

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 547.92+57.021+577.19+577.151.042

ПАНИБРАТ
ОЛЕСЯ ВЛАДИМИРОВНА

**ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ БРАССИНОСТЕРОИДЫ КАК
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск, 2021

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель:

Киселев Петр Андреевич,
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Шадыро Олег Иосифович
доктор химических наук, профессор,
заведующий кафедрой радиационной химии и
химико-фармацевтических технологий
химического факультета БГУ

Сергеев Геннадий Валерьевич
кандидат химических наук, заведующий
лабораторией молекулярной диагностики и
биотехнологии ГНУ «Институт
биоорганической химии НАН Беларуси»

Оппонирующая организация:

ГП «Институт биохимии биологически
активных соединений НАН Беларуси»

Защита состоится «1» декабря 2021 г. в 10⁰⁰ на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, зал заседаний Ученого Совета, e-mail: tbozhok@iboch.by, тел. +375 (17) 3979612.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «29» октября 2021 г.

Ученый секретарь

Совета по защите диссертаций Д 01.21.01

кандидат химических наук

Т.С. Божок

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи в онкологии, число ежегодных смертей от рака достигает 8 миллионов в год и имеет тенденцию к увеличению. Абсолютное большинство известных противоопухолевых препаратов обладает выраженными побочными эффектами, низкой специфичностью и может вызывать развитие лекарственной устойчивости. В связи с этим существует необходимость поиска новых химиотерапевтических агентов, а также установления механизма их действия.

Более 50% известных в настоящее время соединений с противоопухолевой активностью имеют природное происхождение или являются синтетическими производными природных соединений. В этой связи особый интерес представляют брассиностероиды. В 1979 году Grove с сотрудниками выделили из пыльцы рапса *Brassica napus* соединение – брассинолид – первый представитель нового класса гормонов растений, названных брассиностероидами. Вторым представителем брассиностероидов был кастастерон, открытый в 1982 году, после чего у растений были найдены и другие родственные соединения, общее число которых в настоящее время достигает 70-ти. Установлено, что природные брассиностероиды имеют углеродный скелет 5 α -холестана, и их структурные различия определяются видом и ориентацией кислородсодержащих функциональных групп в А- и В-циклах, а также структурой боковой цепи. Брассиностероиды повсеместно распространены в растительном царстве и встречаются почти во всех типах растительных организмов. Функцией брассиностероидов является регуляция роста, развития и гомеостаза растений.

В последние два десятилетия выявлен ряд положительных эффектов брассиностероидов у млекопитающих: противоопухолевый, противовирусный, анаболический, адаптогенный, антихолистеринемический, антиканцерогенный, ранозаживляющий и др. Брассиностероиды показали выраженную антипролиферативную активность в отношении гормон-зависимых опухолевых клеток. Действие брассиностероидов на гормон-независимые опухоли мало изучено. Это вызвано тем, что антипролиферативная активность в отношении этого типа клеток наблюдалась только при высоких концентрациях ≥ 50 мкМ. Но, поскольку брассиностероиды нетоксичны для нормальных клеток и обладают широким спектром защитно-стимулирующих свойств, значимых для онкопротекции, а гормон-независимые опухоли занимают значительно бóльшую часть в структуре онкозаболеваний, данный аспект стал предметом настоящей работы.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами. Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2016-2020 гг. (п.4. Медицина, фармация, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний; фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы; п.5. Химические технологии, нефтехимия: производство новых химических продуктов), утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 № 166.

Диссертационная работа является частью плановых исследований Института биоорганической химии НАН Беларуси, выполненных в рамках ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация», задание 2.17 «Выяснение роли монооксигеназ в окислительном стрессе и лекарственной резистентности опухолевых клеток» (2011-2013 гг., №ГР 20114747); ГП «Импортозамещающая фармпродукция» на 2012-2014 гг. и на период до 2020 года, подпрограмма «Диагностикумы», задание Д12 «Разработка и освоение технологии производства набора реагентов на базе стабильных радикалов для характеристики антирадикальной активности биологических жидкостей» (№ГР 20122927); ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма «Биологически активные вещества», задание 2.13 «Разработка методов анализа и характеристика монооксигеназной активности в клеточных культурах печени» (2016-2018 гг., №ГР 20162045); ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма «Биологически активные вещества», задание 2.50 «Химический синтез и оценка противоопухолевой активности новых функционализированных стероидов» (2019-2020 гг., №ГР 20192295).

За данное исследование соискателю присуждена стипендия Президента Республики Беларусь талантливый молодой ученый на 2017 г. (Приложение к распоряжению Президента Республики Беларусь от 19.12.2016 № 210рп).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является выявление *in vitro* противоопухолевой активности и возможных механизмов противоопухолевого действия природных брассиностероидов (БС) 24-эпибрассинолида (ЭБ) и 28-гомокастастерона (ГКС), а также их стереоизомеров (22S,23S)-эпибрассинолида (S-ЭБ) и (22S,23S)-гомокастастерона (S-ГКС) в отношении гормон-независимых опухолевых клеточных линий.

Обозначенная цель требовала решения следующих задач:

1. Охарактеризовать антипролиферативную активность ЭБ и ГКС, а также их стереоизомеров S-ЭБ и S-ГКС в отношении опухолевых линий A549 (карцинома легкого человека) и HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома).

2. Определить тип клеточной гибели, вызываемой исследуемыми соединениями, и установить ее взаимосвязь с внутриклеточным уровнем активных форм кислорода, вызывающих окислительные повреждения в клетках.

3. Оценить влияние brassinosteroidов на индукцию ферментативной активности монооксигеназ, участвующих в превращении экзогенных ксенобиотиков и канцерогенов.

4. Охарактеризовать влияние brassinosteroidов на противоопухолевую активность «классического» противоопухолевого препарата цисплатин, обладающего рядом побочных эффектов в отношении нормальных клеток человека.

Объект исследования – природные brassinosteroidы и их (22S,23S)-стереоизомеры.

Предмет исследования – противоопухолевые эффекты brassinosteroidов в отношении гормон-независимых опухолей индивидуально, а также в сочетании с известным цитостатиком цисплатином и выявление взаимосвязи наблюдаемых эффектов с пространственной структурой исследуемых соединений.

Научная новизна

Выявлено стимулирующее пролиферацию опухолевых клеток влияние низких концентраций brassinosteroidов (до 10 мкМ) и ингибирование пролиферации высокими концентрациями brassinosteroidов (≥ 50 мкМ).

Впервые на моделях опухолевых клеточных линий человека показано воздействие brassinosteroidов на внутриклеточный уровень активных форм кислорода. Все исследуемые соединения повышали его, однако более выраженный эффект наблюдался у синтетических аналогов brassinosteroidов. В случае S-ЭБ содержание АФК возрастало в 3 раза по сравнению с контролем, а S-ГКС увеличивал его в 5 раз.

Выявлен механизм гибели опухолевых клеток человека под действием природных brassinosteroidов и их стереоизомеров. При воздействии природных БС на опухолевые клетки происходил апоптоз клеток, S,S-аналоги вызывали некроз клеток.

Показано структурозависимое ингибирующее действие brassinosteroidов на активность CYP1, а также на образование из бенз[а]пирен-7,8-диола (Б[а]П-7,8-диола) «облигатного» канцерогена ($\pm$)7 β ,8 α -дигидрокси-9 α ,10 α -эпокси-7,8,9,10-тетрагидробенз[а]пирена (ДЕ2).

Впервые обнаружена способность brassinosteroidов повышать противоопухолевую активность «классического» цитостатика цисплатина.

Положения, выносимые на защиту

1. Зависимые от концентрации и структуры brassinosteroidов эффекты 24-эпибрасинолида, 28-гомокастастерона, (22S,23S)-эпибрасинолида и (22S,23S)-гомокастастерона в отношении роста нечувствительных к гормонам

опухолевых клеток, выражающиеся в стимулировании клеточного роста при концентрациях от 1 до 10 мкМ и его ингибировании при концентрациях равных или превышающих 50 мкМ.

2. (22S,23S)-стереоизомеры brassinosterоидов индуцируют высокие уровни активных форм кислорода в раковых клетках, что может вызвать окислительный стресс и последующий некроз опухолевых клеток, а природные brassinosterоиды в меньшей мере влияют на редокс-статус клеток и могут обуславливать клеточный апоптоз.

3. (22S,23S)-гомокастастерон и (22S,23S)-эпибрассинолид в большей степени, чем природные brassinosterоиды, ингибируют активность цитохромов CYP1A1 и CYP1B1 и катализируемую этими монооксигеназами активацию проканцерогена в культуре опухолевых клеток.

4. Brassinosterоиды повышают противоопухолевую активность цисплатина, причем максимальный эффект наблюдается в комбинации с 1 мкМ (22S,23S)-эпибрассинолидом или (22S,23S)-гомокастастероном.

