

На правах рукописи

Мехтиев Ариф Раминович

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ОКСИГЕНИРОВАННЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ СТИГМАСТАНА И ЭРГОСТАНА В КЛЕТКАХ НЕР
G2 И MCF-7**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

Научный руководитель: доктор биологических наук
Мишарин Александр Юрьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Соколов Николай Николаевич

доктор биологических наук
Торховская Татьяна Ивановна

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Росмедтехнологий

Защита диссертации состоится «__» _____ 2008 года в __ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.010.01 при Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук по адресу 119121, г. Москва, ул. Погодинская, 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного учреждения Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича Российской академии медицинских наук

Автореферат разослан «__» _____ 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук

Карпова Е. А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение физиологически активных природных соединений и их синтетических производных является важнейшим направлением современной биомедицинской химии. Препараты, созданные на основе природных соединений, широко применяются в лечении и профилактике онкологических, инфекционных, сердечно-сосудистых, аутоиммунных заболеваний и нарушений метаболизма.

Высоким фармакологическим потенциалом обладают природные изопреноиды, в частности стерины растительного и микробного происхождения, а также продукты их химической трансформации. Наибольшее значение имеют оксигенированные производные растительных и микробных стеринов, которые являются близкими структурными аналогами оксистеринов - важнейших регуляторных молекул в организме млекопитающих. При физиологических концентрациях оксистерины регулируют биосинтез, метаболизм и транспорт изопреноидов, липидов, желчных кислот, углеводов, играют важную роль в процессах клеточной дифференцировки и апоптоза. Однако неоднократные попытки использования природных оксистеринов в качестве фармакологических регуляторов липидного обмена потерпели неудачу из-за их быстрого метаболизма в клетках печени, а также вследствие многочисленных побочных эффектов, обусловленных наличием множества потенциальных мишеней для соединений стеринового ряда.

В лаборатории Синтеза физиологически активных соединений ГУ НИИ БМХ РАМН был осуществлен синтез новой серии оксигенированных производных стигмастана и эргостана. Основу проекта составляет гипотеза, что направленная химическая трансформация доступных молекул эргостерина и стигмастерина представляет собой перспективный путь получения новых оксистеринов, обладающих регуляторной активностью в клетках млекопитающих и проявляющих пролонгированный эффект по сравнению с аналогичными производными ряда холестана. Данная диссертация является частью этого проекта.

Цель и задачи исследования. Цель работы - изучение биологической активности и оценка фармакологического потенциала новых оксигенированных производных стигмастана и эргостана в клетках гепатобластомы человека линии Hep G2 и карциномы молочной железы человека линии MCF-7.

Выбор вышеуказанных клеточных культур был обусловлен тем, что клетки MCF-7 и Hep G2 являются стандартными моделями для первичного тестирования потенциальных противоопухолевых препаратов и регуляторов липидного обмена, соответственно. Кроме того, исследование биологической активности оксигенированных производных стигмастана и эргостана в клетках Hep G2 особенно интересно, поскольку в клетках печени регуляторно активные производные холестана быстро деградируют, теряя активность.

Задачи работы:

- 1) Оценка влияния новых оксигенированных производных стигмастана и эргостана на жизнеспособность и пролиферацию клеток MCF-7 и Hep G2; исследование цитотоксичности наиболее активных соединений.
- 2) Изучение влияния оксигенированных производных стигмастана и эргостана на биосинтез холестерина в клетках Hep G2; исследование (22E)-5 α -эргоста-8(14),22-диен-15-он-3 β -ола, (22S,23S)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола в качестве регуляторов биосинтеза и метаболизма холестерина в клетках печени.
- 3) Исследование влияния (22S,23S)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола на биосинтез холестероловых эфиров и активность ацилкофермент-А:холестерин-ацилтрансферазы (ACAT) в клетках Hep G2.
- 4) Исследование влияния (22S,23S)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола на метаболизм экзогенного холестерина в клетках Hep G2.

Научная новизна работы. В работе проведено исследование биологической активности 22 новых синтетических производных стигмастана и эргостана в клетках MCF-7 и Hep G2. Впервые показано, что новые производные стигмастана, содержащие (22R,23R)-22,23-диольную функцию, подавляют жизнеспособность клеток млекопитающих, причем токсический эффект определяется жесткой конформацией боковой цепи. В результате работы найдены три новых производных эргостана, эффективно подавляющих биосинтез и регулирующих метаболизм холестерина в клетках Hep G2. Регуляторная активность этих соединений определялась стереохимической конфигурацией атомов C22 и C23.

Теоретическое и практическое значение работы. Работа убедительно доказала справедливость гипотезы, согласно которой направленная модификация боковой цепи природных стероидов является перспективным подходом к созданию новых биологически активных соединений с высоким фармакологическим потенциалом. Проведенные исследования показали перспективу использования новых производных стигмастана и эргостана, содержащих оксигенированную боковую цепь, в качестве потенциальных цитотоксиков, цитостатиков, регуляторов клеточного сигналинга и липидного метаболизма, а также позволили провести прогноз биологической активности и оценки фармакологического потенциала некоторых стероидов растительного происхождения и их синтетических производных.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

- 1) В результате проведенных исследований установлено, что производные (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмастана токсичны в клетках MCF-7 и Hep G2.
- 2) В результате проведенных исследований установлена высокая цитотоксичность (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола в клетках MCF-7.

- 3) В результате проведенных исследований установлено, что $\Delta 8(14)$ -15-кетопроизводными эргостана подавляют биосинтез и регулируют метаболизм холестерина в клетках Hep G2, причем различия в биологической активности определяются структурой боковой цепи и стереохимической конфигурацией атомов C22 и C23.
- 4) В результате проведенных исследований установлено, что изомерные (22S,23S)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол оказывают различное влияние на биосинтез холестероловых эфиров и активность АСАТ в клетках Hep G2.
- 5) В результате проведенных исследований установлено, что изомерные (22S,23S)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол активируют метаболизм экзогенного холестерина в клетках Hep G2.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы докладывались на международных конференциях “ Биологические мишени для действия лекарственных препаратов нового поколения (март 2006, ЦВТ ХИМРАР, г. Химки)”, “Новые технологии создания инновационных лекарств (декабрь 2006, ЦВТ ХИМРАР, г. Химки)”, “Перспективы разработки противоопухолевых лекарств с новыми механизмами действия (декабрь 2007, ЦВТ ХИМРАР, г. Химки)”, конференции научных работ ГУ НИИ БМХ РАМН (май 2007, Москва). Материалы диссертационной работы отражены в 9 публикациях: 6 статей и 3 публикации в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из 6 разделов: “Введение”, “Обзор литературы (Биологическая активность фитостероидов и их производных)”, “Материалы и методы”, “Результаты и их обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”. Диссертация изложена на 92 страницах, иллюстрирована 33 рисунками, список литературы включает 230 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Химические реактивы, растворители и хроматографические материалы получены от фирм “Sigma”, “Merck”, “Aldrich”, “Woelm” и “МедХимЛаб”; культуральный пластик, среды и сыворотка - от фирм “Greiner”, “Costar”, “Corning”, “Gibco BRL” и “HyClone”; радиоактивные изотопы от фирмы “Amersham” и “ВО Изотоп”; синтетические олигонуклеотиды – от АОО “Синтол”. 5 α -Холест-8(14)-ен-15-он-3 β -ол (15-кетостерин) и оксигенированные производные стигмастана и эргостана (**1** – **22**) синтезированы в лаборатории Синтеза физиологически активных соединений ГУ НИИ БМХ РАМН. Структурные формулы соединений **1** – **22** приведены на рис.1.

Культуры клеток. Клетки гепатомы человека линии Hep G2 (ЕСАСС) и клетки карциномы молочной железы человека линии MCF-7 (АТСС), выращивали в 96-луночных, 24-луночных, 6-луночных планшетах, чашках диаметром 35 мм или

флаконах площадью 25 см². Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FCS, в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Перед экспериментом клетки выдерживали 24 ч в среде, содержащей 10% FCS, или в бессывороточной среде. Исследуемые соединения добавляли к культуральной среде в этанольном растворе.

