными путями.

5.1 Противоопухолевая активность СМ на мышинных моделях

5.1.1 Оценка противоопухолевой активности СМ *ex vivo*

Чувствительность клеток карциномы Кребс-2, пассируемых на мышах, к действию СМ оценивали в эксперименте *ex vivo*. Для этого клетки Кребс-2 выделяли из асцитной жидкости мышей-опухоленосителей, инкубировали в физиологическом растворе в присутствии СМ (0,5 мг/кг, опыт) или 0,1% ДМСО (контроль) в течение 1 ч, после чего трансплантировали в правую бедренную мышцу мыши линии A/Sp для формирования опухолевого узла.

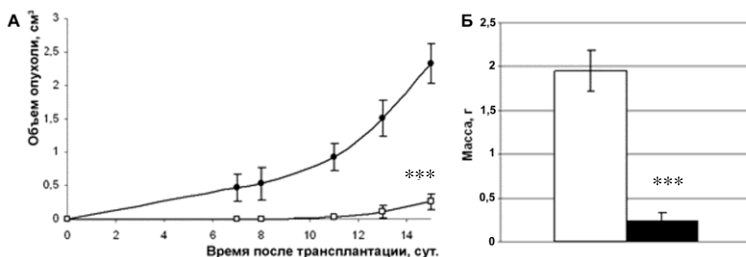


Рис. 7. Влияние СМ на рост карциномы Кребс-2 в эксперименте *ex vivo*. А) Динамика роста опухоли Кребс-2. ● – контрольные животные с опухолью, развившейся из клеток, инкубированных в присутствии 0,1% ДМСО в течение 1 ч при 37°C; □ – опытные животные с опухолью, развившейся из клеток, инкубированных в присутствии 0,5 мг/мл СМ в течение 1 ч при 37°C. Б) Масса опухолевого узла. □ – контрольные мыши, ■ – опытные мыши. *** $p < 0,001$.

На Рис. 7 приведена динамика роста карциномы Кребс-2. Видно, что эта опухолевая линия оказалась чувствительной к действию СМ. На 15 сутки после трансплантации опухоли средний объем опухолевого узла в опытной группе оказался в 9 раз меньше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$) (Рис. 7А). Измерение массы опухоли показало, что инкубация клеток карциномы Кребс-2 в присутствии СМ *ex vivo* приводит к торможению роста опухоли на 88% по сравнению с контролем.

5.1.2 Противоопухолевая активность СМ на модели карциномы Кребс-2 *in vivo*

Противоопухолевый потенциал СМ *in vivo* исследовали на модели карцинома Кребс-2/мыши А/Sn. Суспензию клеток карциномы Кребс-2 внутрибрюшинно трансплантировали мышам линии DD для формирования асцитной формы опухоли. Через 24 часа после трансплантации опухоли мышей-опухоленосителей делили на 5 групп и вводили внутрибрюшинно (1) физиологический раствор (контроль), (2) 10% Твин-80, (3) 10% Кремофор-EL, (4) СМ в 10% Твин-80 в дозе 50 мг/кг или (5) СМ в 10% Кремофор-EL в дозе 50 мг/кг (солубилизаторы Твин-80 и Кремофор-EL использовались нами для увеличения растворимости СМ).

Препараты вводили ежедневно за исключением выходных в течение 2-х недель (всего 9 инъекций). На 14 сутки мышей выводили из эксперимента и определяли массу асцита и содержание клеток в асцитной жидкости (Рис. 8). Показано, что СМ значительно подавлял рост карциномы Кребс-2. В группах мышей, которым вводили СМ в суспензии с Твин-80 и Кремофор-EL, средняя масса асцита составила $2,1 \pm 0,9$ и $3,7 \pm 1,2$ г, соответственно, что в 4,1 и 2,4 раза ниже данного показателя у контрольных групп (2) и (3), соответственно. Кроме того, инъекции СМ с Твин-80 и Кремофор-EL приводили к достоверному снижению количества опухолевых клеток в асцитной жидкости на 74% и 79% по сравнению с контролем, соответственно. При этом показано, что сами солубилизаторы не оказывали влияния на рост опухоли.