Личный вклад соискателя ученой степени. Экспериментальная работа по культивированию опухолевых клеточных линий A549 и HepG2, их микроскопическому исследованию, определению антипролиферативной активности, монооксигеназной активности, а также все сопутствующие спектрофотометрические, спектрофлуориметрические измерения проводились автором самостоятельно. Установление типа клеточной гибели, фаз клеточного цикла и уровня активных форм кислорода проводилось автором при содействии сотрудника лаборатории фармакогенетических исследований ИБОХ НАН Беларуси Анисович М.В. Определение уровня экспрессии генов CYP1A1 и CYP1B1 в клетках линии A549 выполнялось к.х.н. Бабенко А.С. Планирование эксперимента, постановка задач, обсуждение полученных результатов и подготовка публикаций осуществлялись совместно с научным руководителем д.х.н., профессором Киселевым П.А. Исследуемые brassinosterоиды предоставлены лабораторией химии стероидов ИБОХ НАН Беларуси. Флуоресцентная метка, используемая для анализа уровня активных форм кислорода – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (DCF-DA), синтезирована автором на базе лаборатории химии липидов ИБОХ НАН Беларуси совместно с Адамчиком С.В. ВЭЖХ-анализ продуктов монооксигеназных реакций проводился сотрудниками лаборатории физико-химических методов исследования ИБОХ НАН Беларуси.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Материалы диссертационной работы представлены на 14 международных конференциях: 13-ая Международная научная конференция «Сахаровские чтения 2013 года: экологические проблемы XXI века» (16-17 мая 2013 г., г. Минск, Беларусь); XI Международная конференция «Медико-

социальная экология личности: состояние и перспективы» (17-18 мая 2013 г., г. Минск, Беларусь); Ломоносов-2014: XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология» (7-11 апреля 2014 г., г. Москва, Россия); 14-ая Международная научная конференция «Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века» (29-30 мая 2014 г., г. Минск, Беларусь); V Международная научная конференция «Химия, структура и функция биомолекул» (4-6 июня 2014 г., г. Минск, Беларусь); Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» Одиннадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (17-20 июня 2014 г., г. Минск, Беларусь); 15-ая Международная научная конференция «Сахаровские чтения 2015 года: экологические проблемы XXI века» (21-22 мая 2015 г., г. Минск, Беларусь); 1-ая Международная конференция «Свободные радикалы в химии и жизни» (25-26 июня 2015 г., г. Минск, Беларусь); Международная научная конференция «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» Двенадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (28-30 июня 2016 г., г. Минск, Беларусь); the 23th Conference on Isoprenoids (September 4-7, 2016, Minsk, Belarus); II Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Международная научная школа «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (26-30 июня 2017 г., г. Уфа, Россия); VI International Conference «Chemistry structure and function of biomolecules» (May 22-25, 2018, Minsk, Belarus); the 24th Conference on Isoprenoids (September 9-12, 2018, Bialystok, Poland).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 22 печатные работы, в том числе 1 глава в монографии, 6 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 4 статьи в материалах конференций, тезисы 11 докладов. Общий объем опубликованных работ составляет 5,8 авторских листа (из них статей в рецензируемых журналах – 3,23 авторских листа).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из оглавления, перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения, библиографического списка и приложения. В главе 1 приводится обзор литературных данных, касающихся структуры брассиностероидов, их противоопухолевых свойств, а также других видов активности в отношении организма млекопитающих. В главе 2 представлено описание экспериментальных методов исследований. В главе 3 – полученные результаты и их обсуждение. Работа изложена на 120 страницах, содержит 29 рисунков, 19 таблиц, 2 схемы и 1 приложение. Список цитируемой литературы

включает 201 ссылку на 17 страницах и 22 ссылки на собственные публикации соискателя.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В главе 1 приведены сведения о химической структуре и химическом разнообразии растительных гормонов – brassinosterоидов, а также об их распространении в растительном царстве. Проведен анализ существующих данных о биологической активности этих соединений за пределами растительного царства. Особенное внимание уделено противоопухолевой активности brassinosterоидов и их способности ингибировать активность ферментов семейства CYP1, участвующих в активации проканцерогенов.

В главе 2 подробно описаны методы исследования, используемые в работе, такие как: культивирование клеток млекопитающих (разморозка, ведение и заморозка клеточной культуры), световая микроскопия, фотометрический метод анализа цитотоксичности химических соединений (МТТ-тест), спектрофлуориметрия и проточная цитометрия, ПЦР в режиме реального времени для анализа экспрессии генов, кодирующих ферменты CYP1A1 и CYP1B1 в клеточной культуре, а также методы определения ферментативной активности CYP1A1 и CYP1B1 в клеточной культуре по анализу флуоресцирующих продуктов реакций, катализируемых данными ферментами (тетролы бенз[а]пирена). Для анализа полученных данных применены методы статистики.

В главе 3 приведены результаты исследования и проведен их анализ.

3.1 Характеристика исследуемых соединений

В работе использовали brassinosterоиды, полученные в лаборатории химии стероидов ИБОХ НАН Беларуси. На рисунке 1 показано, что два из этих соединений – 28-гомокастастерон и (22S,23S)-гомокастастерон – содержат 6-кетофункцию в кольце В стероидного скелета, а соединения 24-эпибрассинолид и (22S,23S)-эпибрассинолид – В-лактонную (6-оксо-7-окса-) группировку. Кроме того, brassinosterоиды отличаются строением боковой цепи. Так, природный 24-эпибрассинолид содержит в положении С-24 метильную группу, в то время как у 28-гомокастастерона в этом положении находится этильный заместитель.

Отличительная особенность синтетических производных 24-эпибрассинолида и 28-гомокастастерона заключалась в S-конфигурации С-22 и С-23 атомов углерода, содержащих гидроксильные группы.

3.2 Антипролиферативная активность исследуемых соединений

Исследованные соединения обладают достоверной антипролиферативной активностью ($p \geq 0,005$) в отношении гормон-независимых клеточных линий карциномы легкого А549 и гепатоцеллюлярной карциномы НерG2, что продемонстрировано на рисунках 2 и 3. В целом, из соединений с

S,S-ориентацией гидроксильных групп в положениях C-22 и C-23, *S*-ГКС оказался наиболее активным в подавлении пролиферации A549 с IC_{50} близкой к 100 мкМ. В более ранних работах было показано, что соединения с 6-кетофункцией проявляют более выраженное цитостатическое влияние, чем соединения с 6-оксо-7-оксафункцией, например, в отношении линий лимфобластной лейкемии (СЕМ, IC_{50} $13 \pm 2,8$ мкМ) и миеломы (RPMI 8226, IC_{50} $26 \pm 1,4$ мкМ).

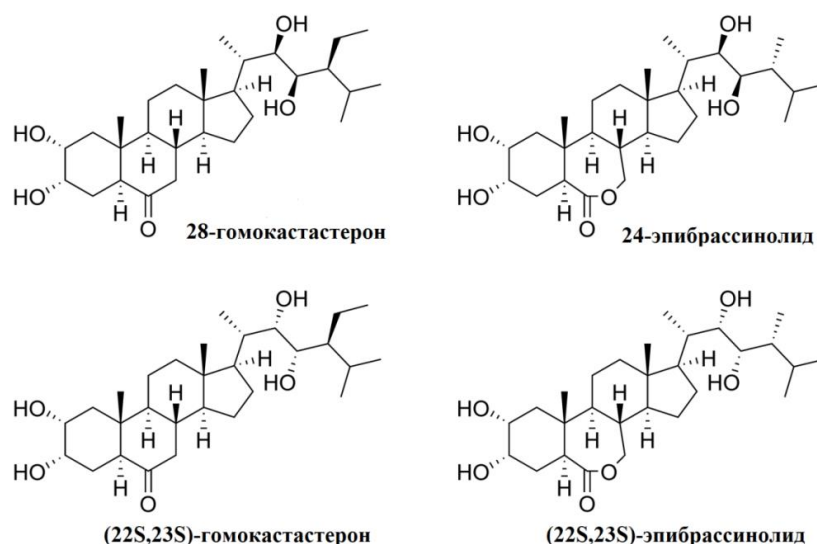


Рисунок 1. – Структура исследуемых соединений

Из соединений с *R,R*-ориентацией заместителей в боковой цепи активность показал ЭБ с IC_{50} 100 мкМ. Наряду с *S*-ГКС антипролиферативная активность при высоких концентрациях (>100 мкМ) наблюдается в случае *S*-ЭБ.