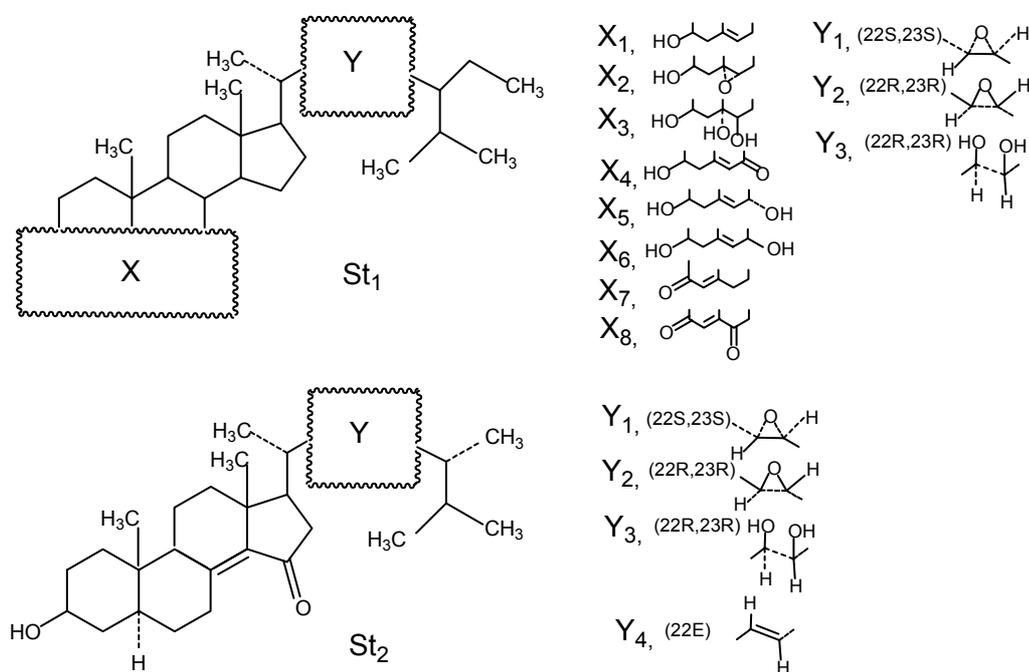


Рис. 1. Оксигенированные производные стигмастана и эргостана: **1** (St₁,X₁,Y₁) – (22S,23S)-22,23-оксидстигмаст-5-ен-3β-ол; **2** (St₁,X₁,Y₂) – (22R,23R)-22,23-оксидстигмаст-5-ен-3β-ол; **3** (St₁,X₁,Y₃) – (22R,23R)-стигмаст-5-ен-3β,22,23-триол; **4** (St₁,X₇,Y₁) – (22S,23S)-22,23-оксидстигмаст-4-ен-3-он; **5** (St₁,X₇,Y₂) – (22R,23R)-22,23-оксидстигмаст-4-ен-3-он; **6** (St₁,X₇,Y₃) – (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмаст-4-ен-3-он; **7** (St₁,X₈,Y₁) – (22S,23S)-22,23-оксидстигмаст-4-ен-3,6-дион; **8** (St₁,X₈,Y₂) – (22R,23R)-22,23-оксидстигмаст-4-ен-3,6-дион; **9** (St₁,X₈,Y₃) – (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмаст-4-ен-3,6-дион; **10** (St₁,X₂,Y₃) – (22R,23R)-5α,6α-оксидстигмастан-3β,22,23-триол; **11** (St₁,X₃,Y₃) – (22R,23R)-стигмастан-3β,5α,6β-22,23-пентаол; **12** (St₁,X₄,Y₁) – (22S,23S)-22,23-оксидстигмаст-5-ен-7-он-3β-ол; **13** (St₁,X₄,Y₂) – (22R,23R)-22,23-оксидстигмаст-5-ен-7-он-3β-ол; **14** (St₁,X₄,Y₃) – (22R,23R)-стигмаст-5-ен-7-он-3β,22,23-триол; **15** (St₁,X₅,Y₁) – (22S,23S)-22,23-оксидстигмаст-5-ен-3β,7α-диол; **16** (St₁,X₆,Y₁) – (22R,23R)-22,23-оксидстигмаст-5-ен-3β,7α-диол; **17** (St₁,X₅,Y₂) – (22S,23S)-22,23-оксидстигмаст-5-ен-3β,7β-диол; **18** (St₁,X₆,Y₂) – (22R,23R)-22,23-оксидстигмаст-5-ен-3β,7β-диол; **19** (St₂,Y₄) – (22E)-5α-эргоста-8(14)-диен-15-он-3β-ол; **20** (St₂,Y₁) – (22S,23S)-22,23-оксид-5α-эргост-8(14)-ен-15-он-3β-ол; **21** (St₂,Y₂) – (22R,23R)-22,23-оксид-5α-эргост-8(14)-ен-15-он-3β-ол; **22** (St₂,Y₃) – (22R,23R)-5α-эргост-8(14)-ен-15-он-3β,22,23-триол.

Методы. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре “Thermospectronic Helios α.” Измерение радиоактивности липидных экстрактов проводили в толуольном сцинтилляторе; измерение радиоактивности водных растворов и клеточных экстрактов – в сцинтилляторах ЖС-8 и “Unisolv” на счетчике Tri-Carb 2800 TR (Perkin Elmer).

Концентрацию белка определяли модифицированным методом Лоури [Markwell et al., 1978], или реакцией с бичинхониновой кислотой [Smith et al., 1985], концентрацию холестерина - модифицированным методом Либермана-Бурхардта [Huang et al., 1961] или ферментативным методом при помощи стандартного набора “Оксохром Холестерин“ фирмы “Lachema“ по протоколу фирмы-изготовителя. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках “Kieselgel UV 254”, “HPTLC Kieselgel UV 254” и “PSC Kieselgel UV 254”. Расчет низкоэнергетических конформаций боковой цепи оксистеринов полуэмпирическим методом AM1 проводился с использованием программы “HyperChem 7.0” на компьютерном кластере лаборатории Динамики белков ИМБ РАН; построение трехмерных моделей комплекса соединения **3** с димиристоилфосфатидилхолином проводилось в компьютерном центре Университета штата Миннесота (США). Все расчеты проведены м.н.с. ИМБ РАН Я.В. Ткачевым.

Цитотоксичность соединений 1 – 22. Оценку токсичности соединений **1 – 22** в клетках MCF-7 и Hep G2 проводили с использованием цветной реакции тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ) с живыми клетками по методу [Mosmann, 1983], а также по включению [¹⁴C]тимидина в ДНК.

Проточная цитофлуориметрия. Цитофлуориметрический анализ клеток MCF-7, инкубированных с соединениями **3** и **21**, проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSAria в режиме FL1.

Микрофотографии клеток. Микрофотографии клеток MCF-7, инкубированных с соединениями **3** и **21** (в режиме фазового контраста и после окрашивания гидрохлоридом 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI)), получали на приборе Axiovert 200M (Zeiss).

Уровень биосинтеза холестерина, жирных кислот, триглицеридов и холестероловых эфиров в клетках Hep G2, инкубированных с исследуемыми соединениями в различных условиях, оценивали по скорости включения биосинтетических предшественников - [¹⁴C]ацетата и [¹⁴C]олеата в соответствующие продукты по методу [Goldstein et al., 1983].

Влияние соединений 20 и 21 на активность АСАТ в бесклеточной системе. Получение клеточного лизата; приготовление модельных субстратов, содержащих холестерин, 25-гидроксистерин, кетостерины **20** и **21**; инкубацию модельных субстратов с клеточным лизатом и [1-¹⁴C]олеил-КоА проводили по методу [Cheng et al., 1995].

Включение [³H]холестерина; влияние соединений 20 и 21 на метаболизм экзогенного холестерина в клетках Hep G2. Инкубацию клеток с [³H]холестерином и исследуемыми соединениями проводили в присутствии 10% FCS в течение 24 ч, затем клетки инкубировали 24 ч в отсутствие радиоактивности, образовавшиеся радиоактивные продукты анализировали ТСХ в экстрактах из клеток и культуральной среды.

Влияние соединений 19 - 21 на уровень мРНК HMG-CoA-редуктазы, CYP27A1 и CYP3A4 в клетках Hep G2. Тотальную РНК выделяли из клеток Hep G2, инкубированных с исследуемыми соединениями, гуанидинизотиоцианатным методом [Chomczynski, Sacchi, 1987]. К-ДНК получали по протоколу фирмы “Promega”, ПЦР проводили по методу [Маниатис и соавт., 1984]; продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле; зоны, окрашенные бромфеноловым синим, анализировали на приборе WAT-137LN и с помощью программы “ImageJ 1.36”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ 22,23-ОКСИГЕНИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СТИГМАСТАНА (1 – 18)

Первой задачей работы было исследование влияния новых оксигенированных производных стигмастана **1 - 18** на жизнеспособность и пролиферацию клеток MCF-7 и Hep G2 при 48 ч инкубации в бессывороточной среде (рис. 2 - 5).

На основании результатов оценки цитотоксичности все исследованные соединения **1 – 18** были разделены на 4 группы: **группа 1** (токсичные соединения): оксистерины **3, 11, 14, 17**; **группа 2** (избирательно токсичные соединения): оксистерины **6, 9** и **10** проявляли токсичность только в клетках MCF-7, а соединение **15**, проявляя умеренную токсичность в клетках Hep G2, не оказывало токсического эффекта в клетках MCF-7; **группа 3** (нетоксичные и слаботоксичные соединения) : оксистерины **1, 2, 8, 13, 16, 18**; **группа 4** (соединения, показывающие сложную зависимость МТТ-теста от концентрации): оксистерины **4, 5, 7** и **12** в низких концентрациях достоверно увеличивали значения МТТ-теста выше контрольного в клетках MCF-7.

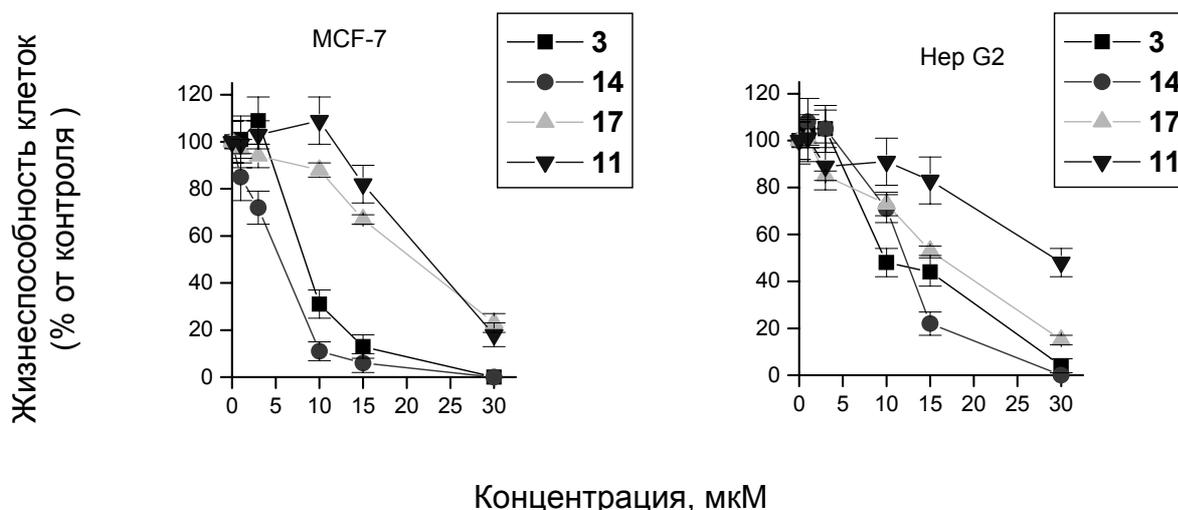


Рис. 2. Влияние цитотоксичных производных стигмастана **3, 11, 14** и **17** (группа 1) на жизнеспособность клеток MCF-7 и Hep G2 при 48 ч инкубации в бессывороточной среде

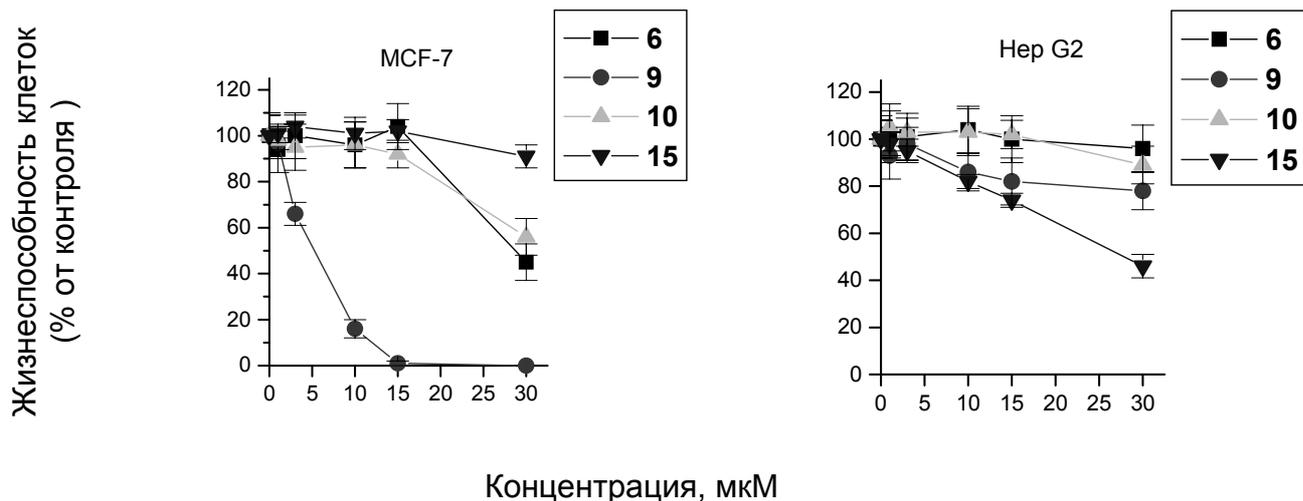


Рис. 3. Влияние избирательно токсичных производных стигмастана 6, 9, 10 и 15 (группа 2) на жизнеспособность клеток MCF-7 и Нер G2 при 48 ч инкубации в бессывороточной среде

