

Клеточные, геномные и транскриптомные эффекты вторичных метаболитов Белокопытника гибридного на клеточную линию HeLa

Е. Ю. Златник¹, Я. С. Енин^{1✉}, О. Н. Буров², Е. С. Бондаренко¹, А. Б. Сагакянц¹, Д. С. Кутилин¹,
Ю. В. Дзигунова², И. А. Новикова¹, Ю. В. Пржедецкий¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ Dendro51@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Оценить клеточные, геномные (копийность генов) и транскриптомные (экспрессия генов) эффекты вторичных метаболитов *P. hybridus* (L.) при их воздействии на клеточную линию HeLa.

Материалы и методы. Выделение вторичных метаболитов из растительного материала и его идентификацию проводили методом препаративной хроматографии, определение состава – с помощью масс-спектрометрического анализа, окончательную верификацию структурных формул – методом ядерно-магнитного резонанса на кафедре природных соединений химического факультета ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет». Следующую часть исследования выполняли с использованием культуральных и молекулярных методов. Культивирование HeLa проводили в стандартных условиях в среде MEM. При достижении 75–80 % уровня конfluence заменяли питательную среду с внесением исследуемых соединений (в концентрации 4 мкг/мл) и культивировали 72 ч. Смертность клеток определяли на счетчике NanoEnTek JuliFI (Корея) в присутствии 0,4 % трипанового синего. Оценку апоптоза после воздействия вторичных метаболитов проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II с помощью FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. Оценку уровня копийности и экспрессии генов, ответственных за апоптоз, выполняли методом цифровой полимеразной цепной реакции (ПЦР) (DD-PCR).

Результаты. Были выделены и верифицированы следующие соединения, которым для упрощения использования в эксперименте были присвоены порядковые номера: № 2 – 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one, № 3 – 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde, № 5.3 – 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde *P. hybridus* (L.). На этапе оценки клеточной гибели было обнаружено, что наибольший эффект достигается у соединения под порядковым № 2. Однако оценка показателей копийности и экспрессии генов *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *BAX*, *BCL2*, *TP53*, *MDM2*, *CDKN1B*, *CDK1*, *CCND1*, *CCND3* и *RB1* методом DD-PCR выявила наличие инициации апоптоза в опухолевых клетках на молекулярном уровне под действием соединений под № 2 и № 5.3, полученных из *P. hybridus* (L.).

Заключение. Получены результаты разнонаправленного характера. Из всех использованных в эксперименте соединений выраженный цитостатический эффект выявлен только у соединения 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one. В то же время при использовании соединения 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde выявлено увеличение экспрессии генов *CASP3*, *CASP8*, *TP53*, *BAX*.

Ключевые слова: вторичные метаболиты растений, апоптоз, экспрессия генов, копийность генов, клеточная линия HeLa, цифровая капельная ПЦР

Для цитирования: Златник Е. Ю., Енин Я. С., Буров О. Н., Бондаренко Е. С., Сагакянц А. Б., Кутилин Д. С., Дзигунова Ю. В., Новикова И. А., Пржедецкий Ю. В. Клеточные, геномные и транскриптомные эффекты вторичных метаболитов Белокопытника гибридного на клеточную линию HeLa. Южно-Российский онкологический журнал. 2024; 5(3): 50-63. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2024-5-3-5>, <https://elibrary.ru/koukit>

Для корреспонденции: Енин Ярослав Сергеевич – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,

г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Адрес: 344037, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, д. 63

E-mail: Dendro51@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4572-1579>

SPIN: 7683-2286, AuthorID: 840050

Scopus Author ID: 57196464479

Финансирование: финансирование данной работы не проводилось. Работа выполнена с использованием научного оборудования ЦКП ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации: <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>

Конфликт интересов: все авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

Статья поступила в редакцию 19.06.2024; одобрена после рецензирования 07.08.2024; принята к публикации 25.08.2024

© Златник Е. Ю., Енин Я. С., Буров О. Н., Бондаренко Е. С., Сагакянц А. Б., Кутилин Д. С., Дзигунова Ю. В., Новикова И. А., Пржедецкий Ю. В., 2024

Cellular, genomic and transcriptomic effects of secondary metabolites of the Hybrid Butterbur on the HeLa cell line

E. Yu. Zlatnik¹, Ya. S. Enin^{1✉}, O. N. Burov², E. S. Bondarenko¹, A. B. Sagakyants¹, D. S. Kutilin¹, Yu. V. Dzigunova², I. A. Novikova¹, Yu. V. Przhedetskiy¹

¹ National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

² Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ Dendro51@yandex.ru

ABSTRACT

Purpose of the study. To evaluate the cellular, genomic (gene copy number) and transcriptomic (gene expression) effects of *Phybridus* (L.) secondary metabolites when they affect the HeLa cell line.

Materials and methods. The isolation of secondary metabolites from plant material and its identification were carried out by preparative chromatography. The composition was determined using mass spectrometric analysis, and the final verification of structural formulas was carried out by nuclear magnetic resonance at the Department of Natural Compounds, the Faculty of Chemistry of the Southern Federal University. The subsequent phase of the study was conducted using both cultural and molecular methods. HeLa cells were cultivated under standard conditions in a MEM medium. Once the confluence level was reached 75–80 %, the nutrient medium was replaced with the introduction of the studied compounds (at a concentration of 4 micrograms/ml) and cultivated for 72 hours. Cell mortality was determined using a NanoEnTek JuliFI counter (Korea) in the presence of 0.4 % trypan blue. The assessment of apoptosis following secondary metabolite exposure was conducted on a BD FACSCanto II flow cytometer using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. The level of replication and expression of the genes responsible for apoptosis was assessed by digital droplet PCR (ddPCR).

Results. The following compounds were isolated and verified, and were assigned the following sequence numbers to facilitate their use in the experiment: No. 2 – 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one, No. 3 – 5-(hydroxymethyl) furan-2-carbaldehyde, No. 5.3 – 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde, *P. hybridus* (L.) At the stage of cell death assessment, it was found that the greatest effect was achieved in the compound under ordinal No. 2. However, the evaluation of the copy number and expression of the *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *BAX*, *BCL2*, *TP53*, *MDM2*, *CDKN1B*, *CDK1*, *CCND1*, *CCND3*, and *RB1* genes by DD-PCR revealed the presence of apoptosis initiation in tumor cells at the molecular level under the action of compounds No. 2 and No. 5.3 obtained from *P. hybridus* (L.).

Conclusion. The outcomes were multifaceted. Only compound 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one exhibited a pronounced cytostatic effect out of all compounds utilized in the experiment. Concurrently, the compound 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde was found to induce an increase in the expression of the *CASP3*, *CASP8*, *TP53*, and *BAX* genes.

Keywords: secondary plant metabolites, apoptosis, gene expression, copy number variation, HeLa cell line, digital droplet PCR

For citation: Zlatnik E. Yu., Enin Ya. S., Burov O. N., Bondarenko E. S., Sagakyants A. B., Kutilin D. S., Dzigunova Yu. V., Novikova I. A., Przhedetskiy Yu. V. Cellular, genomic and transcriptomic effects of secondary metabolites of the Hybrid Butterbur on the HeLa cell line. South Russian Journal of Cancer. 2024; 5(3): 50-63. (In Russ.). <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2024-5-3-5>, <https://elibrary.ru/koukit>

For correspondence: Yaroslav S. Enin – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Oncology, National Medical Research Centre for Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Address: 63 14 line str., Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

E-mail: Dendro51@yandex.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4572-1579>

SPIN: 7683-2286, AuthorID: 840050

Scopus Author ID: 57196464479

Funding: this work was not funded. The work was performed with scientific equipment provided by the Central Research Institute of the National Medical Research Center for Oncology: <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>

Conflict of interest: the authors declare that there are no obvious and potential conflicts of interest associated with the publication of this article

The article was submitted 19.06.2024; approved after reviewing 07.08.2024; accepted for publication 25.08.2024

ВВЕДЕНИЕ

Рак шейки матки (РШМ) является одной из основных причин женской смертности. Каждый год выявляют более 528 тыс. новых случаев РШМ и более 266 тыс. летальных исходов от этого заболевания [1, 2]. Клеточная линия HeLa представляет из себя очень удобный и простой объект для проведения модельных экспериментов в условиях *in vitro*. Данная клеточная линия была получена 8 февраля 1951 г. из опухоли шейки матки пациентки по имени Генриетта Лакс в больнице Балтимора [3]. В нашем исследовании мы использовали эту клеточную линию для оценки цитотоксического эффекта полученных нами органических соединений растительного происхождения.