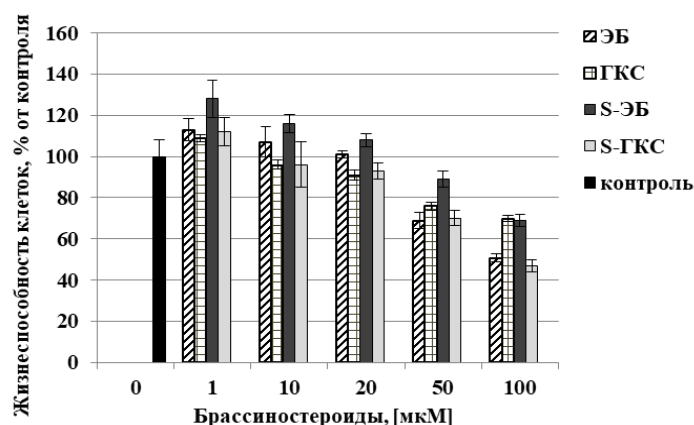


Рисунок 2. – Зависимость влияния брассиностероидов на пролиферацию раковых клеток (линия A549) от концентрации изученных соединений

Линия НерG2 была более чувствительна к действию брассиностероидов. *S*-ГКС в концентрации 50 мкМ ингибировал жизнеспособность НерG2 на 50%, а ЭБ в концентрации 100 мкМ ингибировал жизнеспособность клеток НерG2 на 75 % (рисунок 3).

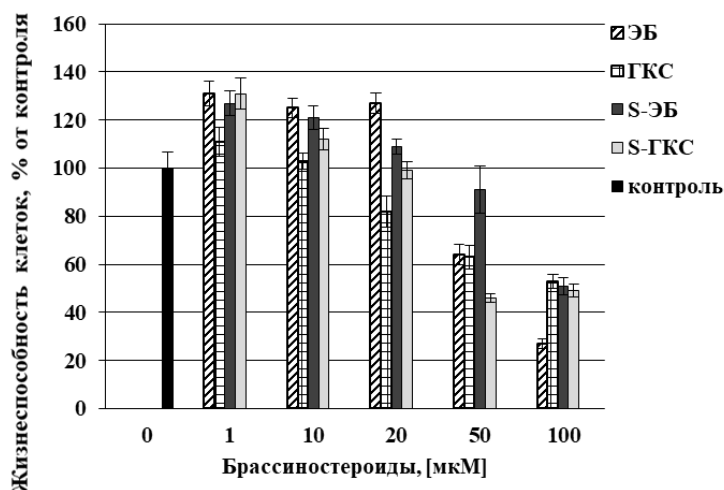


Рисунок 3. – Зависимость влияния браassinостероидов на пролиферацию раковых клеток линии HepG2 от концентрации изученных соединений

Необходимо особо подчеркнуть, что при низких концентрациях исследуемых соединений нами впервые наблюдалась достоверная активация роста клеток. Для большинства изученных веществ значения стимулирующих концентраций лежат в диапазоне 1-10 мкМ, а для отдельных соединений этот интервал еще более широк (до 20 мкМ). Наиболее выраженная стимуляция была характерна для S-ЭБ (рисунок 2 и 3). Сходное действие наблюдалось у эпибрасинолида и гомобрасинолида в отношении гриба *Phytophthora infestans*. В концентрациях 10^{-8} - 10^{-16} М они стимулировали рост мицелия гриба и образование спор, в то время как при концентрации 10^{-5} М эпибрасинолид вызывал лизис зооспор.

3.3 Исследование механизма клеточной гибели опухолевых клеток

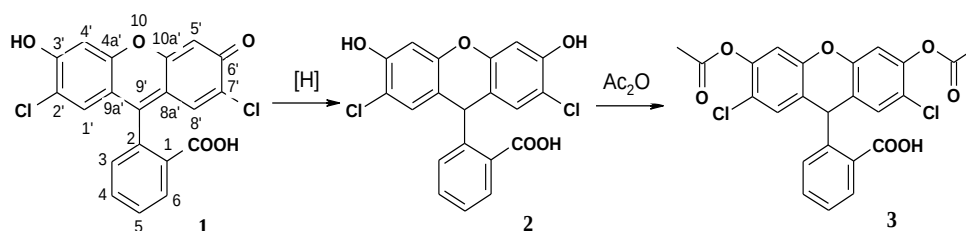
Основываясь на данных о том, что уровень активных форм кислорода (АФК) в опухолях повышен, и его дальнейшее увеличение более опасно для опухолевых клеток, чем для нормальных, что позволяет селективно уничтожать раковые клетки с помощью экзогенного (фармакологического) увеличения АФК в опухолевых клетках, была произведена оценка редокс-статуса опухолевых клеток под действием исследуемых браassinостероидов. В литературе одним из основных методов оценки внутриклеточного уровня АФК является использование флуоресцентного зонда – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата.

3.3.1 Синтез флуоресцентного внутриклеточного зонда для определения уровня АФК

Для анализа редокс-статуса клеток A549 осуществлен синтез (схема 1) DCF-DA **3** из DCF **1** через стадию образования DCFH₂ **2** согласно существующей методике Keston A.S, Brandt R., Anal Biochem., 1965. Структура продуктов

подтверждена с помощью ЯМР-спектроскопии, отсутствие флуоресценции у DCF-DA **3** – с помощью спектрофлуориметрии.

Схема 1



Полученное соединение **3** в концентрации 10 мкМ было использовано для оценки изменения уровня АФК в опухолевых клетках линии A549 (карцинома легкого человека) и hMSC-AT (стволовые клетки из жировой ткани человека) под действием экзогенных индукторов окислительного стресса, таких как пероксид водорода (H_2O_2) и пероксид кумола (ГПК) и показало высокую эффективность при измерении внутриклеточного уровня АФК с помощью спектрофлуориметра во времени и в зависимости от концентрации индуктора окислительного стресса (рисунок 4), а также качественной оценке уровня АФК с помощью флуоресцентной микроскопии (рисунок 5).

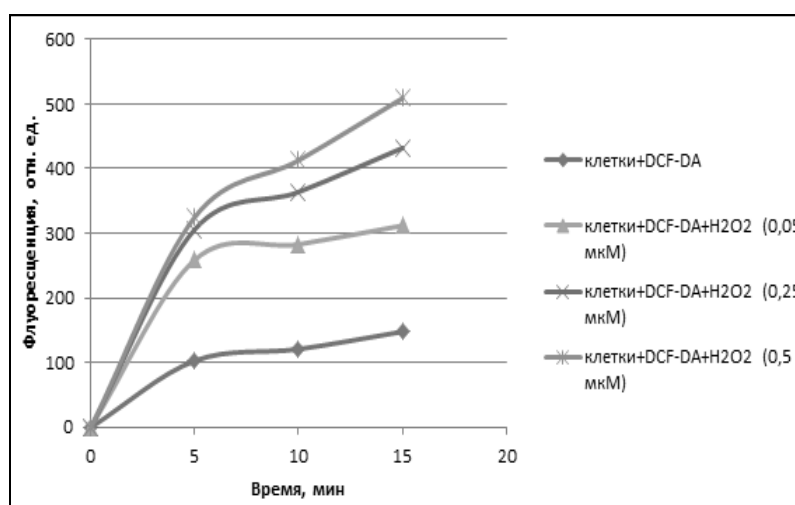
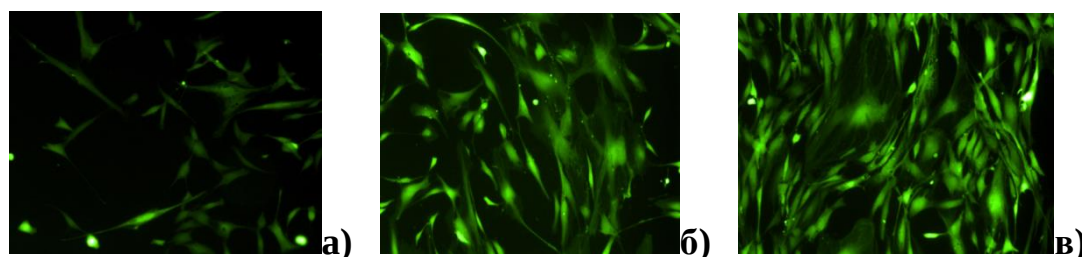
Рисунок 4. – Окисление DCFH₂ под действием АФК в клетках линии A549а) интактные клетки; б) клетки+H₂O₂ (100 мкМ); в) клетки+ГПК (100 мкМ)

Рисунок 5. – Накопление флуоресцентного зонда DCF-DA в клетках hMSC-AT

В работе получены два производных 2',7'-дихлорфлуоресцеина **1**, одно из которых – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат **3** является липофильным, легко проникает в клетку и может быть использовано в качестве флуоресцентного зонда для внутриклеточного определения АФК, другое – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин **2** относительно хорошо растворимо в воде и представляет интерес для характеристики окислительно-восстановительных процессов в водной среде. Соединение **3** может быть использовано в качестве базового компонента для создания нового поколения тест-систем по определению антиоксидантной активности биологически активных соединений на основе клеточной модели. Такие тест-системы могут обладать высокой прогностической значимостью при экстраполяции получаемых данных на целостный организм.

3.3.2 Определение уровня АФК в опухолевых клетках A549 в присутствии брассиностероидов

В настоящей работе впервые показана возможность генерирования АФК в раковой клеточной линии A549 под действием брассиностероидов и их стереоизомеров. На рисунке 6 представлена зависимость среднего значения флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина от концентрации брассиностероидов. Для всех исследованных соединений, кроме ЭБ, максимально эффективная концентрация составила 30 мкМ, дальнейшее увеличение концентрации стероидов приводило либо к стабилизации эффекта (ГКС), либо к его снижению (S-ГКС и S-ЭБ).