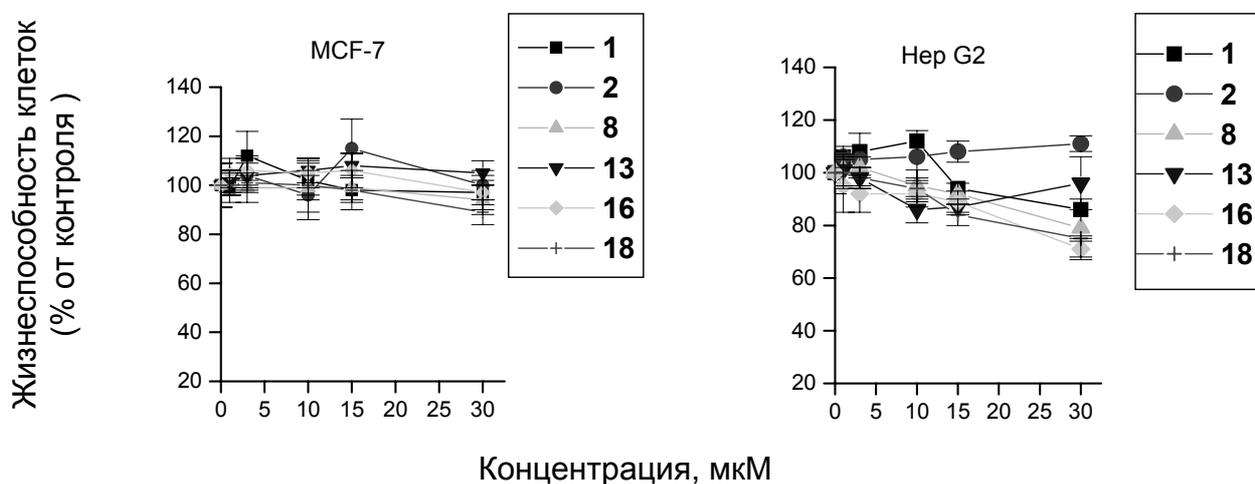


Рис. 4. Влияние нетоксичных и слабо токсичных производных стигмастана 1, 2, 8, 13, 16 и 18 (группа 3) на жизнеспособность клеток MCF-7 и Нер G2 при 48 ч инкубации в бессывороточной среде

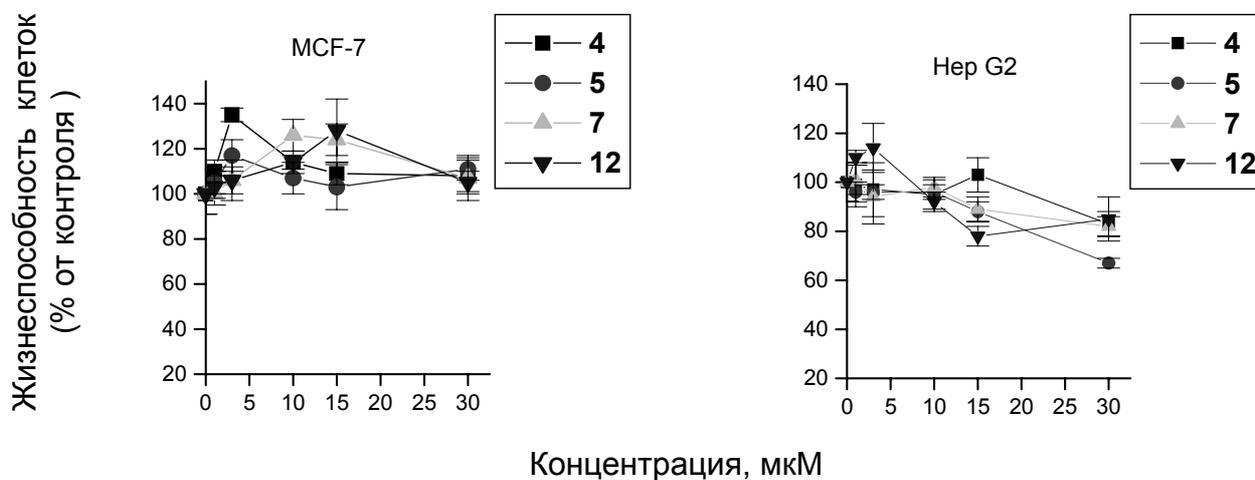


Рис. 5. Влияние производных стигмастана, стимулирующих пролиферацию клеток MCF-7 4, 5, 7 и 12 (группа 4) на жизнеспособность клеток MCF-7 и Нер G2 при 48 ч инкубации в бессывороточной среде

Наибольшую токсичность проявляли (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидроксистигмаст-5-ен **3** и (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидроксистигмаст-5-ен-7-он **14**; (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмаст-4-ен-3,6-дион **9** был избирательно токсичен в клетках MCF-7; токсичность производных (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмастана значительно превосходила таковую для производных (22S,23S)-22,23-оксидостигмастана; среди исследованных производных (22R,23R)-22,23-оксидостигмастана цитотоксичных соединений не выявлено. Соединения, входящие в группу 4 в низких концентрациях увеличивали значения МТТ-теста выше контрольного, что указывает на высокую активность митохондриальных гидрогеназ и стимулировании пролиферации. Можно отметить, что таких эффектов никогда ранее не наблюдалось для оксигенированных производных холестана и стигмастана [Maguire et al., 2003; Ryan et al., 2005; Adcox et al., 2001; Lizard et al., 1999; Lemair-Ewing et al., 2005; O'Callahan et al., 1999; Hall, 2006].

Полученные результаты позволяют заключить, что токсичность производных стигмастана **3, 6, 9, 10, 11, 13, 15** и **17** значительно отличается от токсичности основных оксигенированных производных ряда холестана (оксистеринов):

- 1) среди производных (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмастана найдены соединения в 10-20 раз более токсичные, чем 7-кетохолестерин и 7 β -гидроксихолестерин в клетках Hep G2 и MCF-7;
- 2) 7 β -гидроксихолестерин, как известно, является наиболее токсичным среди основных оксистеринов, однако среди исследованных производных стигмастана только соединение **17**, обладающее 7 β -гидроксильной группой, показало умеренный токсический эффект;
- 3) введение в кольцо В производных холестана кислородсодержащих заместителей приводит к цитотоксичным соединениям (таким как 5,6-эпоксихолестан-3 β -ол или холестан-3 β ,5 α ,6 β -триол), но в ряду (22R,23R)-дигидроксистигмастана токсичность (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидрокси-5 α ,6 α -оксидостигмастана **10** и (22R,23R)-3 β ,5 α ,6 β ,22,23-пентагидроксистигмастана **11** была значительно ниже, чем токсичность (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидроксистигмаст-5-ена **3**.

Вероятно, токсичность 22,23-оксигенированных производных стигмастана определяется структурными особенностями боковой цепи. Расчет низкоэнергетических конформаций соединений **1 - 18** показал, что производные (22S,23S)-22,23-оксидостигмастана и (22R,23R)-22,23-оксидостигмастана существуют в виде пары развернутых, близких по энергии конформеров, с различной ориентацией боковой цепи, в то время как для производных (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмастана реализуется одна низкоэнергетическая конформация, характеризующаяся жесткой скрученной боковой цепью и низким значением двугранного угла C22-C23 (рис. 6).

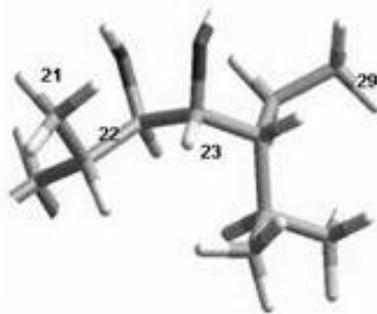


Рис. 6. Рассчитанная низкоэнергетическая конформации боковой цепи соединения **3**.

Все наиболее токсичные производные стигмастана (**3**, **9** и **14**) содержали (22R,23R)-22,23-диольную группировку. Можно полагать, что в отличие от большинства стерина и оксистерина, при встраивании в липидную бислойную мембрану для производных (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмастана наиболее вероятно сольватация гидроксильных групп боковой цепи, а не заместителя в положении 3.

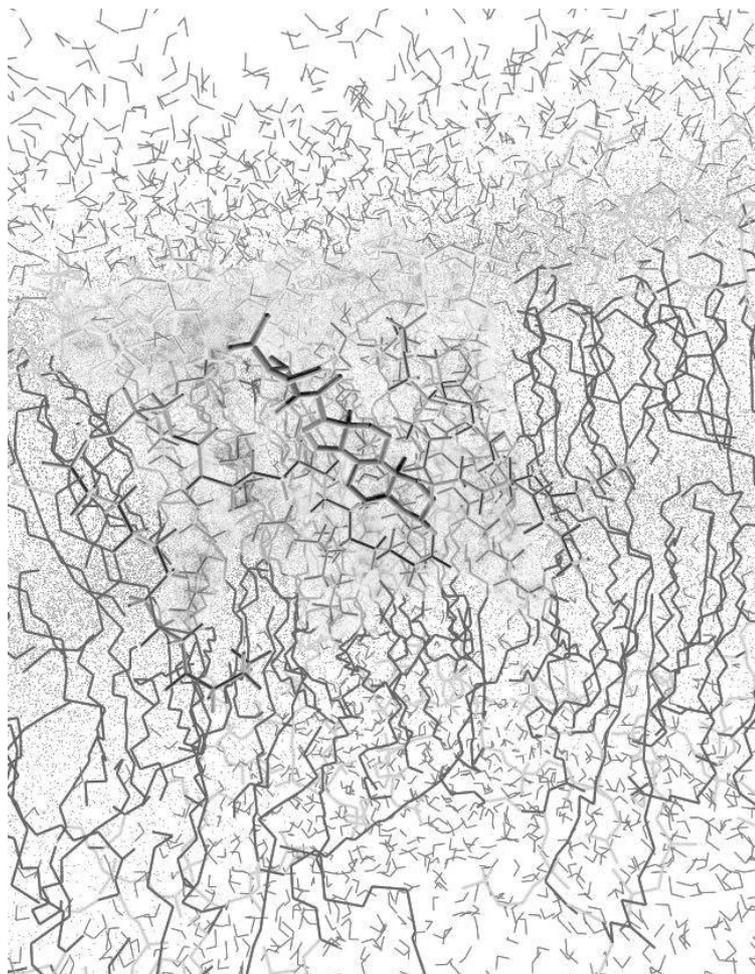


Рис. 7. Молекулярная модель (22R,23R)-стигмаст-5-ен-3β,22,23-триола **3**, встроеного в бислойную мембрану димиристоилфосфатидилхолина.