Растения синтезируют огромное количество вторичных метаболитов, и фактически именно эти метаболиты составляют основу многих коммерческих фармацевтических препаратов, а также растительных лекарственных средств. Многие вторичные метаболиты, такие как алкалоиды, терпеноиды и фенилпропаноиды, рассматриваются для разработки лекарств [4].

Вторичные метаболиты растений представляют собой структурно разнообразные соединения, которые не принимают непосредственного участия в росте, развитии и размножении растений, а чаще выполняют защитную функцию. Эти соединения с различной химической структурой могут действовать как потенциальные многоцелевые противоопухолевые средства [5]. Впервые в истории термин вторичных метаболитов был предложен немецким биологом Альбрехтом Кёсселем в 1891 г., когда он прочел лекцию «О химическом составе клеток» для Берлинского общества физиологов, в которой говорил: «Я предлагаю называть соединения, имеющие важность для каждой клетки, первичными, а соединения, не присутствующие в любой растительной клетке – вторичными» [6]. В настоящее время вторичные метаболиты растений разделяются на несколько крупных групп. Терпеноиды (изопреноиды) охватывают более 40 000 структур и образуют самый большой класс всех известных растительных метаболитов. Представляют собой класс углеводов – продуктов биосинтеза общей формулы $(C_5H_8)_n$, с углеродным скелетом, являющимся производным изопрена $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$. Алкалоиды характеризуются как гетероциклические соединения, содержащие в гетероцикле молекулу азота и насчитывающие 21 000 соединений. Фенольные соединения – это ароматиче-

ские соединения с бензольным кольцом, содержащие по меньшей мере одну гидроксильную группу [7].

Вид, выбранный в нашей работе для выделения вторичных метаболитов – Белокопытник гибридный *Petasites hybridus* (L.) Gaertn., B. Mey. & Scherb – это травянистое многолетнее растение семейства астровые (*Asteraceae*), встречающееся на европейской территории России и, в частности, в Краснодарском крае и Республике Адыгея. Причины интереса к данному виду состоят в том, что различные представители рода белокопытник *Petasites*, включая и сам *P. hybridus* (L.) содержат соединения, обладающие цитотоксическим действием на опухолевые клетки различных нозологий [8]. Так в Белокопытнике японском *Petasites japonicus* (Siebold & Zucc.) Maxim. были обнаружены сесквитерпен I и сесквитерпен II, которые показали цитотоксический эффект в отношении как опухолевых клеток астроцитомы человека U-251MG, так и клеточной линии MDA-MB-231 рака молочной железы [9].

Для изучения влияния вторичных метаболитов растений на опухолевые клетки применяются различные методические подходы, включая цитометрию и проточную цитофлюориметрию, модельные эксперименты на клеточных культурах и молекулярно-генетические исследования. К последним относится оценка уровня копийности и экспрессии генов. Копийность (CNV, copy number variation) – разновидность генетического полиморфизма, приводящая к изменению числа определенных генетических локусов и, как следствие, изменению экспрессии этих генов и их продуктов – белков и некодирующих РНК [10]. Исследования влияния вторичных метаболитов растений на экспрессию и копийность генетических локусов, регулирующих апоптоз и клеточный цикл при раке шейки матки, в настоящее время немногочисленны, поэтому этот аспект требует дополнительного изучения. Этому и посвящена данная работа.

Цель исследования: оценить клеточные, геномные (копийность генов) и транскриптомные (экспрессия генов) эффекты вторичных метаболитов *P. hybridus* (L.) при их воздействии на клеточную линию HeLa.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракция метаболитов. Первичный растительный материал собирали и определяли при участии сотрудников кафедры ботаники академии биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского,

ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет». Экстракцию и верификацию вторичных метаболитов *P. hybridus* (L.) осуществляли сотрудники кафедры природных и высокомолекулярных соединений химического факультета ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет». В качестве растворителя для первичной экстракции был использован тетрахлорэтилен, которым заливались механически очищенные и измельченные корневища.

Процесс первичной экстракции продолжали в течение четырех месяцев. Для извлечения тетрахлорэтилена из растительного материала применяли метод декантации, с последующей концентрацией раствора путем отгонки растворителя в перегонной установке. В качестве сольвента был использован тетрахлорэтилен для уменьшения количества полярных соединений (моно- и дисахариды, аминсахара и др.). Следующим этапом было разделение полученного концентрированного раствора при помощи колоночной хроматографии с использованием силикагеля в качестве сорбента на колонке 20*2. Использовались различные элюенты: сначала тетрахлорэтилен, что позволило получить 10 фракций различного цвета, от бесцветного до светло-желтого. Затем применялся хлористый метилен, давший еще 10 фракций. После этого элюент был изменен, и колонка была заполнена смесью хлористого метилена и спирта в соотношении 10/1, что привело к получению еще двух фракций. Все фракции подвергались концентрации методом упаривания на ротационном испарителе.

Для идентификации выделенных соединений применялся метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-детектированием. Масс-спектры анализировались с использованием библиотеки NIST 2011, содержащей данные по алкалоидам и другим биологически активным соединениям.

Из дальнейшей работы были исключены фракции, содержащие высшие жирные кислоты, азотистые основания нуклеиновых кислот и их гликозидов. Далее проводили дополнительную очистку выделенных ранее фракций методом колоночной хроматографии и производилась идентификация очищенных соединений методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР ¹H). Идентификация очищенных фракций методом ЯМР позволила определить чистоту и подтвердить структуру соединений, ранее предположенных методом хроматографии с масс-детектированием. Для упрощения использования в эксперименте выделенным соединениям были присвоены следующие порядковые номера: № 2 – 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one, № 3 – 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde, № 5.3 – 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde (рис. 1).

Оценка биологического действия. Оценку биологического действия выделенных соединений проводили на клеточной линии HeLa CCL2. Клеточная линия была получена из биобанка ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, который работает в соответствии с рекомендациями по организации структуры биорепозитория и этическими требованиями последнего издания «Передовых практик ISBER»

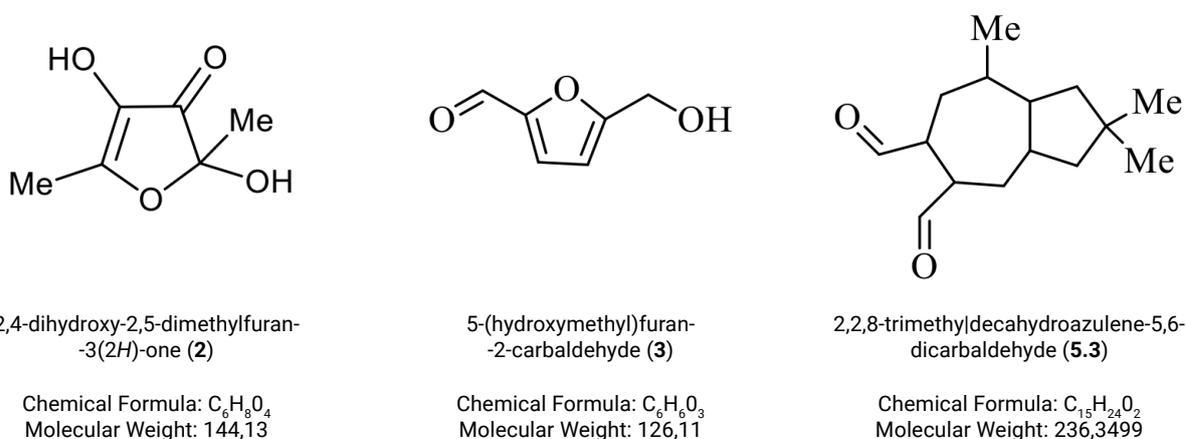


Рис. 1. Структурные формулы трех соединений, выделенных из Белокопытника гибридного *P. hybridus* (L.)