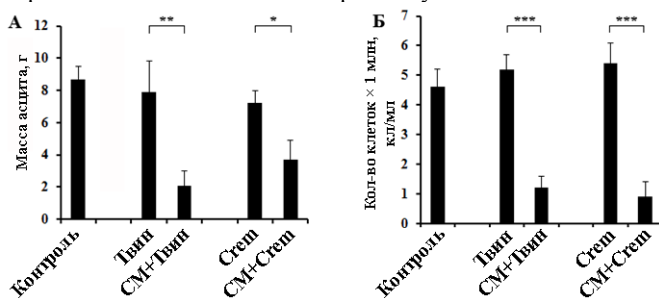


Рис. 8. Влияние СМ в растворе с солубилизаторами на развитие асцитной формы карциномы Кребс-2. **А.** Анализ массы асцита. **Б.** Количество клеток в асцитной жидкости. **Контроль** – контрольные мыши, получавшие физиологический раствор; **Твин** – мыши, получавшие 10% Твин-80; **СМ+Твин** – мыши, получавшие СМ в 10% Твин-80 в дозе 50 мг/кг; **Стем** – мыши, получавшие 10% Кремофор-EL; **СМ+Стем** – мыши, получавшие СМ в 10% Кремофор-EL в дозе 50 мг/кг. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

5.2 Противовоспалительная активность СМ

5.2.1 Исследование противовоспалительного потенциала СМ *in vitro*

Противовоспалительную активность СМ в экспериментах *in vitro* оценивали по его способности подавлять синтез провоспалительного медиатора оксида азота (II) (NO) макрофагальными клетками J-774, активированными липополисахаридом (ЛПС) *E. coli*. Клетки J-774 одновременно инкубировали в присутствии ЛПС (10 мкг/мл) и СМ (0,01-1 мкМ) в течение 24 ч. После инкубации надклеточную среду анализировали на наличие NO с помощью набора реагентов Griess Reagent System («Promega», США). В качестве препаратов сравнения использовали высокоактивный структурный аналог СМ бардоксолол метил и широко используемый в клинической практике нестероидный противовоспалительный препарат индометацин.

Проведенные исследования показали (Рис. 9), что СМ эффективно подавляет синтез NO в концентрациях, не являющихся токсичными для используемых клеток J-774 ($EC_{50}^1 = 0,4 \pm 0,1$ мкМ против $IC_{50}^{J-774} = 3,8 \pm 0,04$ мкМ). При этом активность СМ оказалась практически в пять раз выше активности бардоксолол метила ($EC_{50}^{BM} = 2,1 \pm 0,3$ мкМ) и в 64 раза выше активности препарата сравнения индометацина ($EC_{50}^{IM} = 27,0 \pm 1,4$ мкМ).

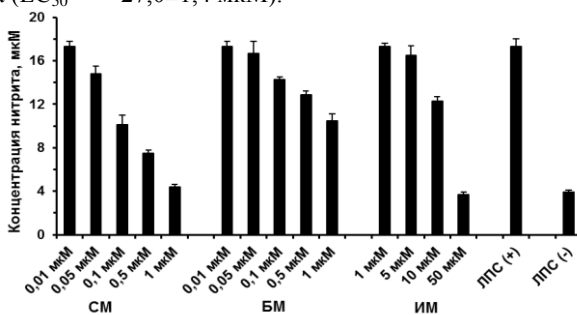


Рис. 9. Подавление синтеза NO макрофагальными клетками J-774, активированными ЛПС, под действием СМ. Клетки J-774 инкубировали в присутствии 10 мкг/мл ЛПС и исследуемых препаратов (СМ - солоксолол метил, БМ - бардоксолол метил, ИМ - индометацин) в течение 24 ч. ЛПС (+) – клетки, инкубированные в присутствии ЛПС и в отсутствие соединений. ЛПС (-) – клетки, инкубированные в отсутствие как ЛПС, так и соединений. Представленные данные получены в трех независимых экспериментах.