Трехмерная модель бислоя димиристоилфосфатидилхолина со встроенным (22R,23R)-стигмаст-5-ен-3 β ,22,23-триолом **3** (рис. 7) позволяет сделать следующие заключения:

Ориентация главной оси стероидного цикла (C3-C17) практически параллельна ориентации жирнокислотных остатков. В области полярных “головок” фосфолипида расположен фрагмент C22-C29, при этом наблюдаются нарушения регулярности поверхностного слоя. Связывание стерина вызывает нарушение в упаковке жирнокислотных остатков (по крайней мере два слоя липидов, окружающих молекулу стерина, испытывают возмущение). Толщина бислоя в месте связывания стерина меньше, чем толщина бислоя индивидуального димиристоилфосфатидилхолина.

Поэтому мы считаем, что высокую цитотоксичность производных (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмастана можно объяснить структурными изменениями внутренних мембран клетки.

2. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

$\Delta 8(14)$ -15-КЕТОПРОИЗВОДНЫХ 5α -ЭРГОСТАНА **19** - **22**

Среди регуляторов метаболизма холестерина, представляющих интерес в качестве потенциальных фармакологических агентов, важное место занимают $\Delta 8(14)$ -15-оксигенированные стерины. Синтетический ингибитор биосинтеза холестерина 3 β -гидрокси- 5α -холест-8(14)-ен-15-он (15-кетостерин) проявлял гипохолестеринемическую активность и эффективно регулировал метаболизм холестерина *in vivo* и в культуре клеток [Schroepfer et al., 1977a; 1977b; 1980; 1982; 1984; 1988a; 1988b; 2000; Miller et al., 1980; Swaminathan et al., 1995; Schmidt et al., 2006].

Особое место занимает проблема создания 15-кетостеринов с C17-боковой цепью, отличной от боковой цепи холестана, поскольку быстрая метаболическая деградация в клетках печени ведет к потере биологической активности 15-кетостерина [Schroepfer et al., 1988; St. Pyrek et al., 1989; Пийр и соавт., 2003]. Поскольку наличие C24-алкильного заместителя блокирует расщепление боковой цепи стерина в клетках печени [Boberg et al., 1990; 1991; Bjorkhem, 1992], исследование новых 15-кетостеринов ряда 5α -эргостана в культуре клеток печени, несомненно, представляет интерес.

Влияние четырех новых $\Delta 8(14)$ -15-кетостеринов ряда 5α -эргостана **19** – **22** на жизнеспособность клеток Нер G2 и MCF-7 при 48 ч инкубации в бессывороточной среде представлено на рис. 8. 15-Кетопроизводное эргостадиена **19** не проявляло токсического эффекта в обеих культурах. Наибольшей токсичностью в клетках MCF-7 обладал (22R,23R)-эпоксид **21**, рассчитанное значение TC_{50} составляло 0.4 ± 0.1 мкМ, что на порядок превосходило значение TC_{50} для известных оксистеринов и было сравнимо с соответствующими значениями для природных соединений стероидного ряда, используемых в качестве цитотоксических и цитостатических

противоопухолевых лекарственных препаратов [D'Auria et al., 1993; Izzo et al., 1998; Rogers et al., 1998]. Изомерный (22S,23S)-эпоксид **20** умеренно подавлял жизнеспособность клеток MCF-7 и не проявлял токсичности в клетках Hep G2. Триол **22**, эффективно подавлял жизнеспособность клеток Hep G2, но в клетках MCF-7 проявлял слабую токсичность.

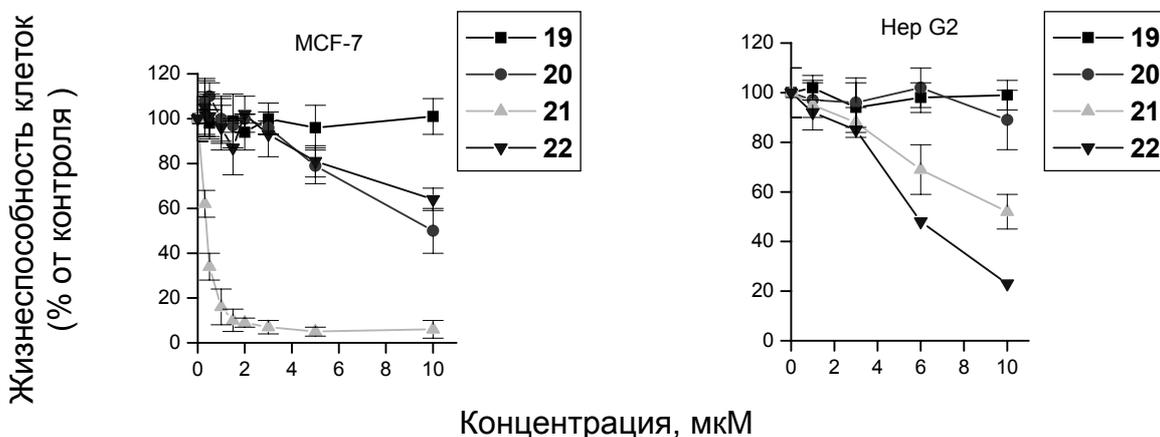


Рис. 8. Влияние $\Delta 8(14)$ -15-кетопроизводных эргостана **19** – **22** на жизнеспособность клеток MCF-7 и Hep G2 при 48 ч инкубации в бессывороточной среде

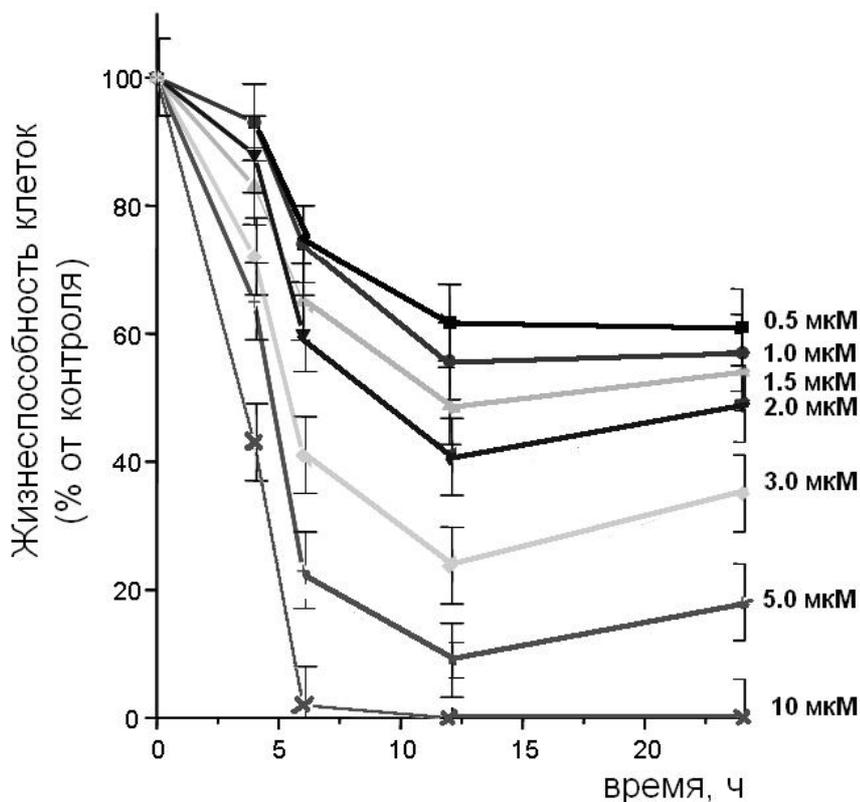


Рис. 9. Зависимость токсического эффекта (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола **21** в клетках MCF-7 от времени инкубации в среде, содержащей 10% FCS (по данным МТТ).

3. ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СОЕДИНЕНИЙ 3 И 19 В КЛЕТКАХ MCF-7

Инкубация клеток MCF-7 с наиболее токсичными оксистеринами (22R,23R)-стигмаст-5-ен-3 β ,22,23-триолом **3** и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -олом **21** сопровождалась нарушениями конfluентности монослоя, снижением числа прикрепленных клеток и морфологическими изменениями.