и на основе стандарта ISO 9001 [11]. Клетки культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в питательной среде Игла MEM (БиолоТ), содержащей 10 % фетальную сыворотку коров (HyClone, США), до количества 1 × 10⁶ клеток. При достижении конfluence 80 % питательную среду заменяли на аналогичную с внесением 4 мкг/мл производных фурфуrolа и азулена в опытные образцы, и без добавления исследуемых веществ в отрицательном контроле. Время экспозиции составляло 72 часа. После чего клетки снимались с культуральных флаконов 0,1 % раствором трипсина. Определение количества живых и мертвых клеток проводили на автоматическом счетчике NanoEnTek JuliFI (Корея) с окрашиванием 0,4 % трипановым синим. Снятые с культуральных флаконов клетки консервировали в РНК-среде (IntactRNA Евrogen). Клеточный апоптоз оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II с помощью набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I. Клетки, сохраненные в РНК среде, делились на две равные аликвоты, из которых экстрагировали суммарные препараты ДНК/РНК с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-В» и Тризола соответственно.

Молекулярные методы. Оценка показателей копийности и экспрессии проводили методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора «QX200™ ddPCR™ EvaGreen Supermix» (Bio-Rad, USA). Система капельной цифровой ПЦР Droplet Digital (ddPCR™) была разработана для высокоточного абсолютного количественного анализа целевых последовательностей нуклеиновых кислот, инкапсулированных в дискретные капли водно-масляной эмульсии, определяемые волюмометрическим методом. С помощью генератора капель каждый образец

исследуемого локуса в трех повторах был разделен на 20 000 капель. Амплификацию проводили до конечной точки (составляла 40 циклов) на термоциклере C1000 Touch Thermal Cycler Bio-Rad.

После завершения амплификации плашка с образцами помещалась ридер QX200 Bio-Rad, который осуществлял подсчет капель, дающих флуоресцентные положительные и отрицательные сигналы, для расчета концентрации целевой ДНК и кДНК. Принцип измерения уровня показателей копийности и экспрессии с помощью технологии цифровой капельной ПЦР заключался в прямом подсчете событий по каналу FAM. В положительных каплях, содержащих как минимум одну копию ДНК-мишени, считыватель капель показывает флуоресценцию в отличие от отрицательных капель, в которых не происходило амплификации. Программное обеспечение QuantaSoft v1.7.4 измеряет количество положительных и отрицательных капель в каждом образце, а затем применяет алгоритм вычисления функции распределения Пуассона для определения начальной концентрации целевых молекул ДНК в единицах «копий/мкл» (рис. 2).

Расчет уровня копийности и экспрессии производился следующим образом. По формуле концентрация каждого исследуемого локуса / концентрация референсного локуса × число копий референсных локусов в геноме (как правило 2).

Статистическая обработка данных была проведена с использованием программы Statistica 19.0 (StatSoft Inc., США). Для оценки значимости различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (критический уровень статистической значимости $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования была проведена очистка и верификация соединений, которые могут проявлять цитотоксическое действие на опухолевые клетки различных нозологий. Идентификация выделенных соединений была выполнена методами масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса (ЯМР); в ходе нее был верифицирован 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one, которому был присвоен порядковый номер 2,5-(hydroxymethyl) furan-2-carbaldehyde под порядковым номером 3, а также 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde под порядковым номером 5.3. Все три соединения выделены из корневищ *P. hybridus* (L.). Данные,

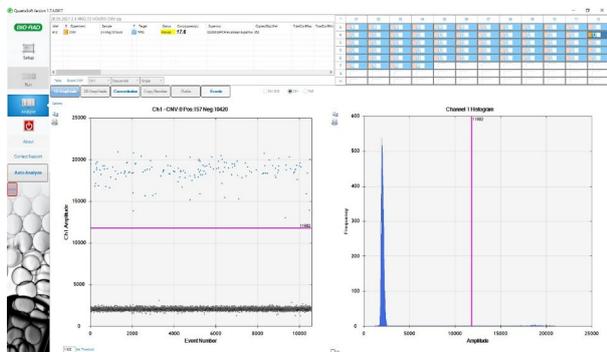


Рис. 2. Скриншот программного обеспечения QuantaSoft v1.7.4 во время обработки результатов

полученные при оценке цитотоксического действия участвующих в эксперименте соединений на счетчике клеток NanoEnTek JuliFI, представлены в табл. 1.

Как видно из представленных в табл. 1 данных, все соединения по результатам теста трепанового синего оказали примерно равнозначный эффект на опухолевые клетки HeLa; в опытных пробах количество погибших клеток превышало контроль в 1,97–2,44 раза. На представленных ниже снимках, полученных с помощью инвертированного микроскопа (Leica DM IL LED) приводится сравнение контрольной пробы клеточной линии HeLa с пробой, обработанной соединением № 2. После воздействия видно нарушение монослоя в опытной пробе, связанное с более слабым прикреплением клеток либо с ее лизисом, наблюдается «ошаривание» большого количества клеток (рис. 3).

Следующие снимки показывают эффект, достигнутый при воздействии соединения № 3 в сравнении с контролем, наблюдается плотный монослой клеток, в то же время большое количество ошаривающихся клеток (рис. 4).

На рисунке 5 представлено сравнение контроля клеток линии HeLa с клетками, которые были подвержены воздействию соединения 5.3, в опытной пробе отмечается плотный монослой клеток и увеличение количества ошаривающихся клеток, которое превышает наблюдаемое в контроле.

Результаты оценки противоопухолевого воздействия использованных нами метаболитов также подтверждаются данными проточной цитофлуориметрии, представленными ниже.

Наиболее выраженное цитотоксическое действие показал (2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one) под № 2 в концентрации 4 мкг/мл при экспозиции 72 ч. Остальные использованные соединения не обладали таким действием по данным проточной цитофлуориметрии (рис. 6–8, табл. 2).

Как видно из рисунка 6, 72-часовая инкубация с (2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one) оказало

цитостатический эффект на клетки линии HeLa, выражающийся в повышении количества клеток в состоянии раннего апоптоза с 7,2 до 13,3 %, а позднего апоптоза – с 5,8 до 8,3 %. Суммарное количество клеток в состоянии апоптоза после воздействия (2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one) повышается в 1,6 раза.

Исходя из данных на рис. 7, следует, что 72-часовая инкубация с 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde не оказала цитотоксического эффекта на клетки линии HeLa, разница с контролем в раннем апоптозе изменилась с 7,2 до 7,3 %, а позднего апоптоза – с 5,8 до 6,2 %. Суммарное количество клеток в состоянии апоптоза после воздействия 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde повышается в 0,5 раз.

Рис. 8 демонстрирует, что 72-часовая инкубация с 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde также не оказала цитотоксического эффекта на клетки линии HeLa, разница с контролем в раннем апоптозе изменилась с 7,2 до 7,5 %, а позднего апоптоза – с 5,8 до 6,8 %. Суммарное количество клеток культуры в состоянии апоптоза после воздействия 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde повышается в 1,3 раза.