5.2.2. Исследование антиэкссудативной активности СМ на модели острого воспаления *in vivo*

Для оценки противовоспалительной активности СМ *in vivo* была использована модель острого экссудативного воспаления, вызванного введением под планарный апоневроз правой задней лапы беспородных мышей 0,1% раствора гистамина. СМ вводился внутривенно в 10% Твин-80 в дозе 50

¹ EC_{50} – эффективная концентрация соединения, при которой наблюдается 50% снижение синтеза провоспалительного медиатора.

мг/кг за 1 ч до введения гистамина. В качестве референсного соединения был использован индометацин в дозе 20 мг/кг. О противовоспалительной активности судили по уменьшению отека в сравнении с интактной левой лапой по формуле:

$$\% \text{ отека} = (1 - ((\text{Мпр}-\text{Мл})_{\text{контроль}} - (\text{Мпр}-\text{Мл})_{\text{опыт}}) / (\text{Мпр}-\text{Мл})_{\text{контроль}}) \times 100\%,$$

где **Мпр** – средний вес правой лапы с отеком, **Мл** – средний вес левой интактной лапы.

Внутрижелудочное введение СМ в дозе 50 мг/кг приводило к достоверному снижению средней величины отека на 74,3% по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (Рис.10). Эффективность действия СМ оказалась сравнимой с индометацином, подавляющим отек в среднем на 55,3% ($p < 0,05$).

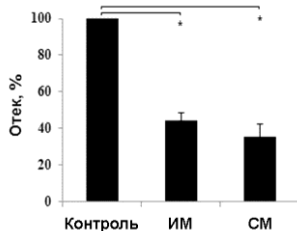


Рис. 10. Противовоспалительное действие СМ *in vivo*. Модель острого воспаления, вызванного гистамином. **Контроль** – контрольные мыши, получавшие внутрижелудочно физиологический раствор. **Индометацин** - мыши, получавшие внутрижелудочно индометацин в дозе 20 мг/кг. **СМ** – опытные мыши, получавшие внутрижелудочно СМ в 10% Твин-80 в дозе 50 мг/кг (Работа выполнена совместно с ЛФИ НИОХ СО РАН). * $p < 0.05$

5.3 Противовирусная активность СМ

Ранее было показано, что глицирризиновая кислота (ГЛЗК), являющаяся исходным соединением при синтезе СМ, обладает противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А (Wolkerstorfer, A., 2009). Представлялось интересным оценить противовирусный потенциал СМ в отношении вируса гриппа А (штамм A/WSN/33 (H1N1)); в качестве клеточной модели использовали клетки MDCK и A-549. Для определения диапазона концентраций СМ, не вызывающих гибель данных клеток, определяли значения IC_{50} СМ (Табл. 4).

Таблица 4. Цитотоксичность СМ в отношении клеточных линий MDCK и A-549.

Клеточная линия	IC_{50} , μM
MDCK	4,63±0,07
A-549	2,24±0,12

5.3.1 Исследование влияния СМ на репродукцию вируса гриппа А

Для исследования влияния СМ на репродукцию вируса гриппа А клетки MDCK заражали вирусом в течение 1 ч, удаляли вирусный инокулят, промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), добавляли свежую среду и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. СМ добавляли к клеткам MDCK как во время заражения, так и после удаления вирусного инокулята. В качестве препаратов сравнения использовали противовирусный препарат рибавирин и ГЛЗК. По окончании инкубации с помощью иммуноферментного анализа определяли титры вируса. Показано, что СМ дозозависимо подавляет размножение вируса гриппа А (Рис. 11) – инкубация клеток в присутствии 0,5, 1 и 1,5 мкМ СМ приводила к снижению титра вируса в опыте на 0,5, 1,1 и 2,8 lg по сравнению с контролем,

соответственно. Рибавирин в концентрации 1 мкМ снижал титра вируса лишь на 0,7 lg, а ГЛЗК (1 мМ) не оказывала влияния на его репродукцию.