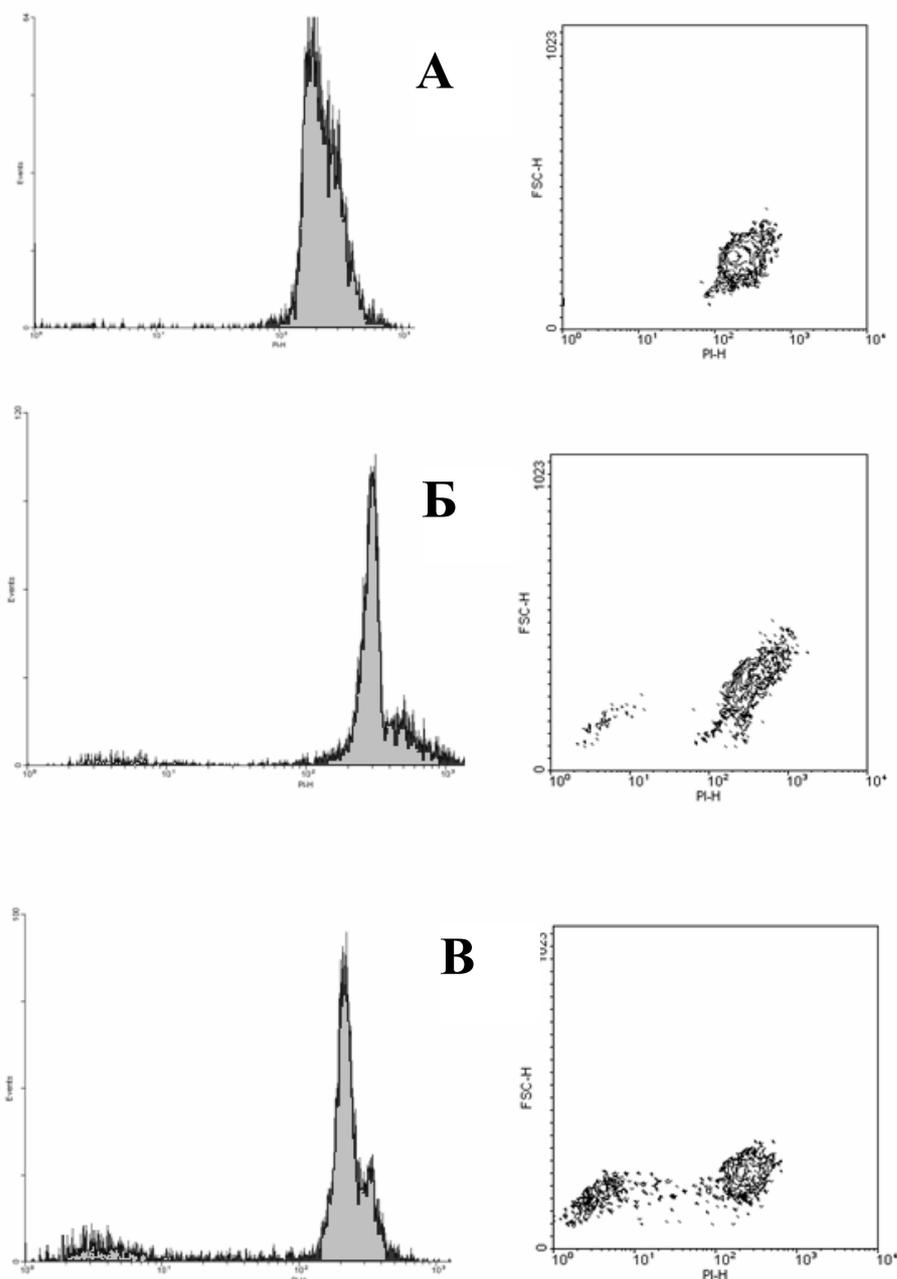


Рис. 10. Анализ клеток MCF-7 методом проточной цитофлуориметрии. Клетки MCF-7 в отсутствие оксистерина (контроль) - А; в присутствии (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидрокси-стигмаст-5-ена **3** - Б; в присутствии (22R,23R)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-она **21** - В.

Данные цитофлуориметрического анализа клеток MCF-7, инкубированных с соединениями **3** и **21**, приведены на рисунке 10; микрофотографии клеток (в режиме

фазового контраста и флуоресцентные микрофотографии, полученные после инкубации клеток с красителем DAPI, специфично сорбирующимся на ДНК) – на рис. 11.

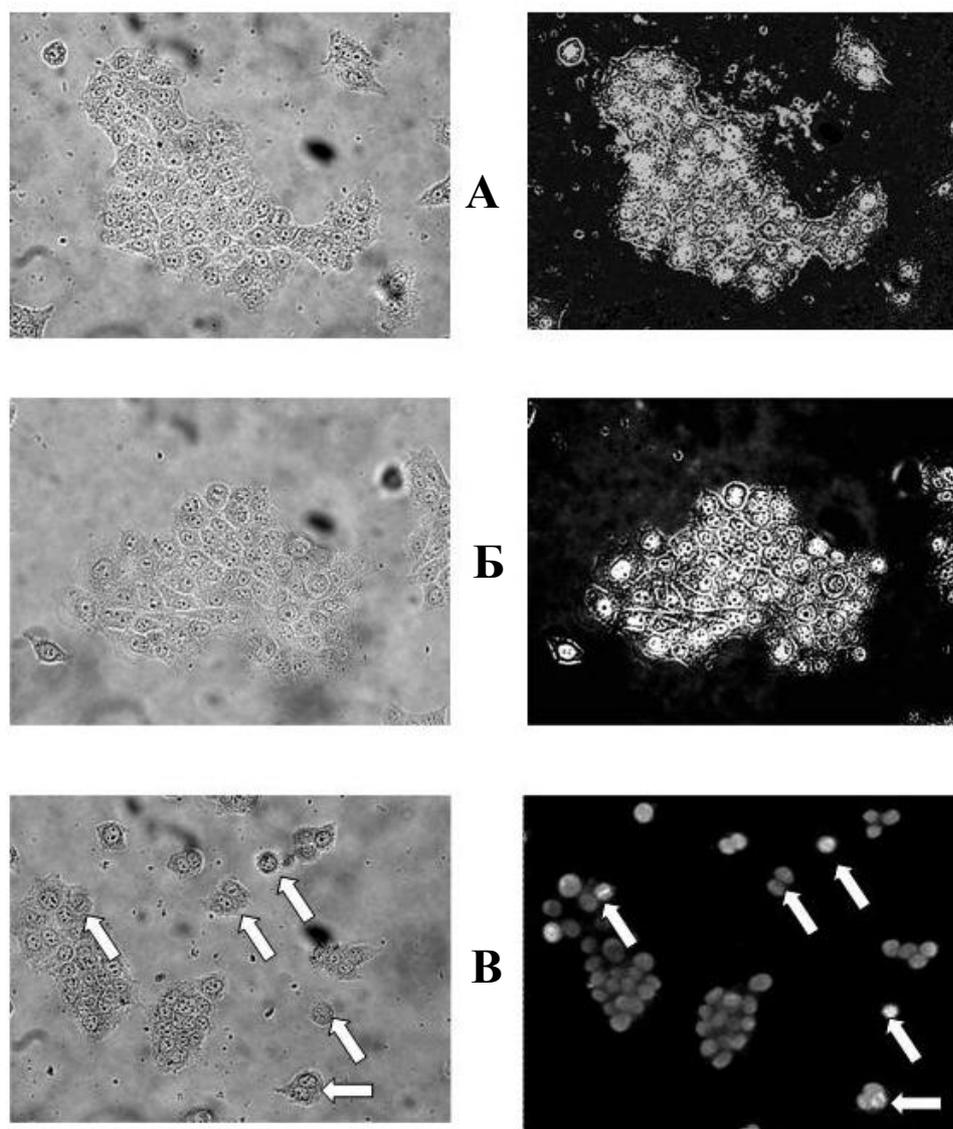


Рис. 11. Микрофотографии клеток MCF-7. А - клетки MCF-7 в отсутствии окистеринов (контроль); Б - в присутствии (22R,23R)-стигмаст-5-ен-3 β ,22,23-триола **3**; В - в присутствии (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ола **21**. Слева представлены поля фазового контраста, справа – поля фазового контраста, совмещенные с полем флуоресценции DAPI (А, Б), и только поле флуоресценции DAPI (В).

В контрольных клетках MCF-7 отсутствовали апоптотические клетки; в клетках, инкубированных с соединением **3**, популяция апоптотических клеток не превышала 5%; в клетках, инкубированных с соединением **19**, популяция апоптотических клеток составляла 19%. В контрольных клетках и клетках, инкубированных с (22R,23R)-стигмаст-5-ен-3 β ,22,23-триолом **3**, не замечено фрагментации ядер, а в клетках,

инкубированных с (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -олом **21**, были видны клетки с фрагментированными ядрами (показано стрелкой).

4. ИНГИБИРОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРИНА В КЛЕТКАХ НЕР G2 СОЕДИНЕНИЯМИ 1 – 22

На первом этапе исследовалось влияние соединений **1** – **22** на уровень биосинтеза холестерина из радиоактивного предшественника – [^{14}C]ацетата в условиях краткосрочной (3 ч) инкубации в бессывороточной среде. Среди 22,23-оксигенированных производных стигмастана только 7-кетосодержащие соединения (22S,23S)-22,23-оксидостигмаст-5-ен-7-он-3 β -ол **12** и (22R,23R)-стигмаст-5-ен-7-он-3 β ,22,23-триол **14** ингибировали биосинтез холестерина (значения IC_{50} составляли: 12 ± 2 мкМ и 5 ± 2 мкМ, соответственно). Кетостерин **12** избирательно подавлял биосинтез холестерина в концентрации до 20 мкМ, а в концентрации 30 мкМ ингибировал биосинтез холестерина, жирных кислот и триглицеридов.

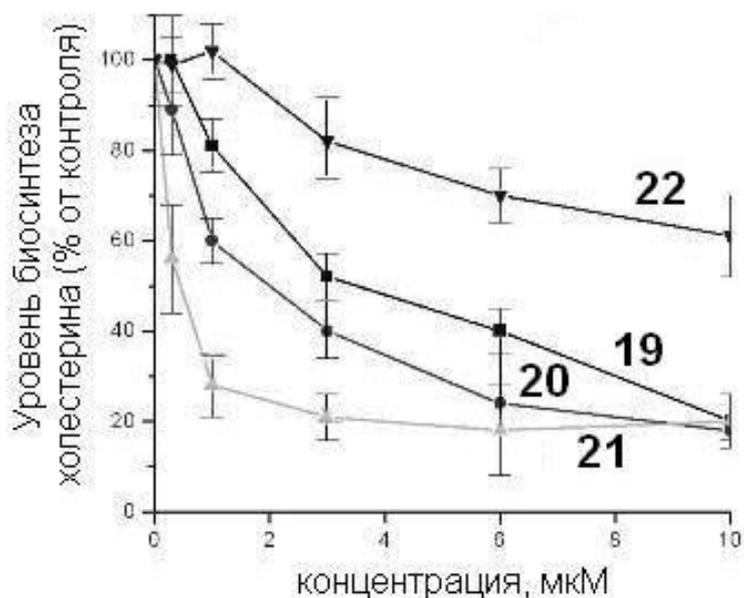


Рис. 12. Ингибирование биосинтеза холестерина в клетках НерG2 соединениями **19**– **22**.

На рисунке 12 представлен уровень биосинтеза холестерина из [^{14}C]ацетата при 3ч инкубации с соединениями **19** – **22**. Эпоксисодержащие кетостерины **20** и **21** эффективно подавляли биосинтез холестерина пропорционально их концентрации в среде (рассчитанные значения IC_{50} для соединений **20** и **21** составляли 1.9 ± 0.2 мкМ и 0.6 ± 0.2 мкМ, соответственно). Ингибиторная активность (22E)-3 β -гидрокси-5 α -эргоста-8(14),22-диен-15-она **19** была ниже (рассчитанное значение IC_{50} 3.1 ± 0.4 мкМ). Можно отметить, что в тех же условиях значение IC_{50} для 15-кетостерина составляло

4.0 ± 0.4 мкМ. Триол **22** подавлял биосинтез холестерина в этих условиях слабее, чем 15-кетостерин и кетостерины **19 – 21**.

Для того чтобы выяснить влияние $\Delta 8(14)$ -15-кетопроизводных ряда эргостана на экспрессию гена HMG CoA редуктазы в клетках Нер G2, были проведены эксперименты по количественной оценке уровня мРНК HMG CoA редуктазы в клетках, инкубированных 24 ч с соединениями **19 – 21**.

