Де Мария и Журнал «Трансляционная медицина» 2013, **11**:264



## http://www.translational-

## НАУЧНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Открытый Доступ

Полидатин, природный предшественник ресвератрола, приводит к аресту клеточного цикла и дифференциации колоректальных клеток человека Сасо-2.

Сальваторе Де Мария<sup>1,2+</sup>, Илария Сконьамильо<sup>3+</sup>, Анжела Ломбарди<sup>3</sup>, Никола Амодио<sup>4</sup>, Микеле Каралья<sup>3</sup>, Мария Картени<sup>1</sup>, Джанпьетро Раваньян<sup>1,5</sup> и Паола Стиузо<sup>3+</sup>.

#### Краткий обзор

Справочная информация: Человеческие клетки аденокарциномы кишечника не восприимчивы к химиотерапевтическим препаратам, таким как антрациклины, которые приводят к смерти при увеличении образования активных форм кислорода. Ряд исследований был направлен на химио-профилактическое применение ресвератрола в качестве антиоксиданта, направленного на борьбу с сердечно-сосудистыми заболеваниями, старением и раком. При этом цитотоксическое действие ресвератрола было обусловлено его прооксидантными свойствами. В этом исследовании мы изучаем, может ли сочетание Ресвератрола (транс-3,5,49-тригидроксистильбен) и его природный предшественник Полидатин. (ресвератрол-3-О-β-моно-D-глюкозид, форма глюкозида ресвератрола) иметь противоопухолевый эффект как на растущие, так и на дифференцированные клетки аденокарциномы кишечника человека.

**Методика:** Фармокологическое взаимодействие полидатина и ресвератрола изучалось in vitro на растущих и дифференцированных клеточных линиях Caco-2 посредством анализа среднего эффекта препарата, просчитывая коэффициент комбинации при помощи программного обеспечения CalcuSyn. Мы выбрали синергическую комбинацию и оценили ее влияние на биологические и молекулярные механизмы гибели клетки.

Результаты: Одновременное воздействие на полидатин и ресвератрол дало синергический антипролиферативный эффект, сравнимый с лечением одним препаратом. Мы показали, что полидатин в одиночку или в комбинации с ресвератролом в молярном соотношении 3:1 синергически регулирует оксидативный стресс, клеточный цикл, дифференцирование и апоптоз. Достойная внимания обработка полидатином вызвало ядерную локализацию и понизило экспрессию белка теплового шока 27 и виментин, распределенный внутри клетки.

Заключение: Согласно морфологическому и биохимическому результату мы получили доказательства того, что полидатин вызвал переход от пролиферативной морфологии к специфичным дифференцированным клеточным структурам и привел к гибели человеческой клетки CaCo2 путем индукции апоптоза. Наши данные предполагают потенциальное использование полидатина совместно с химиотерапией при раке кишечника человека.

Ключевые слова: рак кишечника человека, белок теплового шока 27 (hsp27), Дифференциация

## Введение

Колоректальный рак (CRC) остается ведущей причиной смертности среди многих народов и этнических групп по всему миру [1-3]. Клетки аденокарциномы, как и CRC клетки, невероятно устойчивы к разрушению, вызванному облучением или внутрирастительными, иммунологическими и химиотерапевтическими препаратами. Как следствие, опухоли трудно поддаются лечению и часто быстро размножаются даже в условиях, которые могут неблагоприятно повлиять на нормальные клетки. Механизмы, лежащие в основе преимущества выживания, могут быть частично связаны с высокой эндогенной экспрессией стрессовых белков. В отличие от нормальных клеток, базальный уровень индуцируемых белков теплового шока (HSPs) в опухолевых клетках зачастую выше [4,5]. Фитохимические вещества являются одними из наиболее перспективных химиопрофилактических вариантов терапии лечения рака. Идеальные по характеристикам химиопрофилактические/ терапевтические препараты – это специфическая модуляция аберрантных сигнальных путей через индукцию апоптоза [6].

- \* Электронная почта: paola.stiuso@unina2.it
- + Равные участники
- Кафедра Биохимии, Биофизики и Общей Патологии, Второй Университет Неаполя, Неаполь, Италия
  Полный список авторов представлен в конце статьи

©2013 Де Мария и др., лицензиат BioMed Central Ltd. Статья в открытом доступе, распространение согласно условиям лицензии Creative Common Attribution License (<a href="http://creativecommons.org/licenses/by/2.0">http://creativecommons.org/licenses/by/2.0</a>), которая позволяет неограниченно пользоваться данными, распространять и воспроизводить в любой среде, корректно цитируя.