Оказываемый эффект зависел от структуры боковой цепи и был более выражен в случае S,S-ориентации гидроксильных групп в положении C-22 и C-23 (S-ГКС). Это соединение обладало и большей антипролиферативной активностью, что позволяет говорить о возможной взаимосвязи между индукцией активированных форм кислорода и цитотоксичностью исследованных веществ.

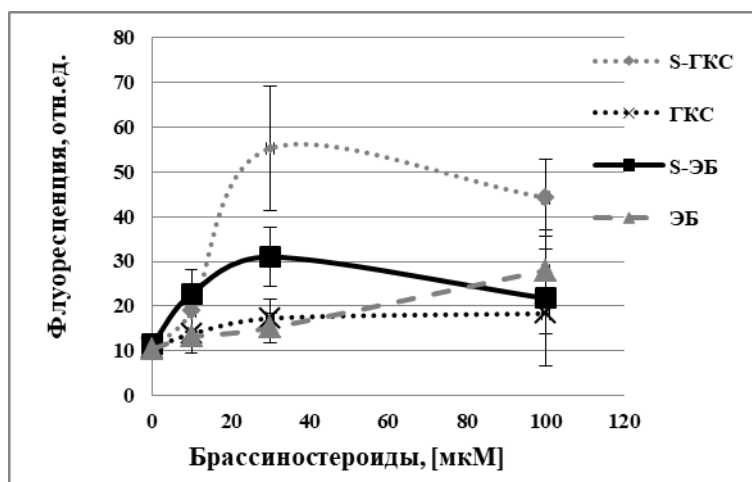


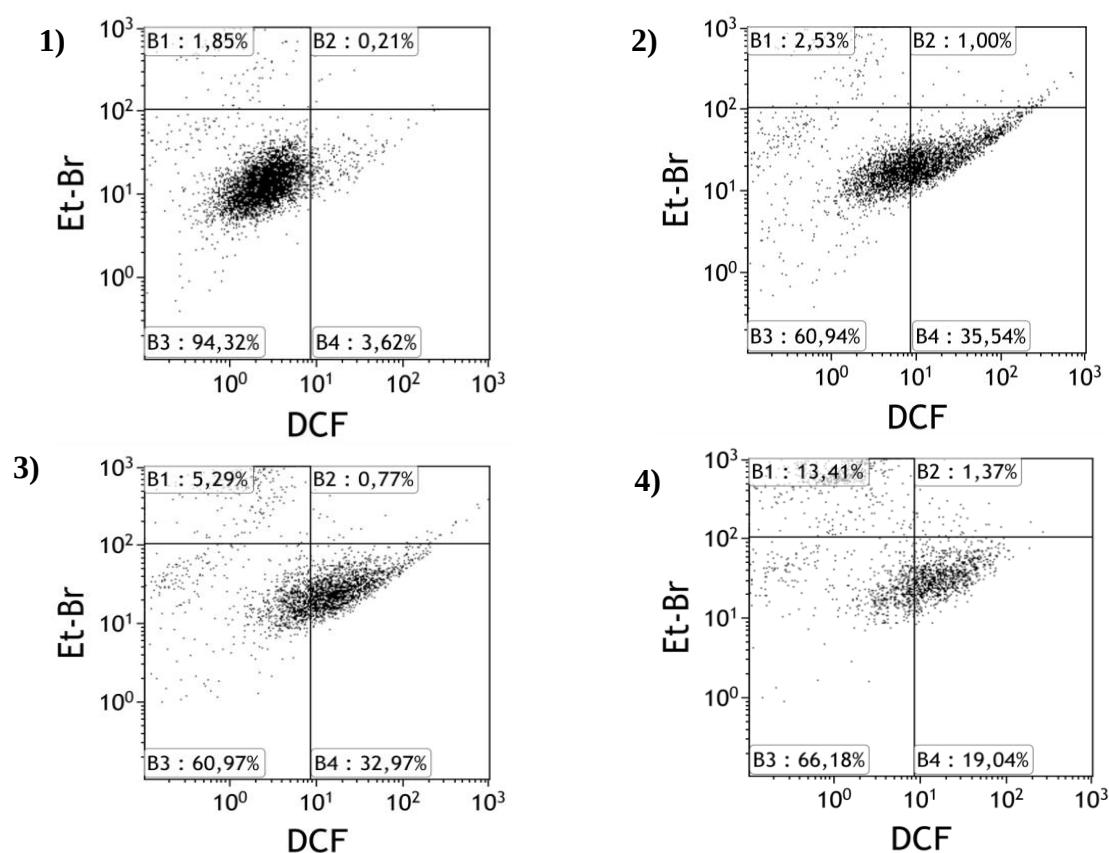
Рисунок 6. – Зависимость средней интенсивности флуоресценции DCF в клетках от концентрации брассиностероидов

Результаты настоящей работы позволяют допустить, что один из путей влияния brassinостероидов на раковые клетки может заключаться в инициировании окислительного стресса, что приводит к гибели последних по АФК-зависимым механизмам.

3.3.3 Исследование взаимосвязи внутриклеточного уровня АФК и жизнеспособности клеток

Для установления взаимосвязи клеточной гибели и увеличения внутриклеточных АФК под действием brassinостероидов был проведен ряд экспериментов с использованием этидий бромид (Et-Br). Известно, что этидий бромид обладает интенсивной флуоресценцией после связывания с ДНК, но не способен проникнуть через мембрану клетки.

Как следует из рисунка 7, при добавлении синтетического конформера природных brassinостероидов – S-ГКС наблюдается прямая корреляция между интенсивностью свечения клеток, вызванного воздействием Et-Br (ось ординат), и уровнем активных форм кислорода, выявляемым по флуоресценции DCF (ось абсцисс). Это обусловлено тем, что повышение уровня АФК приводит постепенному увеличению проницаемости клеточной мембраны для Et-Br, что является признаком некроза.



1 – контроль; 2 – 10 мкМ S-ГКС; 3 – 30 мкМ S-ГКС; 4 – 100 мкМ S-ГКС

Рисунок 7. – Сопоставление гибели клеток и уровня внутриклеточного АФК в раковой клеточной линии A549

В серии дальнейших экспериментов охарактеризован клеточный цикл исследуемой раковой линии и проанализирована зона мелких ядерных телец, характеризующая уровень апоптоза.

Таблица 1. – Влияние brassinosterоидов на клеточный цикл опухолевых клеток А549, 24 часа

Проба	Апоптоз, %	Фаза клеточного цикла		
		G1, %	S, %	G2, %
Контроль	12	53,26	45,08	1,67
ЭБ, 50 мкМ	23	69,82	29,34	0,84
ГКС, 50 мкМ	24	58,23	41,59	0,18
S-ЭБ, 50 мкМ	16	60,53	37,06	2,41
S-ГКС, 50 мкМ	14	60,87	34,82	4,32

Как видно из таблицы 1, уровень апоптоза под действием природных brassinosterоидов увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем, в то время как % апоптоза в присутствии синтетических brassinosterоидов сравним с контрольным. Все brassinosterоиды также снижали уровень клеток в S-фазе и вызывали накопление клеток в G1-фазе, особенно выражено это было в случае ЭБ.

Таким образом, в случае раковой клеточной линии А549 синтетические изомеры brassinosterоидов приводят к увеличению уровня активных форм кислорода и, как следствие, к некротической гибели клеток, в то время как антипролиферативное действие природных brassinosterоидов, скорее всего, обусловлено усилением апоптоза.

3.4 Влияние исследуемых соединений на ферментативную активность CYP1, участвующих в метаболизме канцерогенов

Как было сказано выше, brassinosterоиды сходны по структуре со стероидными гормонами человека, которые являются субстратами ферментов семейства CYP1 и прямо (влияя на скорость реакции) или косвенно (влияя на экспрессию генов и белков CYP1) могут изменять их активность. Так как CYP1 участвуют в активации проканцерогенов эндогенных и экзогенных, метаболизме некоторых лекарств, в том числе и противоопухолевых, представляется важным изучение потенциальных ингибиторов данных ферментов.

3.4.1 Изучение вклада монооксигеназ семейства CYP1 в активацию проканцерогенов на клеточной модели А549

Особый интерес вызывает содержание и каталитическая активность изоформ CYP, локализованных в легких человека (линия А549), поскольку значительная часть загрязнителей окружающей среды поступает в организм

посредством ингаляции и претерпевает окислительную трансформацию непосредственно в этом органе.

Поэтому одной из задач настоящей работы стала оценка вклада монооксигеназной составляющей (CYP1A1 и CYP1B1) в канцерогенную активацию Б[а]П-7,8-диола в раковой клеточной линии A549, а также характеристика влияния на процесс классического индуктора монооксигеназ – 20-метилхолантрена (20-MX).