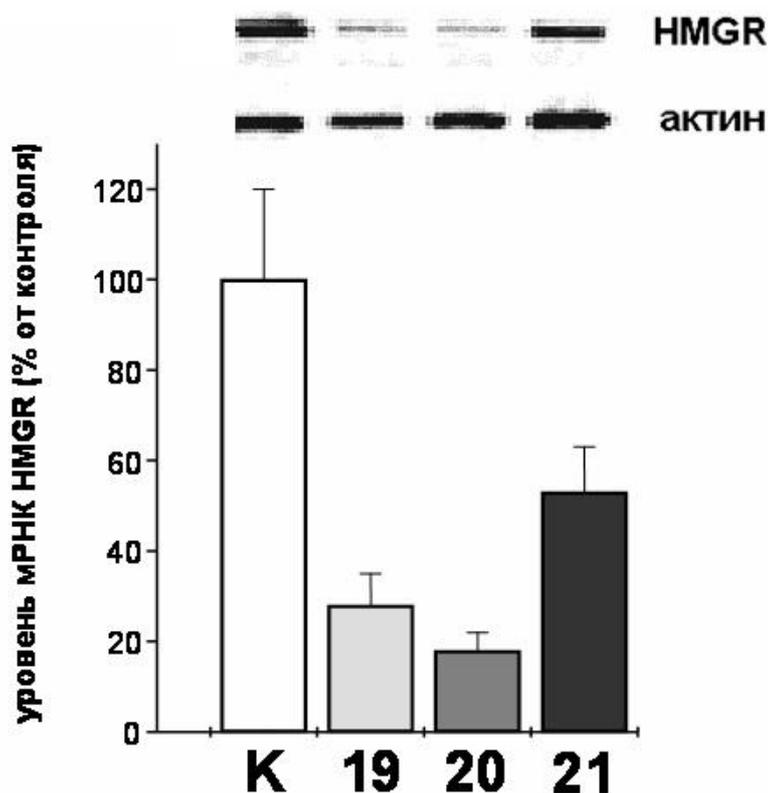


Рис. 13. Влияние соединений **19 – 21** в концентрации 5 мкМ на уровень мРНК HMG CoA редуктазы в клетках Нер G2 при 24 ч инкубации в бессывороточной среде.

Известно, что в клетках Нер G2 15-кетостерин слабо снижает уровень мРНК HMG CoA редуктазы [Киселева и соавт., 1999; Kisseleva et al., 1999]. Оказалось, что 15-кетопроизводные эргостана **19, 20** и **21** существенно снижали уровень мРНК HMG CoA редуктазы в клетках Нер G2 в концентрации 5 мкМ (рис. 13), причем эффект зависел от структуры стерина.

Тем не менее, очевидно, что влияние соединений **19 – 21** на уровень экспрессии гена HMG CoA редуктазы не является причиной ингибирования биосинтеза холестерина в клетках Нер G2 этими соединениями. Кетостерин **21** являлся самым мощным ингибитором биосинтеза холестерина, но снижал уровень мРНК HMG CoA редуктазы слабее, чем менее эффективные ингибиторы биосинтеза холестерина **19** и **20** (ср. рис. 12 и 13).

15-Кетостерин и (22E)-3β-гидрокси-5α-эргоста-8(14),22-диен-15-он **19** в концентрации 5 мкМ в присутствии 10% FCS не влияли на уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2. Однако оказалось, что кетостерины **20** и **21**, содержащие 22,23-эпоксигруппу, способны снижать уровень биосинтеза холестерина в клетках Нер G2, культивируемых в присутствии сыворотки.

На рисунке 14 представлены уровни биосинтеза радиоактивных липидов (холестерина, жирных кислот и триглицеридов) из [¹⁴C]ацетата в клетках Нер G2 в присутствии соединений **20** и **21**. Уровень биосинтеза холестерина был значительно снижен (52 ± 6 % и 57 ± 6 % от контроля, соответственно); содержание радиоактивных свободных жирных кислот составляло 76 ± 9 % и 79 ± 10 %, а триглицеридов - 125 ± 10 % и 131 ± 9 %, соответственно. По-видимому, присутствие соединений **20** и **21** не оказывало существенного влияния на биосинтез жирных кислот, но стимулировало их включение в триглицериды.

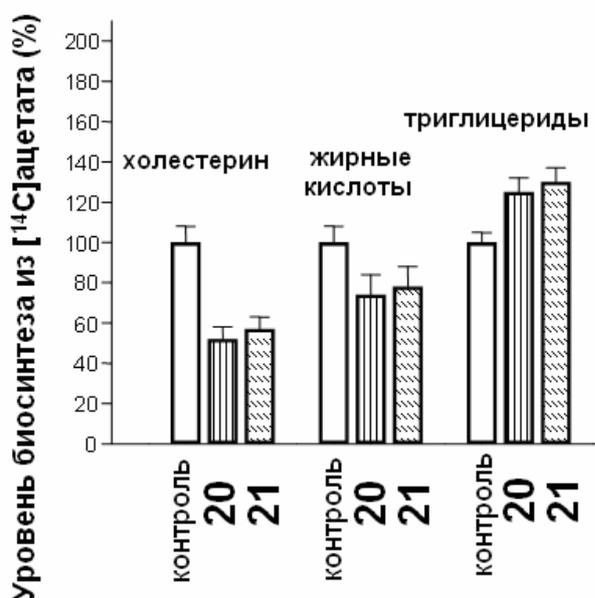


Рис. 14. Влияние соединений **20** и **21** в концентрации 5 мкМ на уровень биосинтеза холестерина, жирных кислот и триглицеридов в клетках Нер G2 при 24 ч инкубации в среде с 10% FCS. Контрольные значения (100 %) составляли: для холестерина - 40 100; для жирных кислот - 49 900; для триглицеридов - 106 000 (имп./мин на 1 мг клеточного белка за 6 ч).

Результаты, представленные в этом разделе, свидетельствуют, что Δ8(14)-15-кетопроизводные эргостана **19** – **21** эффективно подавляют биосинтез холестерина в клетках Нер G2, причем эффекты этих соединений существенно отличаются от эффектов 15-кетостерина. Среди новых Δ8(14)-15-кетопроизводных эргостана найдено соединение (**21**), ингибирующее биосинтез холестерина в 7 раз эффективнее, чем 15-кетостерин. В данной работе впервые показано, что Δ8(14)-15-кетопроизводные эргостана подавляют экспрессию гена HMG CoA редуктазы в клетках Нер G2. Кроме того, соединения **20** и **21** способны снижать уровень биосинтеза холестерина в клетках

Нер G2 в присутствии сывороточных липидов, то есть проявляли активность при культивировании клеток печени в условиях, близких к физиологическим.

5. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ 20 И 21 НА БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИЛОВЫХ ЭФИРОВ И АКТИВНОСТЬ АСАТ В КЛЕТКАХ НЕР G2

Соединения 20 и 21 оказывали различное влияние на биосинтез холестероловых эфиров (ХЭ) в клетках Нер G2, что было показано в экспериментах по оценке скорости биосинтеза ХЭ из радиоактивных предшественников - [^{14}C]ацетата и [^{14}C]олеата (рис. 15 и 16).

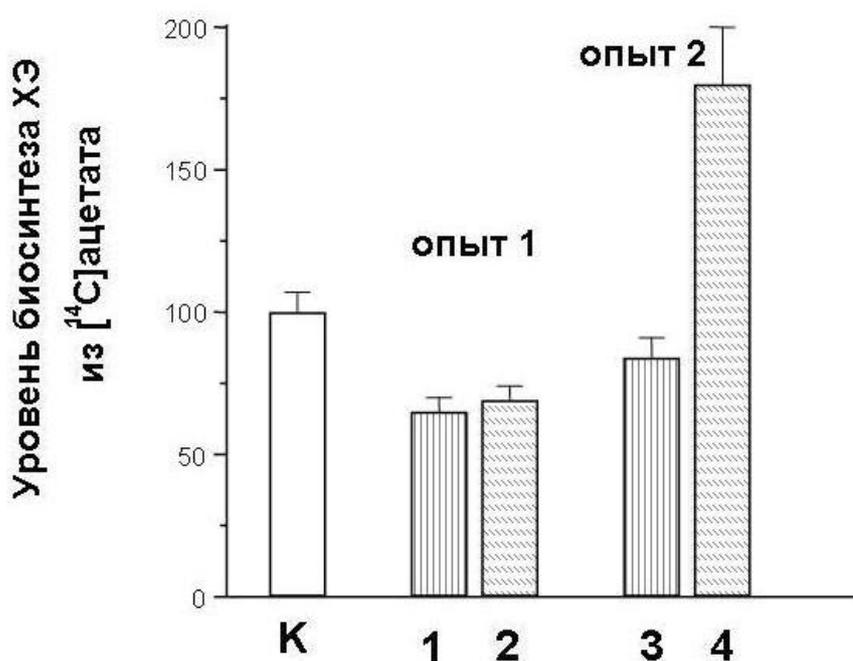


Рис. 15. Влияние соединений 20 и 21 на уровень биосинтеза ХЭ из [^{14}C]ацетата в клетках Нер G2, прединкубированных 24 ч в среде, содержащей 10% FCS и исследуемые соединения в концентрации 5 мкМ. К - Контрольное значение (100 %, 5500 имп./мин / 1 мг клеточного белка за 6 ч). 1 - Образование [^{14}C]ХЭ в клетках, обработанных соединением 20; 2 - образование [^{14}C]ХЭ в клетках, обработанных соединением 21 (опыт 1 проводился в отсутствие кетостеринов в среде). 3 - Образование [^{14}C]ХЭ в клетках, обработанных соединением 20; 4 - образование [^{14}C]ХЭ в клетках, обработанных соединением 21 (опыт 2 проводился в присутствии 5 мкМ кетостеринов в среде).

Очевидно, что включение радиоактивности во фракцию ХЭ зависит от скоростей биосинтеза холестерина и жирной кислоты, а также от скорости АСАТ-зависимого ацилирования холестерина. В опыте 1 (рис. 15) эффекты соединений 20 и 21 достоверно не различались, а включение радиоактивности во фракцию ХЭ было ниже, чем в контроле (65% и 69%, соответственно). Поскольку кетостерины подавляли включение [^{14}C]ацетата в холестерин (рис. 14), можно полагать, что прединкубация клеток с соединениями 20 и 21 не оказывает заметного влияния на биосинтез ХЭ. В опыте 2 (рис. 15) уровень биосинтеза ХЭ был выше, чем в опыте 1 - в присутствии

соединения **20** включение радиоактивности во фракцию ХЭ составляло 84 ± 8 % от контрольного, а в присутствии соединения **21** - $180\% \pm 15\%$ от контрольного.