#### http://www.translational-medicine.com/content/11/1/264

Ресвератрол (транс-3,5,49-тригидроксистилбен) и его природный предшественник Полидатин (ресвератрол-3-0-β-моно-D-глюкозид Происхождение Продукта: корень рейнутрии японской ( Poligonum cuspidatum) - фитоалексины, молекулы, полученные из семенных растений с целью защиты герминальных центров, плодовых культур и корней от грибковых заболеваний, бактерий и свободных радикалов [7]. Химически эти молекулы являются производными стильбена. В Ресвератроле 3 гидроксил-группы в положении 3,4 и 5 скаффолда стильбена, в то время как Полидатин находится в положении 3 глюкопиранозидного кольца. Позицию 3 замещают молекулой сахара таким образом, чтобы не нарушить функции поглощения гидроксистильбена (ISBs), это в значительной мере относится к 4' ОН. Воллерат и др. [8] обосновал, что ресвератрол может быстро увеличить выработку NO в культивированных эндотелиальных клетках. В физиологических концентрациях NO защищают слизистую желулочнокишечного тракта от повреждений. Действуя как антиоксидант, ингибирует лейкоцитарную адгезию, и поддерживает кровоток в слизистой [9,10]. При воспалении клетки эпителия кишечника подвергаются воздействию цитокинов, бактерий и многих других веществ, влияющих на функции клеток [11]. При этих условиях NO синтез II индуцируется в различных клетках, включая кишечный эпителий. NO синтез II способен генерировать высокую локальную внутриклеточную и внеклеточную концентрацию NO [12-14]. Как часть воспалительного процесса или сепсиса, активированные воспалительные клетки выработали большое количество анионов супероксида (O<sub>2</sub>). Избыточные NO и O<sub>2</sub> радикалы быстро вступают в реакцию, чтобы сформировать пероксинитрит (ONOO), чрезвычайно химически активную и токсичную молекулу [15-17]. Пероксинитрит способен нитрировать тирозиновые остатки в белках, таким образом нарушая сигнальные системы клеток, которые зависят от фосфорилирования тирозина [18,19]. Пищевые полифенолы с фенольными кольцами усваиваются пероксидазой и формируют прооксидантные фенокси- радикалы, которые достаточно химически активны, того чтобы оксидировать GSH или NADH, сопровождающиеся значительным поглощением кислорода и образованием АФК. Целью этой работы является исследование антиоксидации in vitro и антипролиферативных эффектов полилатина и ресвератрола по отдельности и в комбинации в клетках аденокарциномы CaCo2 кишечника. Эта клеточная линия не очень восприимчива к химиотерапевтическим препаратам, вызывающим смерть от оксидативного стресса. Более того широко принятой моделью для энтероцитов человека являются дифференцированные клетки CaCo2, они были использованы для того, чтобы характеризовать профиль безопасности компонентов в условиях селективности клеток [20,21]. Также мы исследовали действие подидатина и ресвератрода и их комбинаций на линии клеток аденокарциномы кишечника в условиях роста и апоптоза, дифференциации цикла клетки и модуляцию HSP27, iNOS и внутриклеточный уровень и распределение виментина.

## Материалы и методики Химические препараты

Все химические препараты высочайшего качества были произведены компанией Sigma Chemical Co. (Ст. Луис, США).

Транс-полидатин и транс-ресвератрол со степенью чистоты более 99% были предоставлены компанией Ghimas spa (Казалеккио, Болонья, Италия). Препараты изготавливались в соответствии с методикой, описанной в патенте EP 1 292 319 B1 и EP 1 292 320 [22,23].