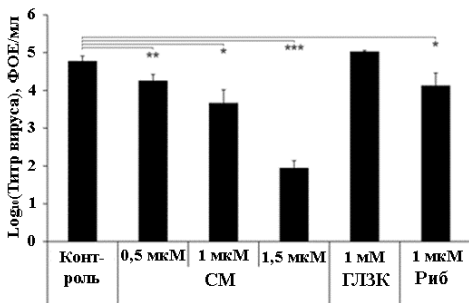


Рис. 11. Влияние СМ на репродукцию вируса гриппа А *in vitro*. Клетки MDCK инфицировали вирусом гриппа А при множественности заражения (MOI) = 0,01 ФОЕ/кл в присутствии указанных соединений. Спустя 1 ч после адсорбции вируса при 37°C клетки дважды промывали ФСБ и инкубировали при 37°C в течение 24 ч в свежей среде, содержащей указанные вещества. Далее в надклеточной среде определяли титр вируса. **Контроль** – инфицированные клетки, инкубированные в отсутствие соединений, **СМ** – солокосолон метил, **ГЛЗК** - глицирризиновая кислота, **Риб** - рибавирин. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение трех независимых экспериментов. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.3.2 Исследование механизма противовирусного действия СМ

5.3.2.1 Исследование влияния времени добавления СМ на титр вируса

Для определения этапов репликативного цикла вируса гриппа А, чувствительных к действию СМ, исследовали противовирусный эффект СМ в зависимости от времени добавления к зараженным клеткам (эксперимент time-of-addition).

Первый этап исследования проводили по схеме, представленной на Рис. 12А. Показано (Рис. 12В), что добавление СМ к клеткам до и во время инфекции не подавляет репродукцию вируса, в то время как введение соединения после отмычки клеток от вируса приводит к снижению титра вируса в 11 раз по сравнению с контролем. Отсутствие активности в случае добавления СМ через 8 ч после инфицирования (ч.п.и.) свидетельствует о том, что СМ действует лишь на ранней стадии развития вирусной инфекции, а СМ, добавленный на поздних сроках, возможно, не справляется с увеличившейся вирусной нагрузкой.

Для выявления конкретных этапов репликативного цикла вируса гриппа, чувствительных к действию СМ, был исследован временной промежуток, ограничивающий один цикл репродукции вируса (от 0 до 8 ч п.и.) (Рис. 12Б). Как видно из рис. 12Г, достоверное ингибирование вирусной репродукции было отмечено при инкубации зараженных клеток в присутствии СМ в течение всего вирусного цикла (0-8) ч.п.и. и в промежутке (0-2) ч.п.и. Временной промежуток (0-2) ч.п.и. соответствуют ранним этапам жизненного цикла вируса гриппа, включающим проникновение вируса внутрь клеток, снижение рН внутри эндосом и слияние вирусной оболочки с эндосомальной мембраной. В обоих случаях титр

в опытной группе снижался приблизительно на один порядок по сравнению с контролем. Во всех остальных временных промежутках СМ не проявлял своей противовирусной активности.