Методом цифровой капельной ПЦР были оценены изменения показателей копийности и экспрессии (CNV/EXP) под воздействием выделенных нами вторичных метаболитов из *P. hybridus* (L.). При воздействии 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde в концентрации 4 мкг/мл экспозиция 72 ч. наблюдались увеличения уровня экспрессии *CASP3* по отношению к контролю в 28,28 раз ($p < 0,05$), а *CASP8* в 46,71 раз ($p < 0,05$). В то же время экспрессия локуса *CASP9* увеличилась в 3,43 раза ($p < 0,05$). Воздействии 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde в концентрации 4 мкг/л и экспозиции 72 ч. оказало следующий эффект, уровень экспрессии *CASP3* относительно контроля увеличился в 4,57 раза

Таблица 1. Количество живых и мертвых клеток линии HeLa после воздействия выделенными вторичными метаболитами после окраски трипановым синим

Соединение, концентрации	72 часа, живые клетки	72 часа, мертвые клетки
Контроль	93,52 %	6,48 %
№ 2, 4 мкг/мл	87,23 %	12,77 %
№ 3, 4 мкг/мл	86,66 %	13,34 %
№ 5.3, 4 мкг/мл	84,16 %	15,84 %

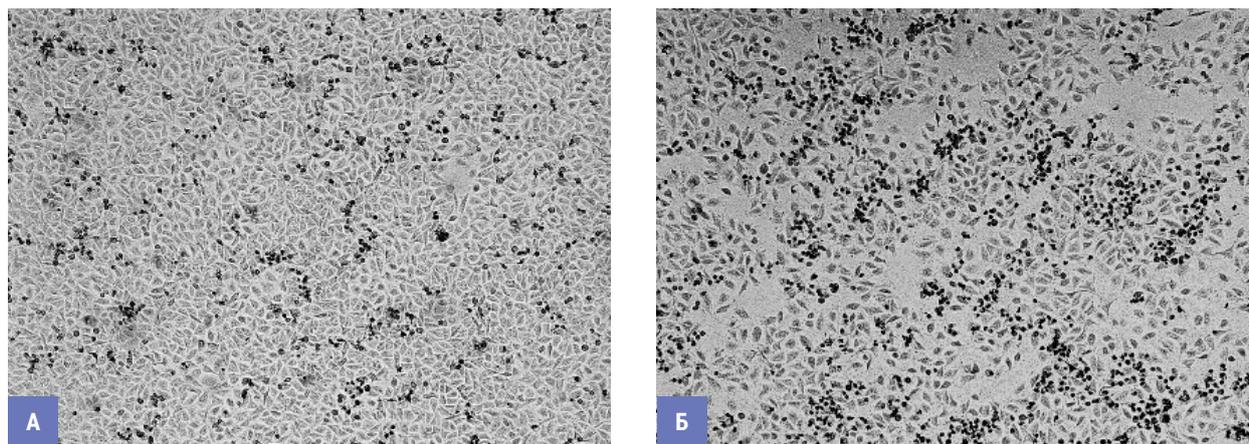


Рис. 3. Клетки HeLa после воздействия 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one. А – контроль; Б – опыт

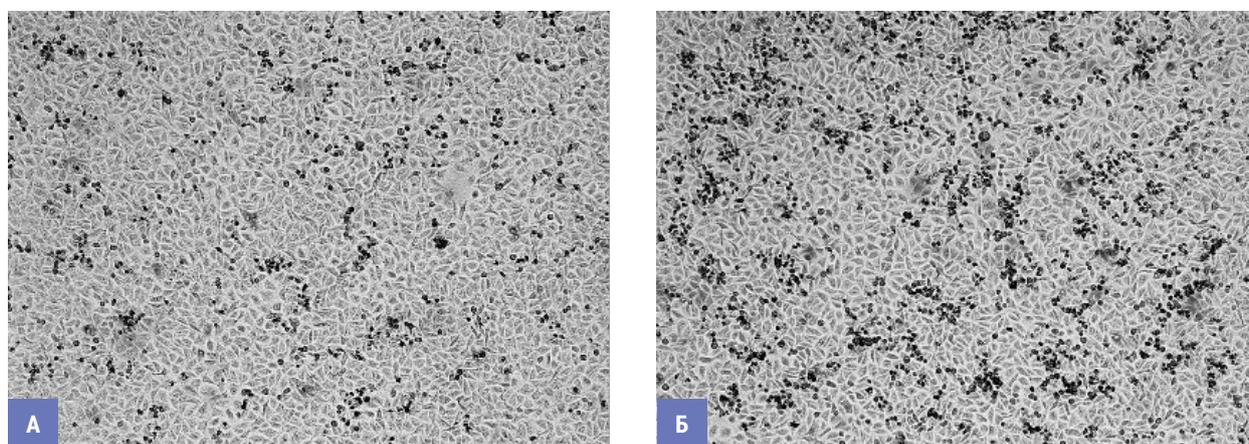


Рис. 4. Клетки HeLa при воздействии трепеноидом 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde. А – контроль; Б – опыт

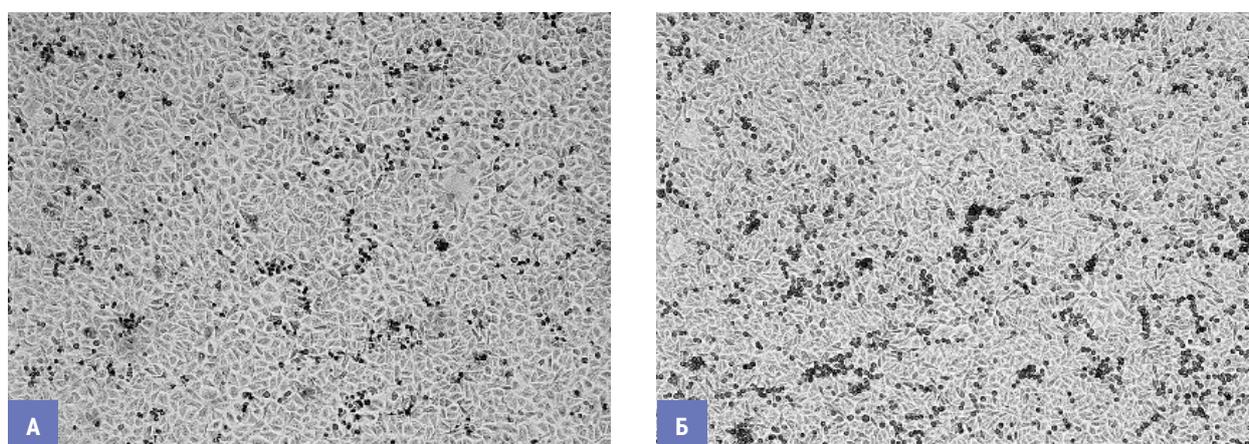


Рис. 5. Клетки HeLa после инкубации с трепеноидом 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde. А – контроль; Б – опыт

($p < 0,05$), он также увеличил уровень экспрессии *CASP8* в 10,48 раз ($p < 0,05$). При использовании 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one в концентрации 4 мкг/мл экспозиция 72 ч. экспрессия локуса *CASP3* относительно контроля увеличилась в 3,95 раза ($p < 0,05$), а *CASP8* в 3,38 раза ($p < 0,05$). При этом показатели уровня копийности (CNV) локусов *CASP8*, *CASP9*, *CASP3* не претерпевали серьезных изменений (рис. 9).