#### Культура клеток

Сасо-2 (Американская коллекция типовых культур, Роквиль, Мэриленд, США) выращена при температуре 37°С в h- глюкозе МЕМ, содержащей: 1% (об%) незаменимых аминокислот и дополненных 10% (об%) дедополненной фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Флоу, МакЛин, Виргиния, США), 100 U mL-1 пенициллина, 100 мг mL-1 стрептомицина, 1% L-глютамина и 1% пирувата натрия. Клетки были выращены (17-21 пассажей) в увлажненной атмосфере 95% воздуха/ 5% СО2 при 37°С и в шести многолуночных планшетах разлой плотности клеток. После инкубации в течение 4 ч в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с 10% FBS, клетки были омыты 1% фосфатно-солевым буферным раствором с целью удаления неприкрепленных мертвых клеток, и были инкубированы с различной концентрацией транс-ресвератрола (транс-3,5,4′ – тригидроксистильбен) и транс-полидатина (транс-5,4′ – дигидроксистильбен-3-О-β-D глюкопиранозид). Все эксперименты были выполнены в трех экземплярах.

#### Чувствительность клеточных линий к гидроксистильбенам (ISBn)

Проведена оценка чувствительности тестируемых клеточных линий к ISBn при использовании микропланшетного колориметрического анализа, который измеряет способность живых клеток преобразовывать растворимую соль тетразолия (МТТ) в растворимый пурпурный формазан. Клетки были расположены с соответствующей плотностью (5 x 10<sup>3</sup> недифференцированные Caco-2 клетки в каждой лунке и 20 x 10<sup>3</sup> дифференцированные Сасо-2 клетки в каждой лунке) в 96-луночных планшетах для микротитрования. После 4 часов клетки подвергались воздействию различных концентраций ISBn на протяжении 24 часов. Затем 50 µL MTT (1 мг • mL-1) и 200 µL среды были добавлены к клеткам в каждую лунку. После 4 часов инкубации при 37°C среда была удалена, затем кристаллы формазана были солюбилизированы путем добавления 150 µL ДМСО и смешивания его в орбитальном шейкере в течение 5 минут. Абсорбция при 500 нм измерялась с помощью считывателя. Эксперименты были выполнены в трех экземплярах. Для проверки 0,5 % ДМСО было добавлено к необработанным клеткам.

## Исследование ISBn комбинации

Для исследования синергизма между транс- полидатином и трансресвератролом на задержку роста Сасо-2 клеток, клетки были помещены в 96-луночный планшет с соответствующей плотностью ( $5\times10^3$  недифференцированные Сасо-2 клетки в каждой лунке и  $20\times10^3$  дифференцированные Сасо-2 клетки в каждой лунке). После 24 часов инкубации при  $37^{\circ}$ С клетки подвергались воздействию различных концентраций полидатина (от 0 до  $500~\mu$ M) или ресвератрола (от 0 до  $500~\mu$ M) и их комбинаций ( $50:50,75:25,25:75~\mu$ 0 млярное соотношение полидатин: ресвератрол соответственно). Исследования комбинации препаратов основывались на кривых концентрации-эффекта, сформированных в качестве пилотной фракции выживших клеток в сравнении с концентрацией препарата после  $24~\mu$ 1 часов обработки.

#### http://www.translational-medicine.com/content/11/1/264

Оценка синергии количественного взаимодействия лекарственных препаратов проведена компьютерной программой Calcunsyn (Biosoft, Ferguson, MO). Значения коэффициента комбинации (CI) от < 1, 1 и > 1 показывают синергию, аддитивность и антагонизм соответственно [15]. Кроме того проанализирован особый вклад транс- полидатина и транс- ресвератрола на цитотоксический эффект комбинации путем расчета коэффициента потенцирования (РF), определяемого как отношение IC50 или транс- полидатина, или транс-ресвератрола к IC50 комбинации полидатина полидатина/ ресвератрола соответственно, как описано выше; более высокий PF показывает большую питопикличность.

#### Активность щелочной фосфатазы (ALP)

Активность ЩФ использовалась как показатель степени дифференциации Сасо-2 клеток человека. Прикрепленные и плавающие клетки были омыты и лизированы 0,25 % дезоксихолатом натрия, главным образом, как описано Герцем и др. [24]. Активность ЩФ была определена Sigma Diagnostics ALP реактива (№245). Общее содержание клеточного белка в образцах было определено в процессе микроанализа, описанного Бредфордом [25] с помощью набора реагентов Кумасси (Coomassie Protein Assay Reagent kit (Pierce). Активность ЩФ рассчитана в единицах активности на миллиграмм белка.

### Анализ нитритов

NO быстро преобразуется в стабилизированные нитрит и нитрат конечные продукты. Нитрит измерялся реакцией Грисса и описан Грином и др. [26]. Анализ нитрита в этой работе был описан Томез-Монтеррей И. и др.