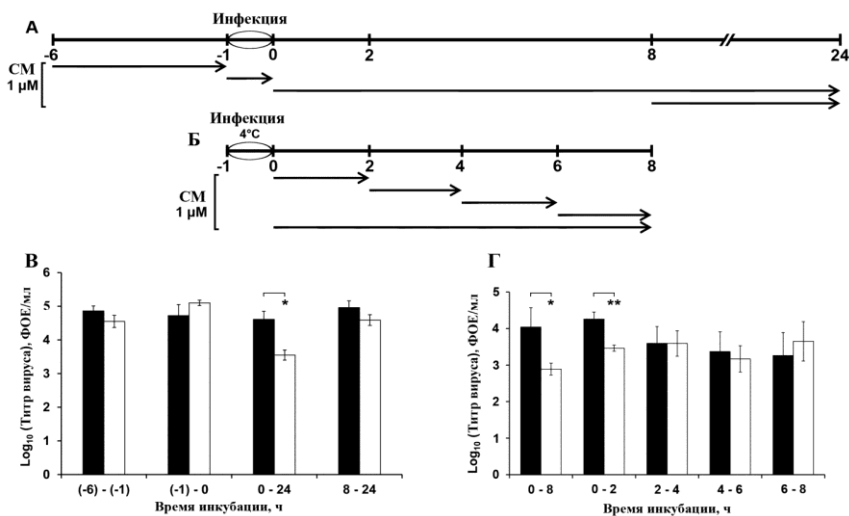


Рис. 12. Эксперимент time-of-addition. **А.** Клетки MDCK инфицировали вирусом гриппа при $MOI = 0,01$ ФОЕ/кл в течение 1 ч при $37^{\circ}C$. Вирусную адсорбцию проводили в промежутке (-1 – 0) ч. СМ (1 мкМ) добавляли к клеткам в отмеченных стрелками временных промежутках. Через 24 ч.п. определяли титры вируса в надклеточной среде. **Б.** Клетки MDCK инфицировали вирусом гриппа при $MOI = 0,001$ ФОЕ/кл в течение 1 ч ((-1)-0 ч.п.) при $4^{\circ}C$. СМ (1 мкМ) добавляли к клеткам в отмеченных стрелками временных промежутках. После каждого инкубационного периода, среду, содержащую СМ, удаляли, и клетки инкубировали в свежей среде до временной точки 8 ч.п., после которой определяли титры вируса в надклеточной жидкости. **В, Г.** Титры вируса. Черные столбцы – контроль – клетки MDCK, зараженные вирусом гриппа и инкубировавшиеся в отсутствие СМ. Белые столбцы – опыт – клетки MDCK, зараженные вирусом гриппа и инкубировавшиеся в присутствии СМ. На графиках представлены средние значения титра вируса \pm стандартное отклонение по результатам 3 независимых экспериментов. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Таким образом, мы показали, что противовирусная активность СМ основана на его способности ингибировать ранние стадии жизненного цикла вируса гриппа А.

5.3.3.2. Исследование влияния СМ на связывание вируса гриппа А с клеточной мембраной и его проникновение внутрь клеток

Анализ эффекта СМ на самые ранние этапы репликативного цикла вируса гриппа А – его связывание с клеточной мембраной и проникновение внутрь клеток – показал, что СМ в концентрациях 0,75 и 1 мкМ не влияет на связывание вирусных частиц с клеточной поверхностью (Рис. 13А), что согласуется с отсутствием противовирусной активности СМ в эксперименте time-of-addition во временном промежутке ((-1)-0) ч.п., отмеченном выше (Рис. 12В). Однако в концентрации 1,5 мкМ СМ оказывает выраженное ингибирующее действие –

наблюдается резкое снижение титра вируса в опыте в 70 раз по сравнению с контролем. Кроме этого, СМ в концентрации 1 и 1,5 мкМ способен подавлять проникновение вируса внутрь клеток – наблюдалось падение титра вируса в опыте по сравнению с контролем на 83% и 82%, соответственно (Рис. 13Б).