В то же время оценка изменения уровней копийности (CNV) и экспрессии (EXP) на локусы *TP53* и *MDM2* показала следующие результаты. Соединение 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde при экспозиции 72 часа и концентрации 4 мкг/мл увеличило уровень копийности *TP53* в 1,05 раза ($p < 0,05$), а *MDM2* снизило в 0,26 раза ($p < 0,05$) относительно контроля. Разница между ними составила 4 раза. Кроме того,

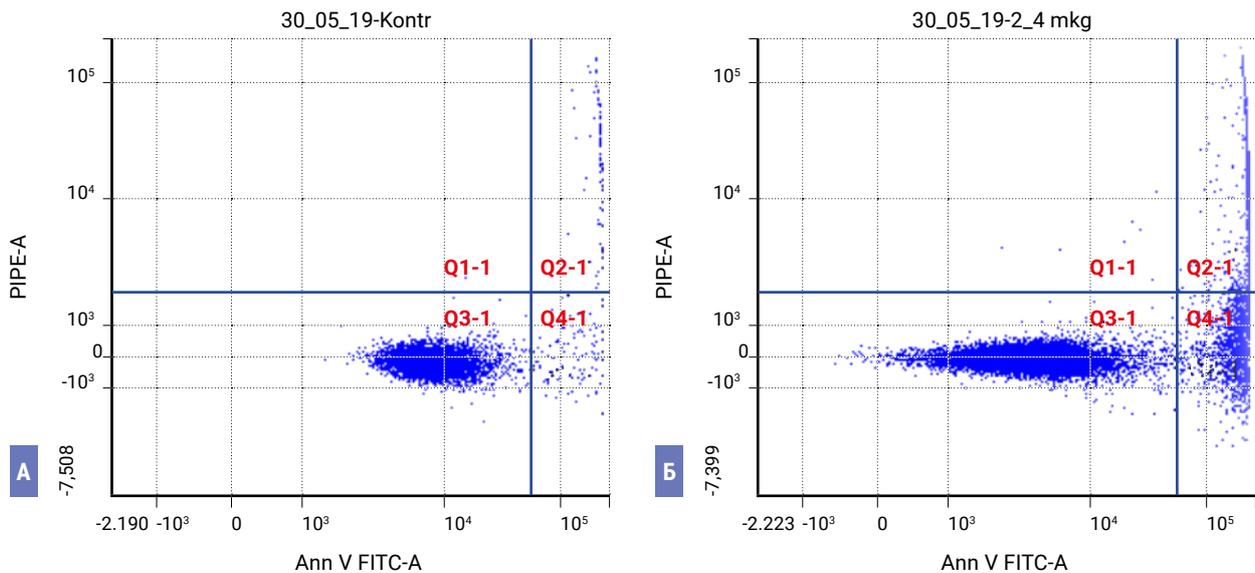


Рис. 6. Воздействие (2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one) на некроз/апоптоз клеточной линии HeLa: А – контроль; Б – опыт, (Q3-1 – живые клетки, Q4-1 – ранний апоптоз, Q2-1 – поздний апоптоз/некроз, Q1-1 – мертвые клетки)

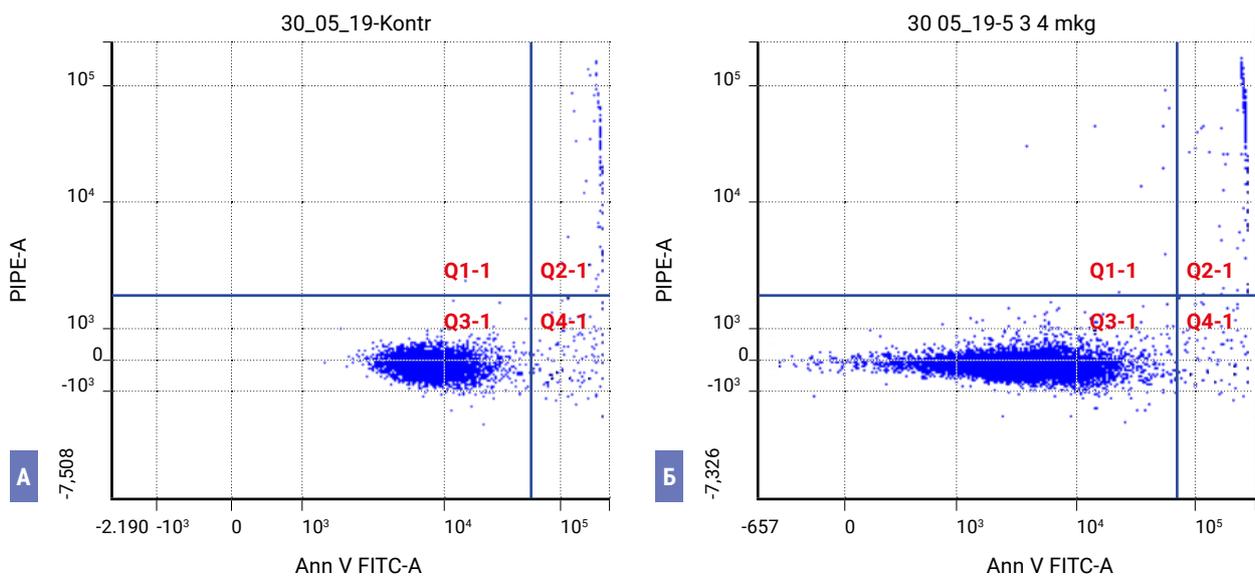


Рис. 7. Воздействие 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde на некроз/апоптоз клеточной линии HeLa: А – контроль; Б – опыт, (Q3-1 – живые клетки, Q4-1 – ранний апоптоз, Q2-1 – поздний апоптоз/некроз, Q1-1 – мертвые клетки)

2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one при экспозиции 72 ч. и концентрации 4 мкг/мл увеличил уровень экспрессии *TP53* в 1,46 раза ($p < 0,05$), *MDM2* при этом снизился в 0,88 раза ($p < 0,05$). Разница составила 1,66 раза (рис. 10).

При оценке изменения уровня копийности и экспрессии локусов *BAX* и *BCL2* были получены следующие данные. Терпеноид 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde увеличивал уровень копийности локуса *BAX* в 0,9 раз относительно контроля ($p < 0,05$), уровень *BCL2* снижался в 0,13 раз ($p < 0,05$). Разница между ними составила 6,92 раза. Также при воздействии этого же соединения увеличивался уровень экспрессии *BAX* в 1,73 раза ($p < 0,05$), а *BCL2* снижался в 1,19 раза ($p < 0,05$). Разница между ними составила 1,45 раза в пользу увеличения *BAX* (рис. 11).

Примененные в нашем исследовании производные фурана и азулена метаболиты *P. hybridus* (L.)

следующим образом изменили уровень копийности и экспрессии локусов *CDKN1B*, *CDK1*, *CCND1*, *CCND3* и *RB1*. Так 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde при экспозиции 72 часа и концентрации 4 мкг/мл увеличил экспрессию *CCND3* относительно контроля в 20,66 раза ($p < 0,05$), экспрессия *RB1* увеличилась в 7,35 раза ($p < 0,05$). В свою очередь 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde с экспозицией 72 ч. и концентрацией 4 мкг/мл также увеличил уровень экспрессии *CCND3* в 5,23 раза ($p < 0,05$). В то же время 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one при аналогичных концентрации и экспозиции увеличил уровень копийности *CCND3* в 3,48 раза ($p < 0,05$), а уровень экспрессии увеличился в 2,42 раза относительно контроля ($p < 0,05$). При этом 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one в точке 4 мкг/мл с экспозицией 72 ч. увеличил уровень экспрессии локуса *RB1* относительно контроля в 4,51 раза ($p < 0,05$) (рис. 12).