## Анализ проточной цитометрии

Сасо-2 клетки были помещены в 6 мультилуночных планшетов с плотностью  $25 \times 10^5$  клеток в каждой лунке. После 24 часов инкубации с ISBn клетки были омыты в PBS, центрифугированы и непосредственно окрашены в растворе йодида пропидия (PI) (50 мг PI в 0.1 % NP40, pH 7.4) в течение 30 минут при 4°С в темноте. Проточный цитометрический анализ проводили с помощью FACScan проточного цитометра (Бектон Дикинсон, Сан Хосе, Калифорния, США). Для оценки цикла клетки собрали PI флуоресценцию в виде FL2 (линейной шкалы) при использовании программного обеспечения ModFIT (БЕКОН Дикинсон). Чтобы оценить содержание внутриклеточной ДНК, не менее 20000 событий для каждой точки были проанализированы по крайней мере в трех отдельных экспериментах, дающих SD менее 5%. Выработка супероксида аниона в митохондрии была определена путем окрашивания гидроэтидином (НЕ). Обработанные и необработанные клетки инкубировали на 1 час с 20 ng • mL-1 НЕ и повторно использованы, омыты дважды PBS и клеточную гранулу добавили к 1 mL PBS. Накопление HE- супероксида аниона (HE-O) измерено FACScan проточным цитометром (FACScan, Бекон Дикинсон) с применением программного обеспечения CellQuest. Для каждого образца было получено 2 х 104 событий. Анализ проводился в трех экземплярах как минимум в трех отдельных экспериментах.

#### Иммунная и конфокальная микроскопия

Выращенные Caco-2 клетки были фиксированы в PBS 4% параформальдегида, затем 5 минут пермеабилизированы с PBS 1% Triton. Иммунное окрашивание проводилось при помощи инкубации с антителами анти-iNOS, антиНsp27 и анти- виментина 1:1000 с последующим выявлением Су3-конъюгированных антител кролика к иммуноглобулину (Ig) G (Иммуноисследовательские лаборатории Джексона, Вест Грув, Пенсильвания) при разведении 1/200 на 45 минут. Клетки были исследованы под конфокальным микроскопом LSM-410 7eiss

#### Оценка апоптоза с помощью Вестерн- блот анализа

Клетки Сасо-2 были выращены в течение 24 часов с или без Ресвератрола и/ или полидатина в ранее описанных экспериментальных условиях. Для подготовки клеточных экстрактов их омывают дважды ледяным PBS/ BSA, повторно используют и центрифугируют в течение 30 минут при 4% в 1 мл лизирующего буфера (1% Triton, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, рН 7.5, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 7.4, 10 mM PMSF, 25 mM бензамидина, 1mM лейпептина, 0.025 U/ml апротинина). Равное количество клеток белков были разделены SDS-PAGE. Белки в геле согласно методу электрофоретического переноса (электроблоттинга) переведены в нитроцеллюлозу и вступили в реакцию с различными MAbs.

### Временная трансфекция

Клетки были помещены с плотностью  $3 \times 10^5$  в каждой лунке в 6-луночных планшетах (≈70% комбинации) и трансфектированы в тройном экземпляре при помощи трансфекционного реагента согласно протоколу производителя, как указано выше [27]. pcDNA.3.1-HA-myr-AKT-доминирующая активная конструкция или пустые векторы pcDNA-em-GFP, используемые в этой работе, описаны в Amodio N. и др7 [27]. Эксперименты проводились как минимум три раза.

## Статистический анализ

Значения выражены как среднее ± SE. Значение разницы между контрольным и каждым экспериментальным тестовым условием анализировали с помощью непарного Т-критерия Стьюдента и P < 0,05 считался статистически значимым.

## Результаты

## Действие гидрокси-транс-стильбена (ISBn) в Сасо-2 клеточных линиях

Мы оценили действие транс-полидатина (Pol) и транс-ресвератрола (Res) на ингибирование роста недифференцированных (экспоненциально растущих) и дифференцированных (постконфлюэнтных) Сасо-2 клеточных линий (Рисунок 1). Оба ISBn вызвали дозозависимое ингибирование роста на 24 часа с 72 и 192 µМ (IC50) Pol в растущих и дифференцированных клетках соответственно, в то время как IC50 в растущих и дифференцированных Сасо-2 клетках были 156 и 373 µМ концентраций Res соответственно (Таблица 1).