На первом этапе с помощью ПЦР в режиме реального времени проанализирован уровень экспрессии генов *CYP1B1* и *CYP1A1* в раковой клеточной линии A549 (таблица 2).

Таблица 2. – Результаты оценки уровня экспрессии целевых генов в культуре клеток A549, отн. ед.

Ген	Интактные клетки	Индукция 20-MX
<i>CYP1B1</i>	1,0	1,05
<i>CYP1A1</i>	1,0	1,52

Как видно из таблицы 2, 20-MX приводит к некоторому повышению уровня экспрессии в клетках гена изоэнзимов CYP1, играющих важную роль в биоактивации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами работ, проведенных в других лабораториях, где также в клеточной линии A549 зарегистрировано небольшое, но все же достоверное увеличение уровня экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B1*.

Для количественной оценки монооксигеназной составляющей в трансформации ключевого соединения в процессе канцерогенной активации бенз[а]пирена – Б[а]П-7,8-диола в стандартно культивируемой опухолевой клеточной культуре и при ее экспонировании действию 20-MX было определено количество израсходованного субстрата и содержание обоих продуктов его монооксигеназного окисления – (±)7β,8α-дигидрокси-9α,10α-эпокси-7,8,9,10-тетрагидробенз[а]пирен (ДЭ2) и (±)7β,8α-дигидрокси-9β,10β-эпокси-7,8,9,10-тетрагидробенз[а]пирен (ДЭ1). Полученные данные представлены в таблице 3.

Действие индуктора, в первую очередь, проявляется в отношении каталитической активности клеток A549. Действительно, более чем трехкратное увеличение содержания ДЭ1 и ДЭ2 наблюдается на фоне лишь полуторакратного повышения уровня экспрессии гена *CYP1A1*. Причина подобного поведения системы неясна. Правда, можно предположить, что наряду с индукцией генов гемопротеидов в клеточной культуре происходит повышение уровня экспрессии, необходимого для реализации монооксигеназного процесса

электронотранспортного белка – цитохром- P450-редуктазы, как это наблюдается в гепатоцитах.

Обращает на себя внимание, что эпоксирирование Б[а]П-7,8-диола приводит к преимущественному образованию ДЭ2 «облигатного» канцерогена, содержание которого практически в 5 раз превышает таковое ДЭ1 в отсутствие 20-МХ и более чем в 8 раз в его присутствии.

Из эксперимента следует, что вклад монооксигеназ в окисление ПАУ в клетках А549 составляет лишь 13% (критерий – выход продуктов окисления), что в принципе согласуется с относительно низким уровнем конститутивной экспрессии *CYP1A1* и *CYP1B1*.

Картина существенно меняется при экспонировании клеток действию 20-МХ. Как видно из таблицы 3, в этом случае монооксигеназная составляющая в канцерогенной активации 7,8-Б[а]П-диола достигает уже 25%. Причем практически 90% приходится на долю «облигатного» канцерогена – ДЭ2. Это позволяет полагать, что попадание в организм не одного, а целого пула полициклических ароматических углеводородов может существенным образом влиять не только на уровень, но и на направление канцерогенной активации отдельных представителей ПАУ.

Таблица 3. – Оценка количества израсходованного Б[а]П-7,8-диола и образованных продуктов его монооксигеназного окисления в культуре клеток А549, нмоль

Наименование	Стандартные условия культивирования	Индукция 20-МХ
Б[а]П-7,8-диол	8,62	11,93
ДЭ1	0,18	0,32
ДЭ2	0,83	2,58

3.4.2 Влияние исследуемых соединений на ферментативную активность CYP1, участвующих в метаболизме канцерогенов в клетках карциномы печени

Известно, что экспрессия генов и белков CYP1 широко варьируется в зависимости от типа опухолевой ткани. Эксперименты по определению влияния брассиностероидов на активность CYP1 проводились нами на линии НерG2 (карцинома печени человека), так как печеночная ткань характеризуется заведомо высоким уровнем экспрессии CYP450. И действительно, вклад изоэнзимов CYP1 в окисление бенз[а]пирена в интактных клетках НерG2 составил 22% по сравнению с 13% в интактных клетках А549, а при индукции 2,3,7,8-ТХДД – 61% в клетках НерG2 против 25 % в А549, индуцированных 20-МХ (таблица 3 и 4).

Таблица 4. – Влияние БС на образование генотоксичного продукта ДЭ2 в результате катализируемого CYP1 окисления Б[а]П-7,8-диола в клетках НерG2

Выход продуктов по ходу хроматографии	Контроль	Индукция ТХДД (10 нМ)	Индукция ТХДД (10 нМ)			
			+ЭБ (50 мкМ)	+ ГКС (50 мкМ)	+ S-ЭБ (50 мкМ)	+ S-ГКС (50 мкМ)
Выход продукта* ДЭ2	22%	61%	47%	63%	52%	22%
Выход продуктов окисления ДЭ1+ДЭ2*	88%	98%	91%	99%	84%	62%
Б[а]П-7,8-диол (субстрат)	12%	2%	9%	1%	16%	38%
Соотношение ДЭ2/продукты окисления	0,25	0,62	0,52	0,64	0,62	0,35
Соотношение продукты окисления/субстрат	7,33	49	10,11	99	5,25	1,63

* оценка по общей площади пиков на хроматограмме.

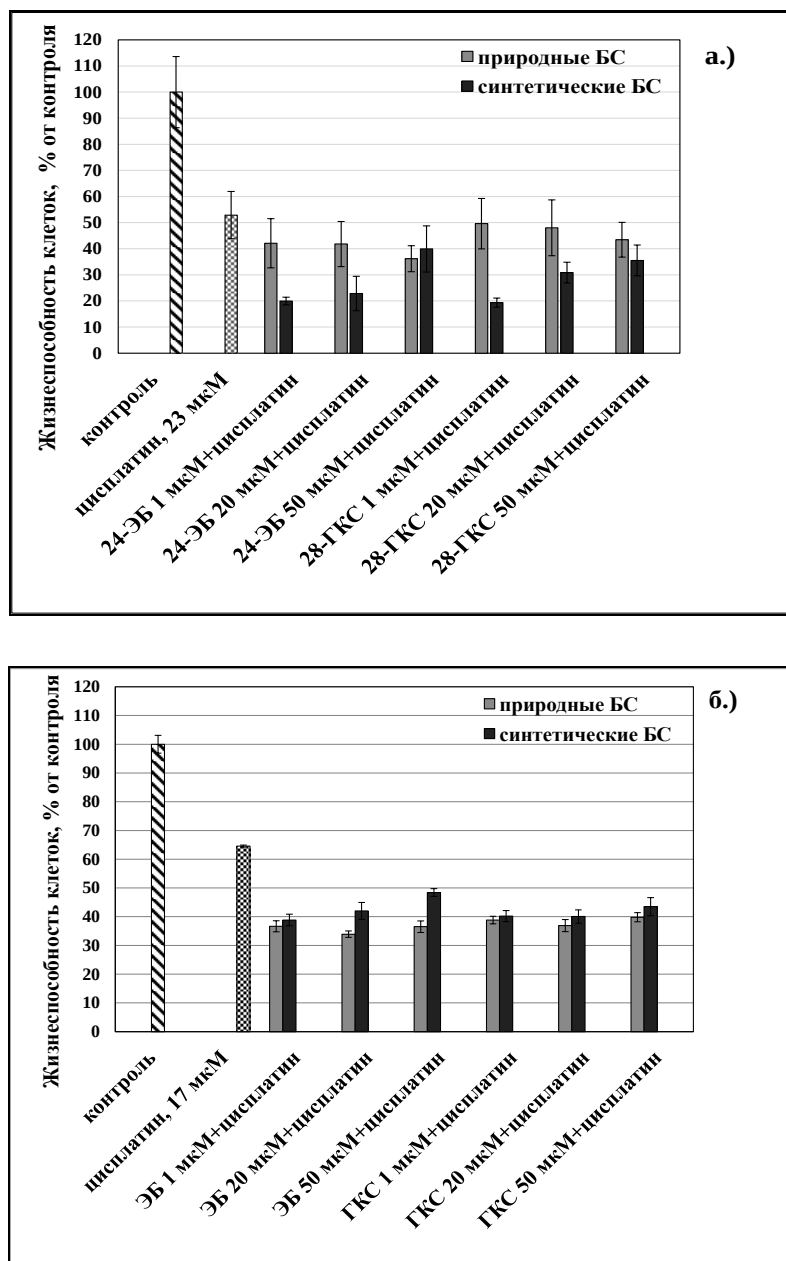
Из полученных результатов следует, что сочетанное действие ксенобиотиков на организм может стимулировать образование канцерогенного диол эпоксида ДЭ2 в тканях печени, что в свою очередь увеличивает риск развития опухоли. Подобный эффект был показан нами ранее на клеточной линии A549, где 20-метилхолантрен также направлял метаболизм бенз[а]пирена в сторону образования диол эпоксида ДЭ2. Это является еще одним подтверждением облигатности его канцерогенного действия.