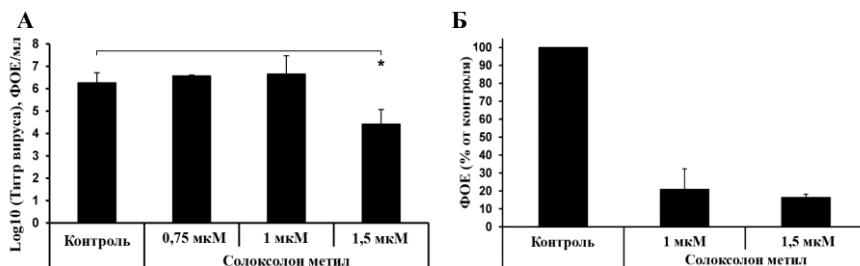


Рис. 13. Влияние СМ на ранние этапы репликативного цикла вируса гриппа А. **А.** Влияние СМ на связывание вируса гриппа А с клеточной мембраной. Клетки MDCK предохлаждали при 4°C в течение 1 ч, инфицировали вирусом (MOI = 0,01 ФОЕ/ккл), добавляли СМ (0,75, 1 и 1,5 мкМ) и инкубировали при 4°C в течение 3 ч. Далее клетки отмывали ФСБ от вируса и СМ, добавляли свежую среду и инкубировали далее при 37°C. Через 24 ч.п.и. определяли титры вируса. **Б.** Влияние СМ на проникновение вируса гриппа А внутрь клетки. Клетки MDCK предохлаждали при 4°C в течение 1 ч, заражали вирусом гриппа (MOI = 0,1 ФОЕ/ккл) при 4°C в течение 3 ч. Далее к клеткам добавляли СМ (1 и 1,5 мкМ) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, после чего инактивировали непроникшие внутрь клеток вирусные частицы кислым ФСБ (рН 3) в течение 1 мин, затем нейтрализовали надклеточную жидкость ФСБ (рН 11). К клеткам добавляли свежую среду. Через 24 ч.п.и. определяли титры вируса. Количество ФОЕ представлено в виде процентов от контроля. **Контроль** – инфицированные клетки MDCK, инкубированные в отсутствие СМ. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение двух независимых экспериментов, выполненных в трех повторях. * p<0,05

Таким образом, исследование механизма противовирусного действия СМ в отношении вируса гриппа А свидетельствует о том, что СМ ингибирует ранние этапы вирусного репликационного цикла. Доказано, что СМ способен эффективно ингибировать: а) проникновение вируса внутрь клеток и б) ранние этапы вирусного репликативного цикла во временном промежутке 0-2 ч после инфекции. Увеличение концентрации СМ до 1,5 мкМ приводит к значительному усилению противовирусной активности препарата и появлению у него активности, ингибирующей связывание вируса с клеткой.

4.3.4. Исследование противовирусной активности СМ на модели гриппозной пневмонии мышей *in vivo*

Оценку эффективности СМ в отношении вируса гриппа *in vivo* проводили на модели гриппозной пневмонии. Для этого мышей линии BALB/c интраназально заражали 0,5 ЛД вируса гриппа. СМ в суспензии с 10% Твин-80 вводили мышам интраназально в дозе 5 мг/кг за 6 часов до заражения, одновременно с заражением и далее один раз в сутки в течение 4 суток. На 5 сутки мышей выводили из эксперимента, извлекали легкие, определяли в них титры вируса и проводили гистологические исследования.