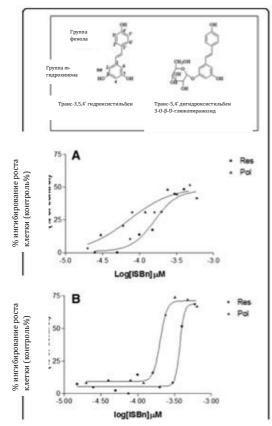


Рисунок 1 Влияние полидатина и ресвератрола на рост дифференцтрованных и растущих Сасо-2 клеток. Растущие Сасо-2 клетки (группа А) и дифференцированные Сасо-2 клетки (группа В) были обработаны в течение 24 часов повышенными концентрациями (0,2-300 µМ) полидатина и ресвератрола. Влияние на рост клеток выражалось в % ингибировании по отношению к необработанным клеткам (контроль). Рост клеток оценивали методом МТТ, как описано в "Материалах и методиках". Приведена структура транс-ресвератрола и его природного предшественника

В недифференцированных CaCo-2 клетках результат антипролиферативного эффекта выше в сравнении с дифференцированными клетками для двух ISBn, более того полидатин вышел более цитотоксичным по сравнению с ресвератролом в двух клеточных моделях.

Таблица 1 Действие полидатина (Pol), ресвератрола (Res), на рост преи пост-конфлюэнтных Caco-2 клеткок

Nes	150	1/5
Pol	72	192
	14	1.32

## Синергический антипролиферативный эффект комбинации полидатина/ ресвератрола

На основе этих результатов, мы оценили ISBn может быть синергическим, оказывая влияние на ингибирование роста Сасо-2 клеток. В частности проведена оценка ингибирования роста клеток под влиянием различных концентраций комбинации pol/res в течение 24 часов на Сасо-2 клеточную линию. Использовалась Calcusyn [28], программное обеспечение, для изучения синергизма наших препаратов. При помощи этого программного обеспечения синергические условия появляются при коэффициенте комбинации (CI) < 1.0. При CI < 0,5 комбинация чрезвычайно синергическая. Комбинация Pol и Res синергическая, когда обе смеси используются в больших концентрациях полидатина (pol/res молярное отношение = 3:1) на растущих Сасо-2 клетках (Рисунок 2А). С другой стороны антагонизм был записан при соотношении с более высокими концентрациями Res (данные не показаны). В синергической комбинации препарата CI50 (коэффициент комбинации рассчитывается для 50% жизнеспособных клеток с помощью анализа изоболограммы) был 0,88. Все комбинации Pol/ Res в различных молярных соотношениях были чрезвычайно синергичными на дифференцированных Сасо-2 (Рисунок 2 панель В). Данные результаты показывают, что синергизм на растущих Сасо-2 клетках только при соотношении полидатина/ ресвератрола 3:1, в дифференцированных Сасо-2 клетках очень сильный синергизм можно записать на пролиферации клетки при более высокой концентрации ресвератрола. Все последующие оценки были выполнены при 240 и 100 µМ Pol и Res соответственно (3:1 полидатин/ресвератрол молярное соотношение).

# ISBn комбинация влияет на арест клеточного цикла и дифференцирование растущих Caco-2 клеток

Воздействие ISBn на пролиферацию клетки может повлиять на клеточный цикл и индукцию запрограммированной гибели клетки. Чтобы изучить эту возможность, экспоненциально растущие Сасо-2 клетки были обработаны полидатином и ресвератролом как в отдельности, так и в комбинации и было проанализировано их влияние на клеточный цикл (Рисунок 3). Клетки, обработанные только полидатином или в комбинации с ресвератролом в течение 24 часов показали 27% увеличения количества Сасо-2 клеток в S-фазе, в то время как G1 популяция снизилась. Это заключение было дополнительно подтверждено ростом р21 экспресси в Сасо-2 клетках, обработанных ISBn комбинацией. Поскольку арест деления клетки одна из предпосылок дифференцирования клетки, было определено влияние ISBn на Caco-2 дифференцирование путем измерения активности щелочной фосфатазы (ALP) в качестве показателя дифференцирования энтероцитов, коррелируемых в постконфлуэнтной фазе [29]. В растущих Сасо-2 клетках и полидатин, и ресвератрол немного увеличивают АLP ферментную активность (Рисунок 3 группа В). Синергический эффект на активность ALP был записан в молярном соотношении 3:1 pol/res, в котором максимально было достигнуто 30% роста в сравнении с необработанными клетками. С другой стороны в дифференцированных клетках 250%, 70% и 300% активность ALP возросла с полидатином и ресвератролом в отдельности и ISBn комбинации обработанных клеток соответственно.