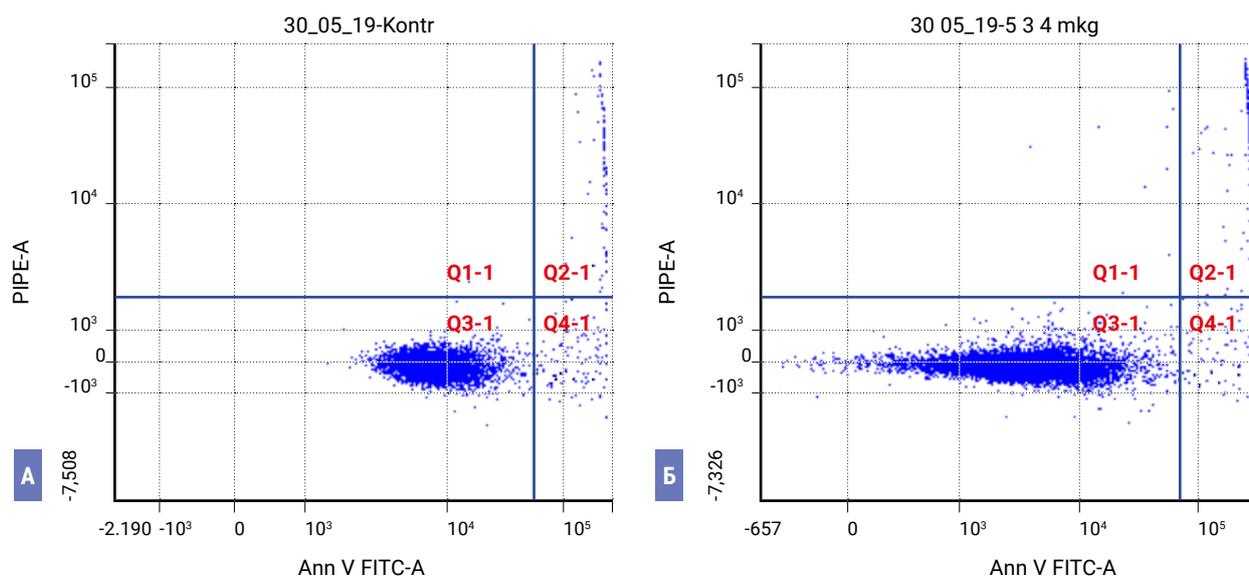


Рис. 8. Воздействие 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde на некроз/апоптоз клеточной линии HeLa: А – контроль; Б – опыт, (Q3-1 – живые клетки, Q4-1 – ранний апоптоз, Q2-1 – поздний апоптоз/некроз, Q1-1 – мертвые клетки)

Таблица 2. Количество клеток линии HeLa в состоянии апоптоза после воздействия выделенными вторичными метаболитами (экспозиция 72 часа)

Соединение	Концентрация, мкг/мл	Живые клетки Q3-1	Ранний апоптоз Q4-1	Поздний апоптоз / некроз Q2-1	Мертвые клетки Q1-1
Контроль		87,0 %	7,2 %	5,8 %	0 %
№ 2	4	78,3 %	13,3 %	8,3 %	0 %
№ 3	4	91,1 %	2,5 %	6,3 %	0 %
№ 5.3	4	94,2 %	2,6 %	3,2 %	0 %

ОБСУЖДЕНИЕ

С начала 2000-х годов во всем мире публикуется множество работ по поиску новых соединений природного происхождения, в том числе растительного, обладающих цитостатическим либо цитотоксическим действием на опухолевые клетки различных нозологий [12]. В нашей работе

мы провели не только модельный эксперимент по оценке уровня цитотоксического эффекта полученных нами вторичных метаболитов *P. hybridus* (L.), но и применили метод цифровой капельной ПЦР для регистрации молекулярно-генетических изменений локусов, отвечающих за супрессию опухолевого роста и апоптоз в опухолевых клетках линии HeLa.

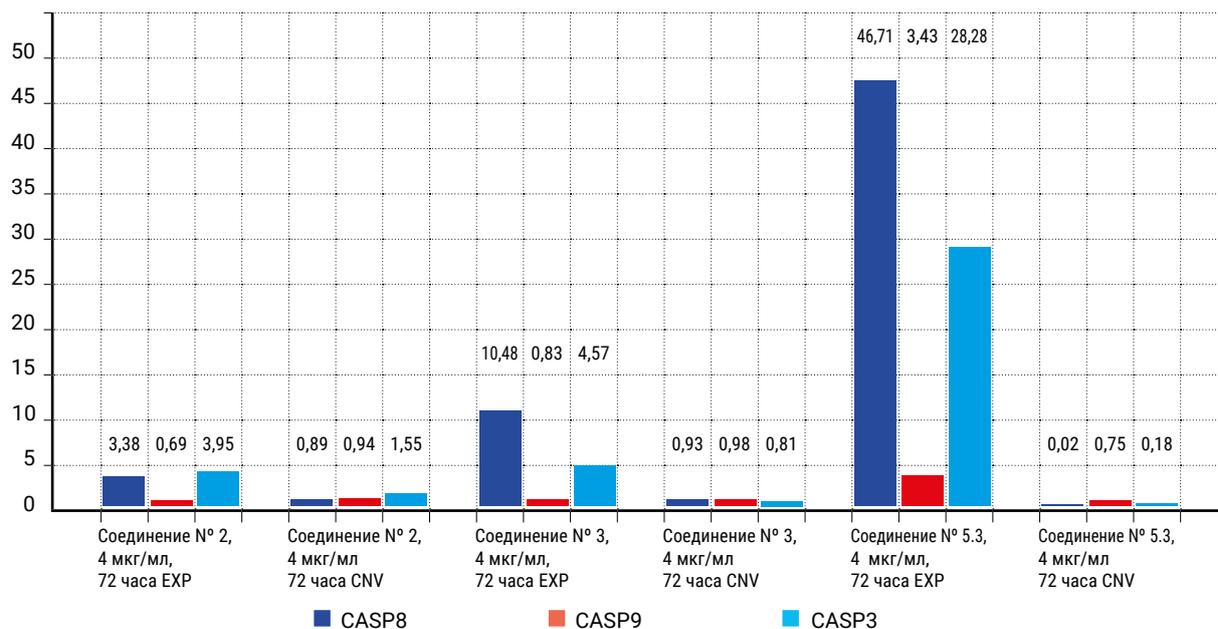


Рис. 9. Изменения уровня копийности и экспрессии локусов *CASP8*, *CASP9*, *CASP3* при воздействии 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (№ 2), 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde (№ 3) и 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde (№ 5.3)

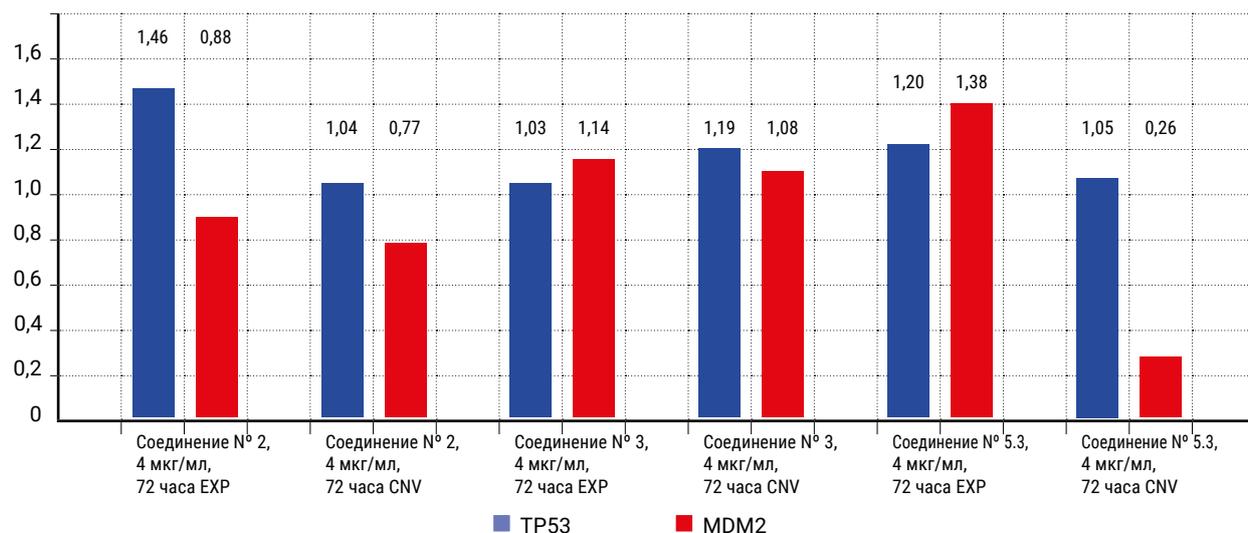


Рис. 10. Изменения уровня копийности и экспрессии локусов *TP53*, *MDM2* при воздействии 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (№ 2), 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde (№ 3) и 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde (№ 5.3)

Полученные в ходе нашего исследования данные показывают разнонаправленные результаты. Наиболее выраженное изменение уровня экспрессии локусов *CASP8* и *CASP3* было выявлено при воздействии 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde. Цитозольные каспазы – это цистеин-аспарагиновые протеазы, представляющие собой