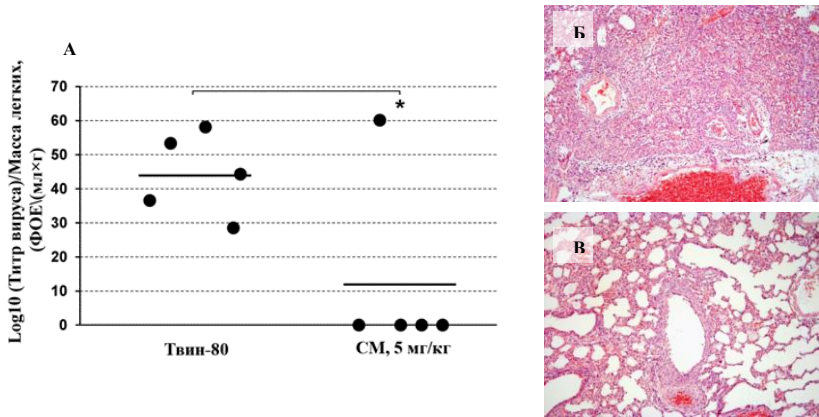


Рис. 14. Влияние введения СМ на развитие гриппозной пневмонии *мышей in vivo*. **А.** Титры вируса гриппа А в гомогенатах легких мышей. Горизонтальной линией отмечен средний титр вируса в группе. Отличие между контрольной (**Твин-80**) и опытной (**СМ (5 мг/кг)**) группами статистически достоверно (* $p < 0.05$). **Б, В.** Патоморфологические изменения в ткани легких мышей, инфицированных вирусом гриппа А после шестикратного интраназального введения Твин-80 (**Б**) или СМ в суспензии с 10% Твин-80 в дозе 5 мг/кг (**В**).

Как видно из рис. 14, СМ эффективен в отношении мышинной модели гриппозной инфекции – средний титр вируса в гомогенатах легких мышей из контрольной группы, получавших лишь 10% Твин-80, составлял 44,2 ФОЕ/(мл×г), в то время как в опытной группе, получавшей СМ, у четырех мышей из пяти титр в легких оказался равен нулю.

Гистологический анализ показал, что у животных, зараженных вирусом гриппа А и не получавших лечение (Рис. 14Б), морфологические изменения легочной ткани на 5 сутки после заражения характеризовались поражениями в виде скопления экссудата и клеточного детрита в просвете бронхов. Кроме того, наблюдались очаги геморрагического отека и инфильтрации нейтрофилов. При использовании СМ (Рис. 14В) поражение ткани легких в результате гриппозной пневмонии было резко ограничено. В просветах бронхов не отмечалось экссудата и клеточного детрита. СМ приводил к нормализации структуры легочной ткани, в том числе повышению степени воздушности респираторных отделов.

4.3.5. Исследование влияния СМ на синтез ИЛ-6 в клетках, зараженных вирусом гриппа

Для оценки влияния СМ на развитие воспаления, вызванного вирусом гриппа А, клетки А-549, зараженные вирусом, инкубировали в присутствии соединения в концентрациях 0,1-1 мкМ. Через 24 ч.п.и. уровень провоспалительного цитокина ИЛ-6 в надклеточной среде определяли с помощью ELISA (Рис. 15). Уровень ИЛ-6 у токс-инфицированных клеток оказался равным $28,3 \pm 0,6$ пг/мл, в то время как вирусная инфекция привела к увеличению синтеза данного цитокина в 9,1 раз ($256,5 \pm 25,5$ пг/мл), а СМ вызывал дозозависимое снижение продукции ИЛ-6

($EC_{50} = 1,1 \pm 0,1$ мкМ), не меняя при этом базальный уровень синтеза данного цитокина незараженными клетками (данные не приведены).

Таким образом, СМ не только ингибирует репродукцию вируса гриппа А, но также подавляет воспаление, вызванное данным патогеном.

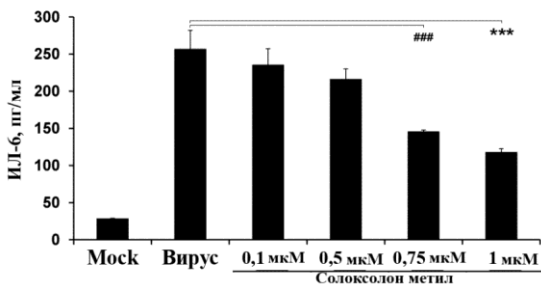


Рис. 15. Влияние СМ на синтез ИЛ-6 клетками А549, зараженными вирусом гриппа А. Клетки А549 заражали вирусом гриппа А (MOI=0.1 ФОЕ/кл) и инкубировали в присутствии СМ (0,1, 0,5, 0,75 и 1 мкМ). Через 24 ч.п.и. уровень ИЛ-6 в надклеточной среде определяли с помощью ELISA. **Mock** – интактные клетки. **Вирус** – клетки А549, инфицированные вирусом гриппа А, инкубированные в отсутствие СМ. На графиках представлены средние концентрации ИЛ-6 ± стандартное отклонение по результатам 3 независимых экспериментов. ### $p < 0.002$, *** $p < 0.001$.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что новые производные ГЛК обладают цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток *in vitro*. Выявлено соединение-лидер метил 2-циано-3,12-диоксо-18βН-olean-1(2),11(9)-диен-30-оат (солоксолон метил, СМ), обладающий наибольшим уровнем цитотоксичности в отношении опухолевых клеток различного гистогенеза ($IC_{50} = 0,3 - 5$ мкМ).