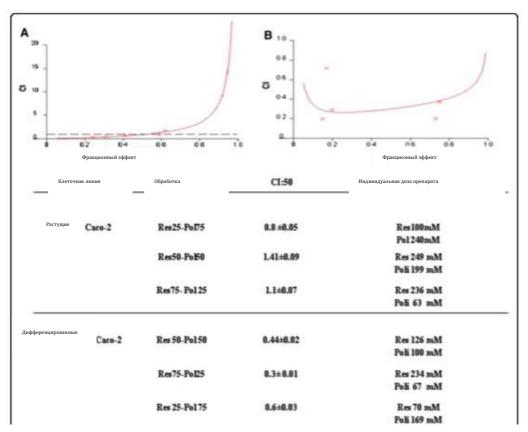


Рисунок 2 in vitro синергичное антипролиферативное влияние ISBn комбинации на растущие и дифференцированные Caco-2 клетки. Кривые CI/фракционного эффекта показали CI в сравнении с фракцией клеток пораженных/ погибших от комбинации полидатина и ресвератрола, повлиявшие на растущие (группа А) и дифференцированные Caco-2 клеточные линии (Группа В). Комбинированный анализ был проведен согласно методу, описанному Чоу и Талалэй (см. Материалы и Методики). Комбинации были синергичными при CI < 0.8. Показательный эксперимент проводился дважды для каждой клеточной линии; на рисунке указаны значения CI50.

## Антиоксидантное действие ISBn в Caco-2 клетках

Антиоксидантаное свойство ресвератрола и полидатина в отдельности или в комбинации были изучены на основе митохондриальных супероксид анионов, выработки внеклеточных NO и остаточных ферментов. На рисунке 4 изображены митохондриальные супероксид анионы (панель A), в растущих и дифференцированных Сасо-2 клетках после 24 часов обработки Pol, Res и их комбинациями (молярное соотношение 3:1 Pol/Res). В растущих CaCo-2 клетках полидатин определил сокращение митохондриальных супероксид анионов в 2 раза в сравнении с необработанными клетками (ctr), хотя Res повлиял на слабый рост супероксид анионов.

В растущих обработанных комбинацией Сасо-2 клетках ресвератрол умеренно антагонизировал сокращение супероксид анионов под воздействием полидатина. ISBs комбинации повлияли на синергический рост (р < 0,006) ТВАRS (показатели перекисного окисления липидов) в растущих Сасо-2 клетках в сравнении с необработанными клетками. В дифференцированных клетках полидатин и ресвератрол увеличивают пероксидацию липидов примерно в 4 и 2 раза соответственно, в то время как комбинированная терапия ISBn способствует дополнительному увеличению ТВАRS до 5 раз в сравнении с необработанными клетками (данные не показаны). Выработка свободных NO определяется в среде измерением устойчивых продуктов окисления NO<sub>2</sub>