основное семейство белков, участвующих в передаче сигналов гибели клеток. Каспазы разделяются на три группы: инициаторные, воспалительные и эффекторные. Они принимают непосредственное участие в запуске апоптоза. Как известно белок *CASP8*, являющийся инициаторным, связан с фактором некроза опухоли (TNF), находящимся на повер-

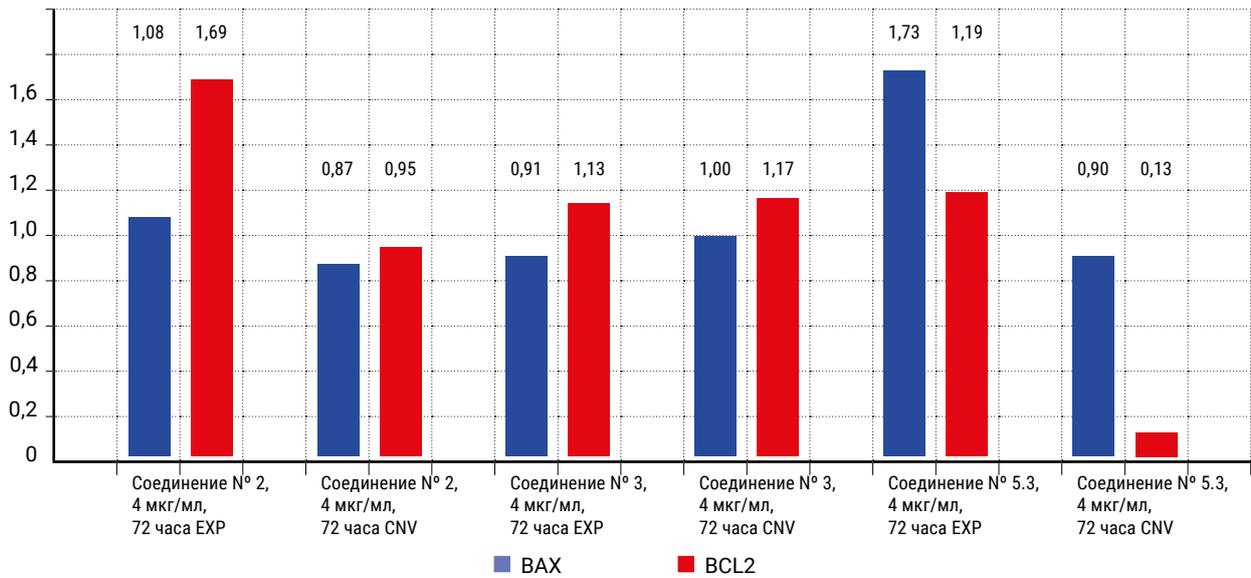


Рис. 11. Изменения уровня копийности и экспрессии локусов *BAX*, *BCL2* при воздействии 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (№ 2), 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde (№ 3) и 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde (№ 5.3)

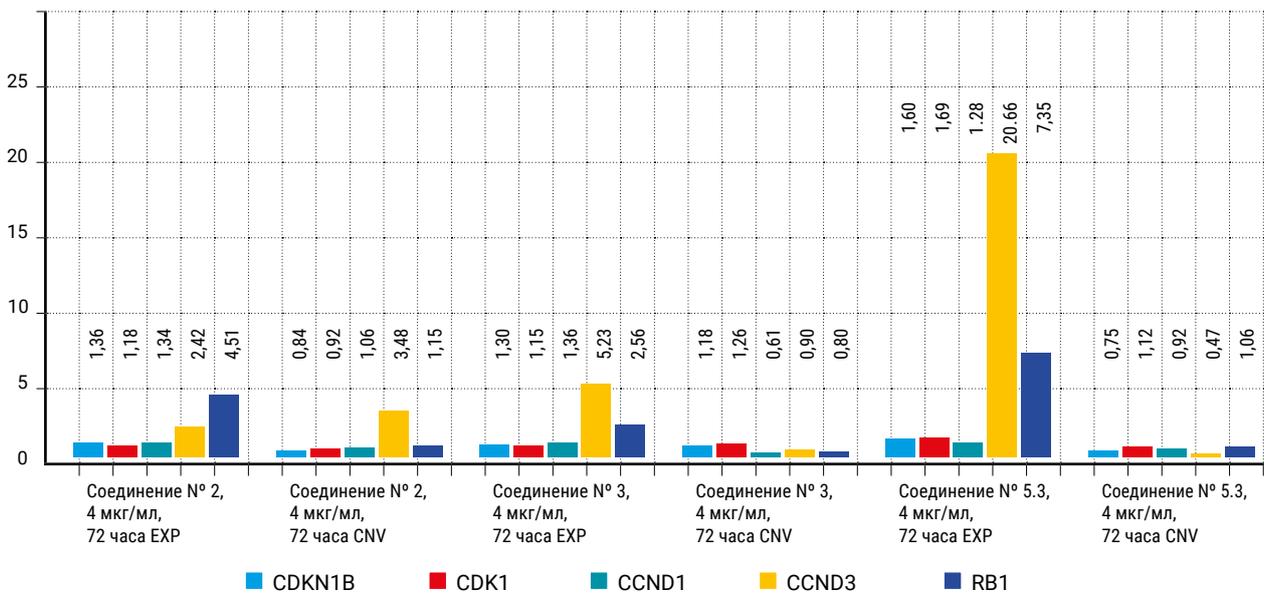


Рис. 12. Изменения уровня копийности и экспрессии локусов *CDKN1B*, *CDK1*, *CCND1*, *CCND3*, *RB1* при воздействии 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one (№ 2), 5-(hydroxymethyl)furan-2-carbaldehyde (№ 3) и 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde (№ 5.3)

ности клетки, а также FAS лигандом (FasL), и индуцирующим апоптоз (CD95). Активация белка CASP8 через внешний путь апоптоза запускает BID-опосредованную активацию белков BAX и BAK на внешней мембране митохондрий, что приводит к высвобождению цитохрома C и последующей активацией CASP9, который, в свою очередь, активирует CASP3 и CASP7, тем самым выполняя процесс апоптоза по митохондриальному пути [13]. Следует обратить внимание, что при воздействии 5-(hydroxymethyl) furan-2-carbaldehyde наблюдалось изменение уровня экспрессии CASP8 и CASP3 схожего профиля.

В то же время 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde увеличил уровень экспрессии TP53 и в значительной степени снизил экспрессию MDM2, что может говорить о специфической таргетированности действия данного соединения. Следует учитывать, что TP53 обладает опухолесупрессивной активностью, что в значительной степени объясняет его способность индуцировать гибель клеток, включая апоптоз, посредством транскрипционно-зависимых и независимых от транскрипции механизмов [14]. К тому же, ядерный белок p53 транскрипционно активирует экспрессию множества проапоптотических генов семейства BCL-2, таких как NOXA, PUMA, BID, BAD, BIK, BAX и т. д., тогда как он инактивирует экспрессию антиапоптотических BCL-2, BCL-XI и MCL1, приводящих к митохондриальному апоптозу [15]. Связь между изменением уровня экспрессии локусов TP53 и BAX также нашла свое отражение в полученных результатах. Как и в случае со связкой локусов TP53/MDM2, воздействие терпеноида 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde повлияло на уровень экспрессии локусов BAX/BCL2.