При оценке ингибиторного потенциала исследуемых в данной работе брассиностероидов в отношении ферментов трансформации проканцерогенов показано, что все они (за исключением ГКС) также ингибировали активность CYP1A1 и CYP1B1. Самым эффективным оказался S-ГКС.

При этом нами выявлена взаимосвязь между ингибированием активности цитохрома P450 брассиностероидами и ингибированием роста опухолевых клеток линии НерG2. Одно из объяснений этого состоит в том, что CYP1A1 экспрессируется во многих опухолевых тканях и способствует прогрессии опухоли через образование канцерогенных продуктов. Это согласуется с литературными данными о том, что ингибирование CYP1A1 приводит к апоптозу опухолевых клеток путём ингибирования белка сурвивина.

3.5 Оценка влияния исследуемых brassinостероидов на потивоопухолевую активность цисплатина

В сочетании с цисплатином как природные, так и синтетические brassиностероиды более эффективно ингибировали рост раковых клеток. В случае brassиностероидов неприродной структуры S-ЭБ и S-ГКС наблюдалась зависимость эффекта от их концентрации (рисунок 8).



а) A549; б) HepG2 (72 часа)

Рисунок 8. – Цитотоксичность комбинаций brassиностероидов с цисплатином для опухолевых клеток

Более эффективными оказались комбинации с низкими концентрациями brassиностероидов. При их концентрации 1 мкМ значение IC_{50} цисплатина

уменьшалось почти в 2 раза. Это наблюдение представляет интерес, поскольку brassinостероиды индивидуально в небольших концентрациях стимулировали рост клеток, а в больших концентрациях (50 мкМ и более) подавляли его. Характерно, что именно концентрация 1 мкМ была стимулирующей для всех изученных brassinостероидов. Объяснить противоположную направленность действия минимальной концентрации стероида для случаев его индивидуального и комбинированного с цисплатином применения представляется возможным, если допустить, что в последнем случае стимуляция роста клеток и увеличение количества ДНК в ходе подготовки клеток к делению делает их более чувствительными к действию экзогенного ингибитора. Применение в этой фазе цитостатика, чьей мишенью в клетке является ДНК, может приводить к ингибированию роста клеточной популяции более эффективному, чем это имеет место при индивидуальном использовании противоопухолевого агента. Полученные результаты согласуются с недавними данными о синергических эффектах 24-эпибрасинолида в сочетании с доксорубцином и этопозидом в отношении роста раковых клеток.

В настоящей работе, используя проточную цитометрию, мы показали, что цисплатин и его комбинации с brassinостероидами уменьшают количество клеток в S-фазе клеточного цикла, что приводит к накоплению клеток в G1-фазе и остановке клеточного деления (таблица 5).

Таблица 5. – Влияние низких концентраций синтетических brassinостероидов и их комбинаций с цисплатином на клеточный цикл A549, 72 часа

Проба	Фаза клеточного цикла		
	G1, %	S, %	G2, %
Контроль	73,64	23,70	2,67
Цисплатин, 23 мкМ	92,68	6,24	1,08
S-ЭБ, 1 мкМ	74,56	24,63	0,81
S-ЭБ, 1 мкМ + цисплатин	97,97	0	2,03
S-ГКС, 1 мкМ	75,76	24,24	0
S-ГКС, 1 мкМ + цисплатин	90,29	9,71	0

Действие цисплатина сопровождается образованием активных форм кислорода. На рисунке 9 показана гистограмма, полученная в результате анализа уровня АФК в клетках A549 в присутствии цисплатина и brassinостероидов, индивидуально и в комбинации. На оси Y отображено количество клеток в пробе с данной интенсивностью флуоресценции, на оси X интенсивность флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF).

Показано, что в контрольных клетках и в клетках, обработанных брассиностероидами в концентрации 1 мкМ, уровень АФК не изменялся (кривые 1-3), в то время как количество живых клеток отличалось: с брассиностероидами оно было больше, чем в контроле.

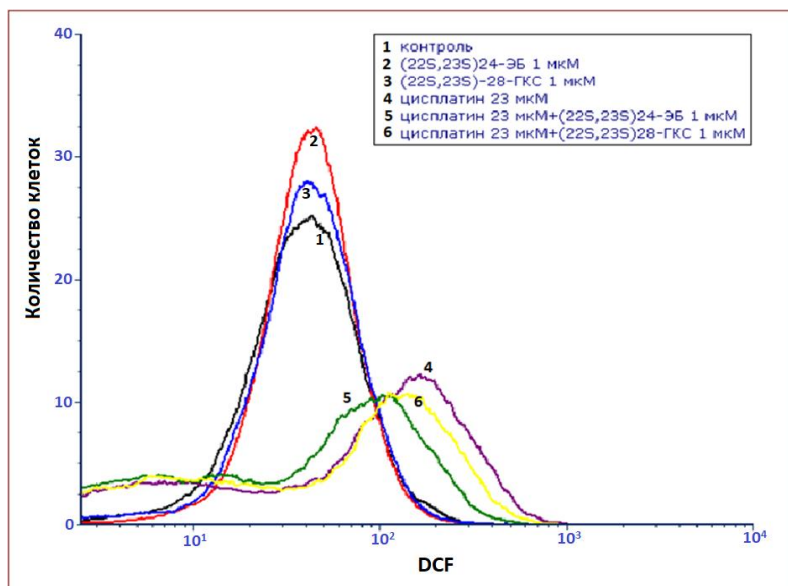


Рисунок 9. – Уровень АФК в клетках A549 под действием цисплатина и комбинаций цисплатина с брассиностероидами

В клетках, обработанных цисплатином, отмечено двукратное повышение внутриклеточных АФК и двукратное снижение количества клеток по сравнению с контролем (кривая 4). В сочетании с брассиностероидами отмечено как снижение уровня АФК, так и снижение количества клеток (кривые 5 и 6 на рисунке 9). Падение интенсивности флуоресценции может быть обусловлено снижением количества живых клеток, т.к. известно, что 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин, взаимодействующий с АФК, образуется из 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата только под действием внутриклеточных эстераз живых клеток.

Биологическая активность брассиностероидов зависит от концентрации, а цисплатин в сочетании с брассиностероидами может быть более эффективен при терапии рака, чем примененный индивидуально. Эта комбинация также может быть полезна для преодоления негативных последствий химиотерапии путем снижения эффективных концентраций цисплатина. Эффект комбинаций цисплатина и брассиностероидов, вероятно, связан с ингибированием роста раковых клеток путем «ареста» клеточного цикла и высоким внутриклеточным уровнем АФК. Взятые вместе эти два процесса могут вызвать апоптоз клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Методом МТТ-теста выявлена цитотоксичность 24-эпибрассинолида (ЭБ), 28-гомокастастерона (ГКС), (22S,23S)-эпибрассинолида (S-ЭБ), (22S,23S)-гомокастастерона (S-ГКС) в отношении гормон-независимых опухолевых клеток A549 и HepG2. Эффект зависит от дозы: при концентрациях 1-10 мкМ исследуемые соединения стимулируют рост опухолевых клеток A549 и HepG2, при концентрациях ≥ 50 мкМ ингибируют. Наиболее активно ингибировали рост клеток карциномы печени и легких S-ГКС и ЭБ [4,6,16-19].

2. С помощью синтезированного внутриклеточного флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата показано, что все изученные соединения увеличивают уровень активных форм кислорода в раковых клетках по сравнению с контролем, причем (22S,23S)-аналоги природных брассиностероидов более активно индуцировали окислительный стресс: в 3 раза в случае S-ЭБ и в 5 раз в случае S-ГКС [1,4,5,8,9,11,12,16-19].

3. Предложен возможный механизм противоопухолевого действия природных брассиностероидов и их стереоизомеров. Природные брассиностероиды ЭБ и ГКС вызывали апоптоз опухолевых клеток, а их синтетические аналоги S-ЭБ и S-ГКС – некроз, что было показано с помощью проточной цитометрии. Уровень апоптоза при обработке ЭБ и ГКС увеличивался в 2 раза по сравнению с контролем, а при обработке S-ЭБ, S-ГКС – не изменялся. ЭБ наиболее активно уменьшал количество клеток в S-фазе, вызывая «арест» клеточного цикла в G1-фазе, результатом чего является апоптотическая гибель клеток. Для аналогов брассиностероидов S-ЭБ и S-ГКС установлена корреляция между увеличением внутриклеточных АФК и жизнеспособностью опухолевых клеток. S-ЭБ и S-ГКС нарушают проницаемость клеточной мембраны, что говорит о гибели клеток по типу некроза [1,5,18-20].

4. Путем оценки уровня экспрессии CYP1 в опухолевых клеточных линиях A549 и HepG2, охарактеризован метаболизм Б[а]П и вклад в него CYP1. Показано, что вклад ферментов CYP1 в окисление Б[а]П в интактных клетках A549 составляет 13%, в индуцированных – 25%, в интактных клетках HepG2 – 22%, в индуцированных – 61%. Установлено, что индукция ферментов CYP1 направляет метаболизм Б[а]П в обеих клеточных линиях в сторону образования «облигатного» канцерогена ДЭ2, указывая на синергизм действия токсикантов в CYP-зависимом канцерогенезе [1,2,5,6,10,13,14].