2. Анализ механизма действия СМ на клетки показал, что СМ вызывает остановку клеточного цикла на фазе G2/M и гибель опухолевых клеток в результате активации митохондриального каспазозависимого пути апоптоза. Показано, что действие СМ на опухолевые клетки сопровождается значительной активацией экспрессии генов, задействованных в регуляции апоптоза, стресса ЭПР, клеточного цикла, окислительного стресса и клеточного гомеостаза.

3. Исследование спектра биологической активности СМ показало, что СМ обладает противоопухолевым, противовоспалительным и противогриппозным действиями.

- На модели опухолевой прогрессии *in vivo* показано, что инъекции СМ в составе эмульсий на основе Твин-80 и Кремофор-ЕL приводят к подавлению роста асцитной формы карциномы Кребс-2 на 76% и 57% по сравнению с контролем, соответственно, и вызывают достоверное снижение количества опухолевых клеток в асцитной жидкости.

- На клеточных моделях *in vitro* показано, что СМ эффективно подавляет синтез медиаторов воспаления NO ($EC_{50}^{NO} = 0,4 \pm 0,1$ мкМ) и ИЛ-6 ($EC_{50}^{ИЛ-6} = 1,1 \pm 0,1$ мкМ).

• На модели острого воспаления *in vivo* показано, что СМ эффективно снижает отек, вызванный гистамином у мышей, на 74% по сравнению с контролем.

• Показано, что СМ обладает противовирусной активностью *in vitro* в отношении вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1), подавляя его проникновение в клетки и ранние этапы репликативного цикла вируса.

• Показано, что СМ эффективно подавляет развитие постинфекционной пневмонии, вызванной вирусом гриппа, ингибируя репродукцию вируса и подавляя вызванное им воспаление.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1) Logashenko, E.B., Salomatina, O.V., Markov, A.V., Korchagina, D.V., Salakhutdinov, N.F., Tolstikov, G.A., Vlassov, V.V., Zenkova, M.A. Synthesis and pro-apoptotic activity of novel glycyrrhetic acid derivatives. // ChemBioChem. – 2011. – V. 12 – P. 784-94.

2) Salomatina, O.V., Markov, A.V., Logashenko, E.B., Korchagina, D.V., Zenkova, M.A., Salakhutdinov, N.F., Vlassov, V.V., Tolstikov, G.A. Synthesis of novel 2-cyano substituted glycyrrhetic acid derivatives as inhibitors of cancer cells growth and NO production in LPS-activated J-774 cells. // Bioorg. Med. Chem. – 2014. – V. 22 – P. 585-93.

3) Popadyuk, I.I., Markov, A.V., Salomatina, O.V., Logashenko, E.B., Shemyukov, A.V., Zenkova, M.A., Salakhutdinov, N.F. Synthesis and biological activity of novel deoxycholic acid derivatives. // Bioorg. Med. Chem. – 2015. – V. 23 – P. 5022-34.

4) Патент РФ № 2487884 С1 «Средство, обладающее антиоксидантной, противовоспалительной, нейропротекторной, гиполипидемической, гипохолестеринемической, гипогликемической, гепатопротекторной, иммуносупрессорной активностями» / Саломатина, О.В., Салахутдинов, Н.Ф., Толстиков, Г.Ф., Логашенко, Е.Б., Марков, А.В., Зенкова, М.А., Власов, В.В., Бельская, Н.В., Бельский, Ю.П. - 2012129738/04, заявл. 13.07.2012; опубл. 20.07.2013, Бюл. №20.