Очевидно, что присутствие кетостеринов **20** и **21** во время инкубации клеток с радиоактивным предшественником, оказывает стимулирующее влияние на ацилирование холестерина (аналогично 25-гидроксихолестерину и некоторым другим оксистеринам [Miller, Melnykovich, 1984; Morin, Peng, 1992; Kisseleva et al, 1999]).

На рис. 16 представлено влияние соединений **20** и **21** на уровень биосинтеза ХЭ в клетках Нер G2 из $[^{14}\text{C}]$ олеата. Кетостерин **20** стимулировал включение $[^{14}\text{C}]$ олеата во фракцию ХЭ пропорционально концентрации; кетостерин **21** эффективно увеличивал включение радиоактивности во фракцию ХЭ в низких концентрациях (0 – 2 мкМ), но при более высоких концентрациях (3 – 6 мкМ) стимулирующий эффект пропадал. Низкий уровень биосинтеза холестерилвых эфиров при 18 мкМ соединения **21** можно объяснить тем, что в этих условиях проявляется общий цитотоксический эффект соединения, приводящий к ингибированию всех путей ацетатного биосинтеза.

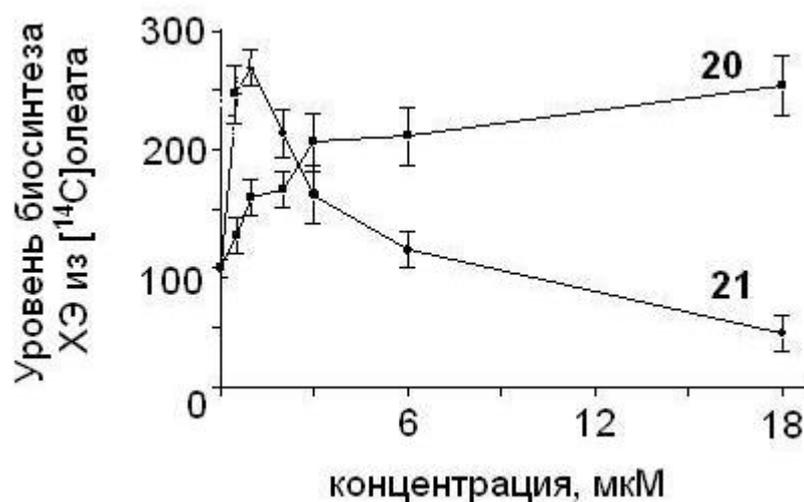


Рис. 16. Влияние соединений **20** и **21** на уровень биосинтеза ХЭ из $[^{14}\text{C}]$ олеата в клетках Нер G2 в среде, содержащей 10% FCS. Контрольное значение (уровень биосинтеза ХЭ в отсутствии исследуемых соединений), принятое за 100 %, составляло 1200 имп./мин / 1 мг клеточного белка за 6 ч.

Для определения влияния кетостеринов **20** и **21** на активность АСАТ мы использовали метод, основанный на реакции $[^{14}\text{C}]$ олеоил-СоА с холестерином, входящим в состав модельного субстрата, в присутствии лизата клеток Нер G2 в качестве источника фермента [Cadigan, Chang, 1988; Cheng et al., 1995; Zhang et al., 2003]. В качестве модельного субстрата были использованы фосфолипидные мицеллы, содержащие холестерин, 25-гидроксихолестерин (25НС), соединения **20** и **21**.

На рисунке 17А показано образование $[^{14}\text{C}]$ ХО в АСАТ-катализируемой реакции в отсутствие (прямая К) и в присутствии 25НС. Рассчитанные из графика скорости ферментативной реакции [$9.6 (\pm 1)$ пмоль ХО /мин/ 1 мг клеточного белка] и двукратный стимулирующий эффект 25НС на активность АСАТ, соответствовали описанным в работе [Cheng et al., 1995]. На рисунке 17Б показано образование $[^{14}\text{C}]$ ХО

в АСАТ-катализируемой реакции в отсутствие кетостеринов (прямая К), и в присутствии кетостеринов **20** и **21**.

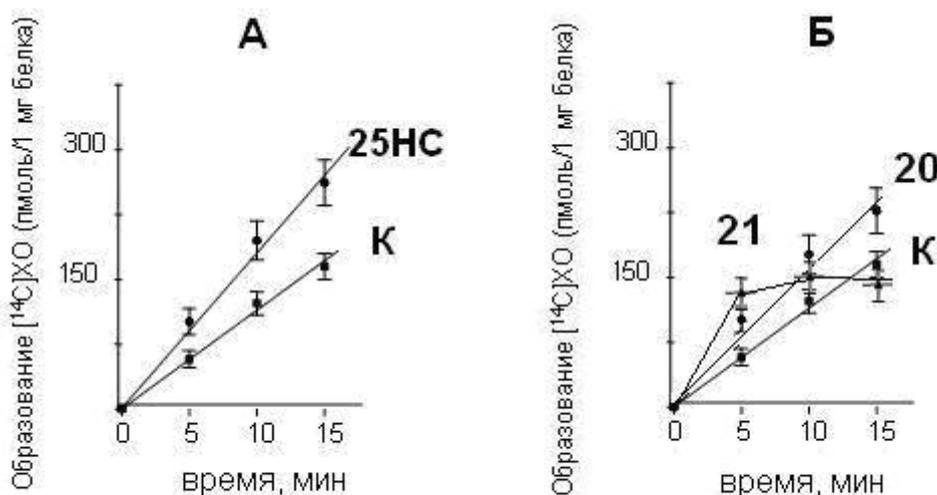


Рис. 17. А. АСАТ-зависимое образование $[^{14}\text{C}]\text{XO}$ в реакции $[^{14}\text{C}]$ олеоил-КоА и модельного субстрата, содержащего 50 мкг холестерина (К) или 50 мкг холестерина и 150 мкг 25НС (25НС).

Б. АСАТ-зависимое образование $[^{14}\text{C}]\text{XO}$ в реакции $[^{14}\text{C}]$ олеоил-КоА и модельного субстрата, содержащего 50 мкг холестерина (К); 50 мкг холестерина и 150 мкг кетостерина **20**; 50 мкг холестерина и 150 мкг кетостерина **21**.

В присутствии соединения **20** начальная скорость АСАТ-зависимого ацилирования холестерина сохраняла линейную зависимость от времени в течение 15 мин и превышала начальную скорость реакции в контрольном эксперименте на 45%. Стимулирующий эффект кетостерина **20** на активность АСАТ был ниже, чем эффект 25НС в тех же условиях. В присутствии соединения **21** скорость образования $[^{14}\text{C}]\text{XO}$ за первые 5 мин была значительно выше, чем в контроле. Однако при увеличении времени инкубации не наблюдалось дальнейшего увеличения $[^{14}\text{C}]\text{XO}$ (рис. 17Б). Последнее указывает на быструю инактивацию фермента.

Полученные результаты свидетельствуют, что 15-кетопроизводные эргостана **20** и **21**, содержащие 22,23-эпоксигруппу, регулируют биосинтез холестерилэфиров и активность АСАТ в клетках Нер G2, причем эффект зависит от стереохимической конфигурации атомов С22 и С23.

6. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ **20** И **21** НА МЕТАБОЛИЗМ ЭКЗОГЕННОГО ХОЛЕСТЕРИНА В КЛЕТКАХ НЕР G2

Следующей задачей являлась оценка влияния кетостеринов **20** и **21** на метаболизм экзогенного холестерина в клетках Нер G2. Схема опыта представлена на рис. 18.

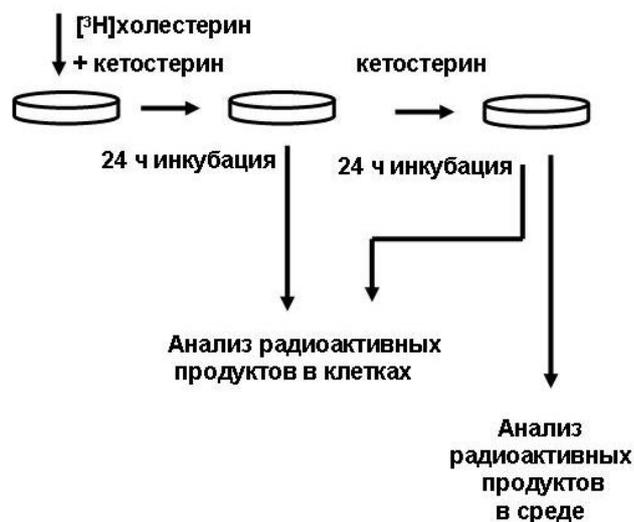


Рис. 18. Клетки Нер G2, прединкубированные 24 ч в среде, содержащей кетостерины **20** и **21** в концентрации 5 мкМ, инкубировали в той же среде в присутствии [³H]холестерина и кетостеринов в течение 24 ч, а затем еще 24 ч без радиоактивности в присутствии кетостеринов.

Присутствие соединений **20** и **21** не оказывало влияния на включение [³H]холестерина в клетки, а также на содержание радиоактивных метаболитов, образовавшихся в клетках за время 24 ч инкубации (рис. 19А). Последующее культивирование клеток, меченных [³H]холестерином, в среде без радиоактивности приводило к накоплению радиоактивных метаболитов в культуральной среде. В присутствии кетостеринов **20** и **21** содержание радиоактивных полярных продуктов (ПП) было повышено (156% и 175% относительно контроля, соответственно), а содержание радиоактивных холестероловых эфиров (ХЭ) не отличалось от контроля (рис. 19Б и 19В).

Результаты этого опыта продемонстрировали, что соединения **20** и **21** не оказывают заметного влияния на включение экзогенного холестерина в клетки Нер G2, а также на скорость обмена холестерина между клеточной мембраной и средой, однако стимулируют образование полярных продуктов из экзогенного [³H]холестерина. Последнее указывает на активацию окислительных процессов в клетке.

Влияние соединений **20** и **21** на уровень мРНК митохондриальной стерин-27-гидроксилазы (Сур27А1, ключевого фермента расщепления боковой цепи стерина, активность которого в клетках печени активируется некоторыми гормонами и метаболитами) и Сур3А4 (монооксигеназы, играющей важнейшую роль в катаболизме ксенобиотиков и освобождении клетки от токсичных метаболитов) представлено на рисунке 20.