5. Установлено, что брассиностероиды в первую очередь ингибируют ферменты семейства цитохрома P450, участвующие в метаболической активации проканцерогенных веществ. Максимальным ингибиторным эффектом обладали (22S,23S)-производные: S-ГКС>S-ЭБ>ЭБ>ГКС. Обнаружена взаимосвязь между

ингибированием активности CYP1 брассиностероидами и ингибированием роста опухолевых клеток линии HepG2, что может быть связано с уменьшением образования онкогенных интермедиатов окисляющего действия цитохромов [1,6,15].

6. На моделях опухолевых клеточных линий HepG2 и A549 показано, что брассиностероиды в сочетании с цисплатином повышают эффективность последнего, причем в случае низких концентраций S-ЭБ, S-ГКС этот эффект более выражен [1,7,21,22].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Охарактеризованные взаимосвязи между структурой брассиностероидов и их противоопухолевыми свойствами могут составить основу для получения противоопухолевых препаратов нового поколения с низкой токсичностью и высокой эффективностью.

S-ГКС и ЭБ могут быть отобраны для углубленных исследований противоопухолевой активности *in vivo* на животных.

В сочетании с брассиностероидами «классический» химиотерапевтик цисплатин может быть более эффективен при терапии рака, чем примененный индивидуально. Преимущество этих комбинаций может заключаться также в преодолении побочных эффектов химиотерапии путем снижения эффективных доз цисплатина.

Разработанный подход для оценки уровня активных форм кислорода внутри клетки под действием 2',7'-дихлордигидрофлуорецеин диацетата может быть использован для характеристики окислительно-восстановительного статуса интактных клеток и под действием индукторов окислительного стресса.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс УО «Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова» БГУ (акт о внедрении от 31.05.2016 г.).

Список публикаций соискателя

Глава в монографии:

1. **Panibrat, O.V.** Anticancer Potential of Brassinosteroids / **O.V. Panibrat, V.N. Zhabinskii, V.A. Khripach** // *Brassinosteroids: Plant Growth and Development* / edited by Hayat S. [et al.]. – Springer, 2019. – Ch. 14. – P. 389–406.

Статьи в рецензируемых научных журналах:

2. Комплексный характер влияния полициклических ароматических углеводородов на метаболические процессы как важный фактор, определяющий особенности их канцерогенной активации / А.Г. Сыса, **О.В. Панибрат**, А.С. Бабенко, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, П.А. Киселёв // Доклады НАН Беларуси. – 2014. – Т. 58, № 1. – С. 53–56.

3. Оценка уровня экспрессии и каталитической активности изоэнзимов цитохрома P450 в опухолевой клеточной линии A549 / А.Г. Сыса, **О.В. Панибрат**, А.С. Бабенко, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, П.А. Киселёв // Известия НАН Беларуси. Серия химических наук. – 2014. – № 3. – С. 74–79.

4. Окислительный стресс как один из возможных путей антиракового действия брассиностероидов / П.А. Киселев, **О.В. Панибрат**, А.Г. Сыса, М.В. Анисович, В.Н. Жабинский, В.А. Хрипач // Доклады НАН Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 2. – С. 73–77.

5. Flow-cytometric analysis of reactive oxygen species in cancer cells under treatment with brassinosteroids / Petr A. Kiselev, **Olesya V. Panibrat**, Aliaksei R. Sysa, Marina V. Anisovich, Vladimir N. Zhabinskii, Vladimir A. Khripach // Steroids. – 2017. – Vol. 117. – P. 11–15.

6. Анतिकанцерогенная активность брассиностероидов в опухолевых клетках карциномы печени / **О.В. Панибрат**, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, В.Н. Жабинский, П.А. Киселёв // Доклады НАН Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 66–72.

7. **Панибрат, О.В.** Влияние комбинации цисплатина с брассиностероидами на рост раковых клеток / О.В. Панибрат, В.Н. Жабинский, В.А. Хрипач // Доклады НАН Беларуси. – 2019. – Т. 63, № 4. – С. 437–444.

Статьи в сборниках:

8. Синтез и характеристика взаимодействия 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата с пероксидами / **О.В. Панибрат**, С.В. Адамчик, М.А. Кисель, П.А. Киселёв // Химические реактивы, реагенты и процессы малотонажной химии: сб. науч. трудов / Нац. акад. наук Беларуси, Институт химии новых материалов; науч. ред. В.Е. Агабеков [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2013. – С. 70–75.

9. Характеристика внутриклеточного уровня активных форм кислорода в опухолевых и стволовых клетках / **О.В. Панибрат**, С.В. Адамчик, М.А. Кисель, П.А. Киселёв // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: Материалы XI Междунар. конф., Минск, 17-18 мая 2013 г. / БГУ; редкол.: В.А. Прокашева (отв. ред.) [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2013. – С. 214–216.

10. Проканцерогенная активация эндогенных физиологически активных веществ и возможные пути ее минимизации / П.А. Киселев, Д. Шварц, Н.А. Бовдей, **О.В. Панибрат**, Л.В. Гончарова, Е.В. Спиридович, В.-Х. Шунк, И. Роотс // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: Материалы XI Междунар. конф., Минск, 17-18 мая 2013 г. / БГУ; редкол.: В.А. Прокашева (отв. ред.) [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2013. – С. 156–158.

11. Климович, Е.Н. Активные формы кислорода в монооксигеназном процессе и окислительном стрессе / Е.Н. Климович, **О.В. Панибрат**,

П.А. Киселев // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; Одиннадцатый съезд Белорус. общест. об-ния фотобиологов и биофизиков, Минск, 17-20 июня 2014 г.: сб. ст. в 2 ч. Ч. 2 / БГУ; редкол.: И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2014. – С. 185–187.

Тезисы докладов:

12. **Панибрат, О.В.** Сравнительная оценка влияния уровня окислительного стресса на адгезию и пролиферацию стволовых и раковых клеток человека и поиск путей его регуляции / **О.В. Панибрат**, П.А. Киселёв // Сахаровские чтения 2013 года: экологические проблемы XXI века: материалы 13-й междунар. науч. конф., Минск, 16-17 мая 2013 г. / МГЭУ им. А.Д. Сахарова; под ред. С.П. Кундаса [и др.]. – Минск: МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2013 – С. 129.

13. Оценка вклада монооксигеназ в канцерогенную активацию бензо (а) пирен-7,8-диола в опухолевой клеточной линии А549 / **О.В. Панибрат**, А.Г. Сыса, А.С. Бабенко, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, П.А. Киселёв // Ломоносов-2014: XXI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых; секция «Биология»: тез. докл., Москва, 7-11 апреля 2014 г. / МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет; сост. Е.В. Ворцепнева. – М.: Издательство Московского университета, 2014. – С. 62–63.

14. Оценка вклада монооксигеназ в канцерогенную активацию бензо (а) пирен-7,8-диола и влияния на нее кверцетина в опухолевой клеточной линии А549 / **О.В. Панибрат**, А.Г. Сыса, А.С. Бабенко, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, П.А. Киселев // Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века: материалы 14-й междунар. науч. конф., Минск, 29-30 мая 2014 г. / МГЭУ им. А.Д. Сахарова; под ред. В.И. Дуная [и др.]. – Минск: МГЭУ им. А.Д.Сахарова, 2014. – С. 103–104.

15. Оценка влияния некоторых фитостероидов на канцерогенную активацию полиароматических углеводов в опухолевой клеточной линии А549 (рак легкого) / А.Г. Сыса, **О.В. Панибрат**, П.С. Шабуня, С.А. Фатыхова, П.А. Киселев, В.А. Хрипач // V Международная научная конференция «Химия, структура и функция биомолекул»: сборник материалов; Минск, 4-6 июня 2014 г. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси. – Минск: Издательство «Белорусский Дом печати», 2014. – С. 177–178.

16. Влияние 24-эпибрассинолида, 28-гомобрассинолида и их синтетических производных на пролиферацию и развитие окислительного стресса в опухолевой клеточной линии А549 (карцинома легкого) / **О.В. Панибрат**, П.А. Киселев, В.Н. Жабинский, М.В. Анисович, В.А. Хрипач // Сахаровские чтения 2015 года: экологические проблемы XXI века: материалы 15-й междунар. науч. конф., Минск, 21-22 мая 2015 г. / МГЭУ им. А.Д. Сахарова; под ред. С.С. Позняка [и др.]. – Минск: МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 2015. – С. 88.