Также следует отметить изменения показателей уровня экспрессии локусов CCND3 и RB1 под воздействием 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one. Это соединение единственное из использованных в нашем исследовании приводило к снижению уровня экспрессии локуса CCND3 относительно RB1 (уровень экспрессии RB1 почти в 2 раза превышал уровень экспрессии CCND3). Как известно, циклины d-типа (d1, d2 и d3) являются регуляторами клеточ-

ного цикла, которые активируют циклинзависимые киназы cdk4 и cdk6, часто сверхэкспрессирующиеся при злокачественных новообразованиях. Продукт гена CCND3 взаимодействует с белком-супрессором опухолей Rb и участвует в его фосфорилировании. Активность CDK4, связанная с этим CCND3, который необходим для перехода клеточного цикла в фазу G2. Ингибирование CCND3 и циклин-d-cdk4/6 киназы в опухолевых клетках с высоким содержанием белка ретинобластомы RB1 вызывает остановку клеточного цикла. Однако снижение только уровня RB1 в опухолевых клетках не приводит к остановке пролиферации [16]. Данные по изменению экспрессии CCND3 и RB1 согласуются с данными объективного контроля по фотографиям, полученным с помощью инвертированного микроскопа и данными проточной цитофлуориметрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить разнонаправленное влияние вторичных метаболитов *P. hybridus* (L.) на показатели гибели и апоптоза клеток линии HeLa. Данные, полученные методом цифровой капельной ПЦР, позволили выявить максимальное усиление экспрессии генов, ответственных за регуляцию апоптоза (CASP3, CASP8, TP53, BAX) под действием 2,2,8-trimethyldecahydroazulene-5,6-dicarbaldehyde, а также изменение экспрессии генов CCND3 и RB1 под воздействием 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one. При этом по данным цитометрии и проточной цитофлуориметрии более выраженный проапоптотический (цитотоксический) эффект выявлен именно у 2,4-dihydroxy-2,5-dimethylfuran-3(2H)-one. Необходимо отметить, что в нашей работе наиболее активно на исследуемые вещества реагировал показатель экспрессии, который в ряде случаев диссонировал как с копийностью генов, так и уровнем смертности и апоптоза опухолевых клеток. Возможно химические модификации использованных нами соединений окажут более выраженный эффект как на молекулярно-генетическом уровне, так и клеточном.

Список источников

1. Hegde YM, Theivendren P, Srinivas G, Palanivel M, Shanmugam N, Kunjiappan S, et al. A Recent Advancement in Nanotechnology Approaches for the Treatment of Cervical Cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2023;23(1):37–59. <https://doi.org/10.2174/1871520622666220513160706>

2. Кутилин Д. С., Могушкова Х. А. Влияние противоопухолевых антибиотиков антрациклинового ряда на транскрипционную активность раково-тестикулярных антигенов в модельном эксперименте на клеточной линии HeLa. *Медицинская иммунология*. 2019;21(3):539–546. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2019-3-539-546>, EDN: SIWZEN
3. Cox E. Performing HeLa: theatrical bodies and living remains. *Med Humanit*. 2023 Sep;49(3):447–456. <https://doi.org/10.1136/medhum-2022-012524>
4. Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiol Biochem*. 2020 Mar;148:80–89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006>
5. Fakhri S, Moradi SZ, Farzaei MH, Bishayee A. Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review. *Semin Cancer Biol*. 2022 May;80:276–305. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.02.007>
6. Zagoskina NV, Nazarenko LV. Secondary Plant Metabolites: Distribution, History of Study, Practical Application Bulletin of the Moscow City Pedagogical University. Series "Pedagogy and Psychology". 2019;(2(34)):8–19. <https://doi.org/10.25688/2076-9091.2019.34.2.1>
7. Mohiuddin AK. Chemistry of Secondary Metabolites. *Annals of Clinical Toxicology*. 2019 Jan 29;2. <https://doi.org/10.25107/2641-905X-v2-id1014>
8. Apostolova S, Oreshkova T, Uzunova V, Georgieva I, Maslenkova L, Tzoneva R. A Standardized Extract of *Petasites hybridus* L., Containing the Active Ingredients Petasins, Acts as a Pro-Oxidant and Triggers Apoptosis through Elevating of NF-κB in a Highly Invasive Human Breast Cancer Cell Line. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2023 Jun 12;28(6):111. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2806111>
9. Matsumoto T, Imahori D, Saito Y, Zhang W, Ohta T, Yoshida T, et al. Cytotoxic activities of sesquiterpenoids from the aerial parts of *Petasites japonicus* against cancer stem cells. *J Nat Med*. 2020 Sep;74(4):689–701. <https://doi.org/10.1007/s11418-020-01420-x>
10. Кутилин Д. С., Кечерюкова М. М. От биоинформационного скрининга генетических маркёров к малоинвазивной диагностике метастазов в лимфатических узлах у пациенток с раком шейки матки. *Казанский медицинский журнал*. 2022;103(5):725–736. <https://doi.org/10.17816/KMJ2022-725>, EDN: OTTJXB
11. Тимофеева С. В., Филиппова С. Ю., Ситковская А. О., Гненная Н. В., Межевова И. В., Шамова Т. В. и др. Биоресурсная коллекция клеточных линий и первичных опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии Минздрава России. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2022;21(11):44–50. <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2022-3397>, EDN: MWVYOR
12. Bouabdallah S, Al-Maktoum A, Amin A. Steroidal Saponins: Naturally Occurring Compounds as Inhibitors of the Hallmarks of Cancer. *Cancers (Basel)*. 2023 Jul 31;15(15):3900. <https://doi.org/10.3390/cancers15153900>
13. Pang J, Vince JE. The role of caspase-8 in inflammatory signalling and pyroptotic cell death. *Semin Immunol*. 2023 Nov;70:101832. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101832>
14. Voskarides K, Giannopoulou N. The Role of TP53 in Adaptation and Evolution. *Cells*. 2023 Feb 3;12(3):512. <https://doi.org/10.3390/cells12030512>
15. Hao Q, Chen J, Lu H, Zhou X. The ARTS of p53-dependent mitochondrial apoptosis. *J Mol Cell Biol*. 2023 Mar 29;14(10):mjac074. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac074>
16. Wang H, Nicolay BN, Chick JM, Gao X, Geng Y, Ren H, et al. The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*. 2017 Jun 15;546(7658):426–430. <https://doi.org/10.1038/nature22797>

Информация об авторах:

Златник Елена Юрьевна – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>, SPIN: 4137-7410, AuthorID: 327457, ResearcherID: AAI-1311-2020, Scopus Author ID: 6603160432

Енин Ярослав Сергеевич ✉ – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4572-1579>, SPIN: 7683-2286, AuthorID: 840050, Scopus Author ID: 57196464479

Буров Олег Николаевич – к.х.н., доцент кафедры природных и высокомолекулярных соединений химического факультета, ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7704-033X>, SPIN: 5269-7656, AuthorID: 642948, ResearcherID: A-8428-2014, Scopus Author ID: 23033004000

Бондаренко Елена Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8522-1026>, SPIN: 3117-4040, AuthorID: 865798, Scopus Author ID: 57200132337

Сагакянц Александр Борисович – к.б.н., заведующий лабораторией иммунофенотипирования опухолей, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>, SPIN: 7272-1408, AuthorID: 426904, ResearcherID: M-8378-2019, Scopus Author ID: 24329773900

Кутилин Денис Сергеевич – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>, SPIN: 8382-4460, AuthorID: 794680, Scopus Author ID: 55328886800

Дзигунова Юлия Викторовна – старший преподаватель кафедры ботаники академии биологии и биотехнологии им. Д. И. Ивановского, ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
SPIN: 2204-2967, AuthorID: 1062681

Новикова Инна Арнольдовна – д.м.н., заместитель генерального директора по науке, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>, SPIN: 4810-2424, AuthorID: 726229, ResearcherID: E-7710-2018, Scopus Author ID: 7005153343

Пржедецкий Юрий Валентинович – д.м.н., профессор, заведующий отделением реконструктивно-пластической хирургии и онкологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3976-0210>, SPIN: 3888-6265, ResearcherID: ATT-7598-2020, Scopus Author ID: 57188731912

Вклад авторов:

Златник Е. Ю. – редактирование рукописи;
Енин Я. С. – концепция и дизайн исследования, проведение эксперимента, написание рукописи;
Буров О. Н. – выделение и верификация соединений из растительного материала;
Бондаренко Е. С. – проведение цитофлюориметрического анализа;
Сагакянц А. Б. – анализ результатов цитофлюориметрии;
Кутилин Д. С. – редактирование рукописи;
Дзигунова Ю. В. – сбор и определение растительного материала;
Новикова И. А. – оформление библиографии, редактирование рукописи;
Пржедецкий Ю. В. – статистическая обработка данных.