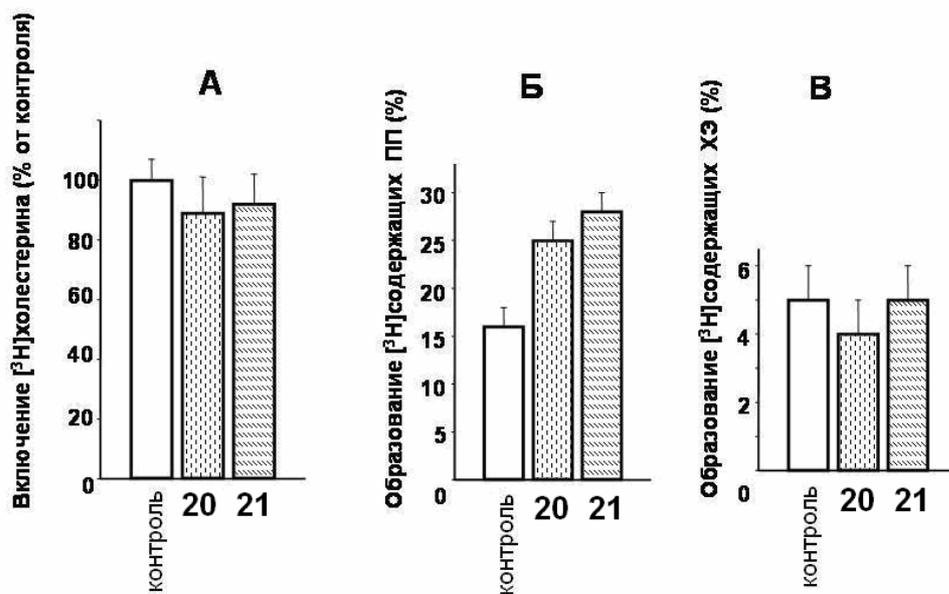


Рис. 19. А – Содержание радиоактивности в клетках Нер G2 после 24 ч инкубации в среде, содержащей [³H]холестерин в отсутствии (контроль) и в присутствии соединений **20** и **21**. Контрольное значение (100 %) составляло 611 300 (имп./мин на 1 мг клеточного белка).

Б - Содержание радиоактивных полярных продуктов после 24 ч инкубации меченых клеток в отсутствии (контроль) и в присутствии соединений **20** и **21**; значение для контрольной инкубации составляло 101 700 (имп./мин на 1 мг клеточного белка) - (16 %).

В - Содержание радиоактивных холестерилловых эфиров после 24 ч инкубации меченых клеток в отсутствии (К) и в присутствии соединений **20** и **21**; значение для контрольной инкубации составляло 29 000 (имп./мин на 1 мг клеточного белка) - (5 %).

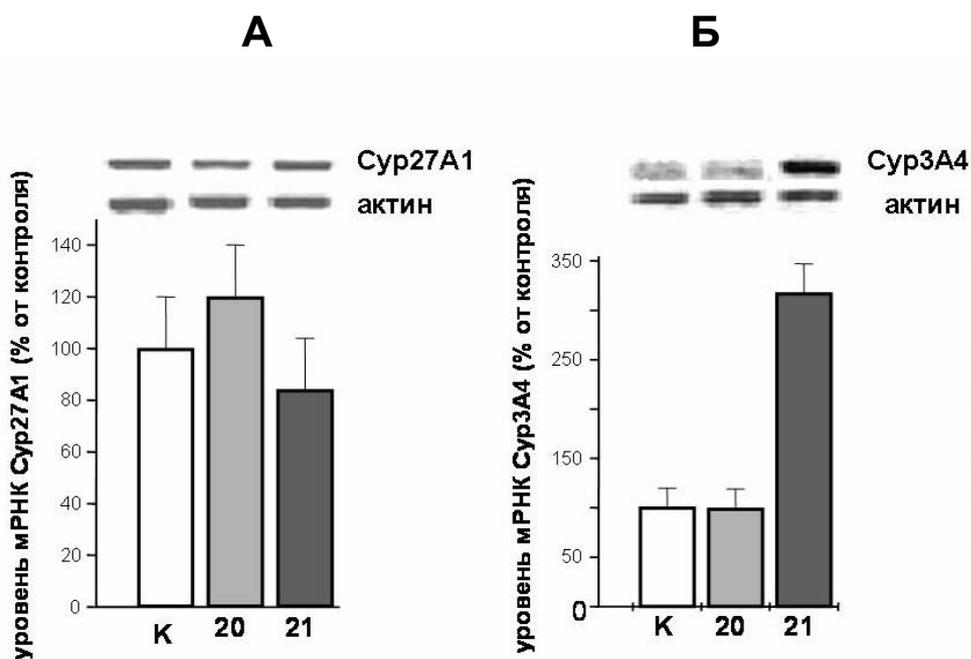


Рис. 20. Влияние соединений **20** и **21** в концентрации 5 мкМ на уровень мРНК Сур27А1 (А) и Сур3А4 (Б) в клетках Нер G2 при 24 ч инкубации в присутствии 10% FCS.

Кетостерин **20** не вызывал достоверных изменений в уровне мРНК Сур27А1 и Сур3А4 в клетках Нер G2, а кетостерин **21**, не влияя на уровень мРНК Сур27А1, значительно (в 3,2 раза) увеличивал уровень мРНК Сур3А4 (рис. 20). Мы полагаем, что этот эффект можно объяснить активацией ядерного рецептора PXR. В пользу этого предположения свидетельствует заметная цитотоксичность кетостерина **21**, а также известные данные [Shenou et al., 2004] о PXR-зависимой активации экспрессии гена Сур3А4 токсичными оксистеринами в клетках печени.

Результаты, представленные в этом разделе свидетельствуют, что эпоксисодержащие $\Delta 8(14)$ -15-кетопроизводные эргостана **20** и **21** стимулировали превращение экзогенного холестерина в полярные продукты в клетках Нер G2, при этом (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргоста-8(14)-ен-15-он-3 β -ол **21** увеличивал уровень мРНК Сур3А4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что ряд новых оксигенированных производных стигмастана и эргостана влияют на жизнеспособность и пролиферацию клеток млекопитающих в культуре и регулируют метаболизм липидов в клетках Нер G2. Среди новых оксигенированных производных эргостана и стигмастана найдены соединения с высокой биологической активностью. Производные стигмастана, содержащие (22R,23R)-22,23-диольную функцию, показали выраженный цитотоксический эффект в опухолевых клетках, причем данные, представленные в диссертации, позволяют заключить, что цитотоксичность соединения определяется особенностями конформации боковой цепи.

15-Кетопроизводные эргостана **19**, **20** и **21** оказались новыми эффективными регуляторами метаболизма холестерина в клетках Нер G2. Обращает на себя внимание различие в биологической активности изомерных (22S,23S)- и (22R,23R)- эпоксидов **20** и **21**. Соединения **20** и **21** существенно различались по способности регулировать уровень мРНК HMG CoA редуктазы и Сур3А4, ингибировать биосинтез холестерина, влиять на биосинтез холестероловых эфиров и активность АСАТ в клетках Нер G2.

Полученные в диссертации результаты указывают, что биологическая активность новых оксигенированных производных эргостана и стигмастана определяется участием этих соединений в функционировании сложных регуляторных комплексов, интегрированных во внутренние мембраны клетки.

ВЫВОДЫ

1. Среди 22 новых оксигенированных производных стигмастана и эргостана наибольшую цитотоксичность в клетках MCF-7 и Hep G2 проявляли соединения, содержащие (22R,23R)-диольную функцию; (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол проявлял высокую токсичность в клетках MCF-7.
2. Новые Δ 8(14)-15-кетопроизводные эргостана: (22E)-5 α -эргоста-8(14),22-диен-15-он-3 β -ол, (22S,23S)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол эффективно подавляли биосинтез холестерина и снижали уровень мРНК HMG CoA редуктазы в клетках Hep G2; ингибирующий эффект эпоксисодержащих кетостеринов проявлялся в условиях культивирования клеток в присутствии липидов и липопротеинов.
3. (22S,23S)-22,23-Оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол различно регулировали биосинтез холестероловых эфиров и активность АСАТ в клетках Hep G2.
4. (22S,23S)-22,23-Оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол и (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -ол стимулировали превращение экзогенного холестерина в полярные продукты в клетках Hep G2; инкубация клеток с (22R,23R)-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он-3 β -олом стимулировала экспрессию Сур3А4.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Дроздов Ф.В., Мехтиев А.Р., Морозевич Г.Е., Тимофеев В.П., Мишарин А.Ю. Цитотоксичные производные (22R,23R)-22,23-дигидроксистигмастана // Биоорган. химия. - 2007. - Т. 33. – С. 349-356.
2. Misharin A.Yu., Ivanov V.S., Mehtiev A.R., Morozevich G.E., Tkachev Ya.V., Timofeev V.P. Novel side chain modified $\Delta^8(14)$ -15-ketosterols // Steroids. – 2007. – V. 72. – P. 305-312.
3. Мехтиев А.Р., Морозевич Г.Е., Иванов В.С., Мишарин А.Ю. Влияние (22S,23S)- и (22R,23R)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-онов на биосинтез липидов и метаболизм экзогенного холестерина в клетках Hep G2 // Биомед. химия. – 2007. - Т. 53. – С. 221-227.
4. Мехтиев А.Р., Мишарин А.Ю. Биологическая активность фитостеринов и их производных // Биомед. химия. – 2007. - Т. 53. – С. 497-521.
5. Мехтиев А.Р., Козлова Н.И., Скрипник В.В., Мишарин А.Ю. Влияние (22S,23S)- и (22R,23R)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-онов на биосинтез холестероловых эфиров и активность ацил-КоА:холестерин-ацилтрансферазы в клетках Hep G2 // Биомед. химия. - 2008. - Т. 54. – С. 341-348.
6. Misharin A.Yu., Mehtiev A.R., Morozevich G.E., Tkachev Ya.V., Timofeev V.P. Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives // Bioorgan. Med. Chem. - 2008. - V. 16. – P. 1460-1474.
7. Дроздов Ф.В., Мехтиев А.Р., Пийр Е.А., Мишарин А.Ю. Цитотоксичные производные (22R,23R)-дигидроксистигмастана // Материалы Международной конференции “Биологические мишени для действия лекарственных препаратов нового поколения”. - Химки, 2006. – С. 40-42.
8. Мехтиев А.Р., Морозевич Г.Е., Дроздов Ф.В., Мишарин А.Ю. Токсичность новых оксигенированных фитостеринов в клетках гепатобластомы Hep G2 и карциномы молочной железы MCF-7 // Материалы 3-ей Международной научно-практической конференции «Новые технологии создания инновационных лекарств. От достижений «постгеномной эры» к национальным фармацевтическим брендам». - Химки, 2006. – С. 26.
9. Мехтиев А.Р., Морозевич Г.Е., Козлова Н.И., Чеглаков И.Б., Федченко В.И., Мишарин А.Ю. 22,23-Оксигенированные производные стигмастана и эргостана вызывают гибель клеток карциномы молочной железы MCF-7 // Материалы 4-ой Международной конференции «Постгеномные технологии разработки противоопухолевых агентов с новыми механизмами действия». – Химки, 2007. – С. 21.