17. Влияние 24-эпибрасинолида, 28-гомобрасинолида и их синтетических производных на уровень окислительного стресса в опухолевой клеточной линии A549 (карцинома легкого) / **О.В. Панибрат**, П.А. Киселев, В.Н. Жабинский, М.В. Анисович, В.А. Хрипач // Свободные радикалы в химии и жизни: сб. тез. докл. Междунар. конф., Минск, 25-26 июня 2015 г. / БГУ; под общ. ред. О.И. Шадыро [и др.] – Минск: Изд. Центр БГУ, 2015. – С. 127–128.

18. **Панибрат, О.В.** Противоопухолевая активность брасиностероидов как результат повышения внутриклеточного уровня активных форм кислорода / О.В. Панибрат, П.А. Киселев // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф.; Двенадцатый съезд Беларус. общест. об-ния фотобиологов и биофизиков, Минск, 28-30 июня 2016 г.: сб. ст.: в 2 ч. / БГУ; редкол.: И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск: изд. Центр БГУ, 2016. – Ч. 2 – С. 274–277.

19. Effects of 24-epibrassinolide, 28-homocastasterone and their synthetic derivatives on the viability of cancer cell line A549 (lung carcinoma) and elucidation of the mechanism of their action / **O.V. Panibrat**, P. Kisselev, A.R. Sysa, and M.V. Anisovich // 23rd Conference on Isoprenoids: Abstract Book, Minsk, 4-7 September 2016. / IBOCH; edited by Vladimir Khripach and Vladimir Zhabinskii. – Minsk, 2016. – P. 101.

20. **Панибрат, О.В.** Брасиностероиды и уровень активных форм кислорода в раковых клетках / О.В. Панибрат // Материалы II Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Международной научной школы «Роль активных форм кислорода в жизни растений», Уфа, 26 июня-1 июля 2017 г. / Ин-т биохимии и генетики УНЦ РАН; редкол.: И.В. Максимов [и др.]. — Уфа, ООО «Первая типография», 2017. – С. 382–386.

21. **Panibrat, O.V.** The effects of cisplatin-brassinosteroid combination on the growth of A549 cancer cell line / **O.V. Panibrat**, V.N. Zhabinskii, V.A. Khripach // Book of abstracts of the VI International Conference “Chemistry structure and function of biomolecules” Minsk, May 22-25, 2018. / IBOCH. –Minsk, 2018. – P. 54–55.

22. **Panibrat, O.V.** Study of the effects of brassinosteroids in combination with cisplatin on cancer cell growth / **O.V. Panibrat**, V.N. Zhabinskii, V.A. Khripach // Book of abstracts of the 24th Conference on Isoprenoids Bialystok, September 9-12, 2018. / University of Bialystok. – Bialystok, 2018 – P. 103.

РЕЗЮМЕ

Панибрат Олеся Владимировна

Природные и синтетические brassinosterоиды как противоопухолевые агенты

Ключевые слова: brassinosterоиды, противоопухолевая активность, активные формы кислорода, 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат, клеточный цикл, апоптоз, цитохром P450, полиароматические углеводороды, цисплатин.

Цель работы: выявление противоопухолевой активности и возможных механизмов противоопухолевого действия природных brassinosterоидов эпибрасинолида и гомокастастерона, а также их стереоизомеров (22S,23S)-эпибрасинолида и (22S,23S)-гомокастастерона в отношении гормон-независимых опухолевых клеточных линий.

Методы исследования: культивирование клеточных линий, фотометрия, флуориметрия, МТТ-тест, проточная цитометрия, химический синтез, ВЭЖХ, RT-ПЦР.

Полученные результаты и их новизна: выявлена способность brassinosterоидов стимулировать пролиферацию опухолевых клеток при низких концентрациях (до 10 мкМ) и ингибировать при высоких концентрациях (≥ 50 мкМ).

Впервые на моделях опухолевых клеточных линий человека показано влияние brassinosterоидов на внутриклеточный уровень активных форм кислорода.

Выявлен механизм клеточной гибели для природных brassinosterоидов и их стереоизомеров.

Показано структурозависимое ингибирующее действие brassinosterоидов на активность CYP1, а также образование из бенз[а]пирен-7,8-диола «облигатного» канцерогена ($\pm$)7 β ,8 α -дигидрокси-9 α ,10 α -эпокси-7,8,9,10-тетрагидробенз[а]пирена.

Впервые обнаружена способность brassinosterоидов повышать противоопухолевую активность «классического» цитостатика цисплатина.

Рекомендации по использованию: полученные результаты вносят вклад в лучшее понимание механизма противоопухолевого действия brassinosterоидов с различной химической и пространственной структурой в отношении гормон-независимых опухолевых клеток и могут служить основой для целенаправленного поиска и создания новых противоопухолевых препаратов.

Область применения: биохимия, биоорганическая химия, медицина, фармация, клеточная биология.

РЭЗЮМЭ

Панібрат Алеся Уладзіміраўна

Прыродныя і сінтэтычныя брасінастэроіды як супрацьракавыя агенты

Ключавыя словы: брасінастэроіды, супрацьракавая актыўнасць, актыўныя формы кіслароду, 2',7'-дзіхлордзігідрафлуарэсцэін дзіацэтат, клетачны цыкл, апаптоз, цытахром P450, поліараматычныя вуглевадароды, цысплацін.

Мэта работы: вывучэнне супрацьракавай актыўнасці і магчымых механізмаў супрацьракавага дзеяння прыродных брасінастэроідаў эпібрасіналіда і гомакастэрона, а таксама іх стэрэаізамераў (22S,23S)-эпібрасіналіда і (22S,23S)-гомакастэрона ў дачыненні гармон-незалежных ракавых клетачных ліній.

Метады даследавання: культываванне клетачных ліній, фотаметрыя, флуарыметрыя, МТТ-тэст, ВЭВХ, RT-ПЦР, хімічны сінтэз, праточная цытаметрыя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: выяўлена здольнасць брасінастэроідаў стымуляваць праліферацыю ракавых клетак пры нізкіх канцэнтрацыях (да 10 мкМ) і інгібіраваць пры высокіх канцэнтрацыях (≥ 50 мкМ).

Упершыню на мадэлях ракавых клетачных ліній чалавека паказаны ўплыў брасінастэроідаў на ўнутрыклетачны ўзровень актыўных формаў кіслароду.

Выяўлены механізм клетачнай гібелі для прыродных брасінастэроідаў і іх стэрэаізамераў.

Паказана залежнае ад структуры інгібіруючае дзеянне брасінастэроідаў на актыўнасць CYP1, а таксама ўтварэнне з бенз[а]пірэна-7,8-дзіола «аблігатнага» канцэрагена ($\pm$)7 β ,8 α -дзігідроксі-9 α ,10 α -эпоксі-7,8,9,10-тетрагідрабенз[а]пірэна.

Упершыню выяўлена здольнасць брасінастэроідаў павышаць супрацьракавую актыўнасць «класічнага» цытастатыка цысплаціна.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя вынікі ўносяць уклад у лепшае разуменне механізмаў гібелі гармон-незалежных ракавых клетак, выкліканай брасінастэроідамі з рознай хімічнай і прасторавай структурай і могуць служыць асновай для мэтанакіраванага пошука і стварэння новых супрацьракавых прэпаратаў.

Галіна выкарыстання: біяхімія, біяарганічная хімія, медыцына, фармацыя, клетачная біялогія.

SUMMARY

Panibrat Alesia

Natural and synthetic brassinosteroids as anticancer agents

Key words: brassinosteroids, anticancer activity, reactive oxygen species, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, cell cycle, apoptosis, cytochrome P450, induction of cytochrome P450, polyaromatic hydrocarbons, cisplatin.

Purpose of the work: to study the anticancer activity and possible mechanisms of the anticancer action of natural brassinosteroids epibrassinolide and homocastasterone, as well as their stereoisomers (22S,23S)-epibrassinolide and (22S,23S)-homocastasterone in relation to hormone-independent cancer cell lines.

Research methods: cell culture, photometry, fluorimetry, MTT-test, HPLC, RT-PCR, chemical synthesis, flow cytometry.

The results obtained and their novelty: in the work, the effect of brassinosteroids to stimulate the proliferation of tumor cells at low concentrations $<10 \mu\text{M}$ and to inhibit at high concentrations $\geq 50 \mu\text{M}$ was revealed.

For the first time in human cancer cells, the effect of brassinosteroids on the intracellular level of reactive oxygen species has been shown.

The mechanism of cell death for natural brassinosteroids and their stereoisomers was revealed.

A structure-dependent inhibitory effect of brassinosteroids on CYP1 activity was shown, as well as the formation of the obligate carcinogen of benzo[a]pyrene-7,8-diol – ($\pm$)7 β ,8 α -dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrabenzo[a]pyrene.

For the first time, the ability of brassinosteroids, to increase the antitumor activity of the classical cytostatic cisplatin was discovered.

Recommendations for use: the obtained results contribute to a better understanding of the mechanisms of death of hormone-independent cancer cells caused by brassinosteroids with different chemical and spatial structures and can serve as a basis for a targeted search and creation of new anticancer drugs and more effective combinations with existing ones.

Fields of application: biochemistry, bioorganic chemistry, medicine, pharmacy, cell biology.