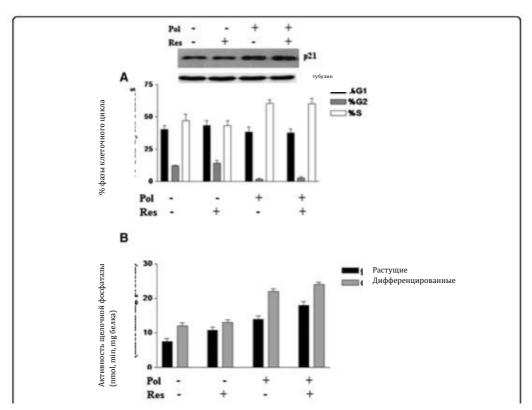


Рисунок ЗА Влияние ISBn в отдельности и в комбинации на перераспределение популяций растущих Сасо-2 клеток. Данные представляют процентное содержание клеточного цикла. Перераспределение клеточного цикла определено проточным цитометрическим анализом ДНК. Образцы экспоненциально растущих Сасо-2 клеток анализировались на протяжении 24 часов обработки 100 и 240 µМ ресваретрола и полидатина в отдельности и в комбинациях. Значения указывают на процентное содержание клеток в GO/G1, S и G2/М фазах. Представлены данные четырех различных исследований. В группе А Вестерн- блот анализ экспрессии Р21 белка и тубулина в стадии роста. В: Влияние ISBn на дифференциацию Сасо-2 клеток. Дифференциация Сасо-2 клеток оценивалась измерением ALP активности после 24 часов обработки 0,240 и 100 µМ Pol, Res и их комбинаций. Итоговые данные показаны значениями ± SEM: (n=4; \*P< 0.05) и оценены ALP активностью.

Только полидатин вызывает четырех и двухкратное увеличение выработки внеклеточного NO<sub>2</sub> в растущих и дифференцированных Caco-2 клетках соответственно (Рисунок 4B). С другой стороны комбинированная терапия ISBn способствует незначительному росту NO<sub>2</sub> в сравнении с обработкой только полидатином, такое снижение было более очевидным в растущих клетках, чем в дифференцированных (Рисунок 4 группа B). Обработка растущих клеток только ISBn или в комбинации приводит к значительному уменьшению Mn-SOD активности в дифференцированных клетках (Рисунок 4 группа D) в сравнении с необработанными контрольными клетками (СТR).

# Полидатин вызывает дифференциацию пре-конфлюэнтных клеток при помощи модулирования и клеточной локализации iNOS и HSP27 белка

iNOS индукция резко возросла в постконфлюэнтных (дифференцированных) Сасо-2 клетках [30]. При анализе конфокальной микроскопией уровень экспрессии iNOS в пре-конфлюэнтных Сасо-2 клетках низкий по сравнению с ISBn обработанными клетками (Рисунок 5 группа А). Полидатин воздействует на iNOS клеточную локализацию в периферии цитозола, между тем как ядерный фермент в обработанных ресвератролом клетках. В растущих Сасо-2 клетках, обработанных ISBn комбинацией iNOS накопились в периферийной и ядерной областях. HSP27 иммунное окрашивание преконфлюэнтных Сасо2 клеток показало гиперэкспрессию и цитоплазмическую локализацию с и без обработки ресвератролом (Рисунок 5 группа В).

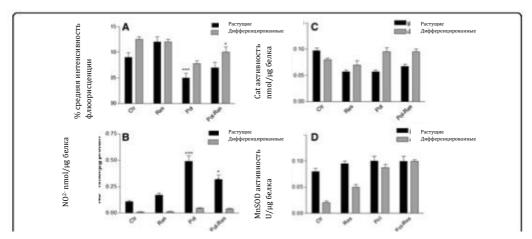


Рисунок 4 Влияние ISBn в отдельности и в комбинации на митохондриальные супероксид анионы, окись азота и активность фермента каталазы в Caco-2 клетках. (A) После 24 часов обработки Сасо-2 полидатином и ресвератролом в отдельности или в комбинации (240 и 100 µМ) при 37°С выработка митохондриального супероксид аниона была проанализирована НЕ (20 ng □mL-1)окрашиванием. Накопление краски исследовалось при помощи проточного цитометра FACScan (FACScan Becton Dickinson) и программного обеспечения CellQuest, а яркость полос выражала процент контроля. Для каждого образца были получены 2 х 10⁴ событий. (В) Окись азота измерялась в среде. Для оценки каталазы (С) и MnSOD активности использовались гомогенаты цельных клеток. Столбцы представляют собой средние величины ± SEM трех независимых экспериментов. Звездочки указывают на значительную разницу между обработанными образцами Сасо-2 по сравнению с контрольным значением. \*\*P < 0,003; \*P < 0,05.

Обработка только полидатином или в комбинации с ресвератролом, напротив, приводит к уменьшению экспрессии и ядерной локализации Hsp27 белка. В то же время 24 часовая обработка 240 микроМ полидатина вызвала перинуклеарное перераспределение и морфологическую перестройку филаментов Виментина.

# Синергическое влияние ISBn комбинации на ингибирование роста опосредовано апоптозом

Было показано, что HSP27 блокирует с-опосредованную активацию каспаз цитохромом [31], апоптотический эффект, индуцированный ISB обработкой, был изучен путем анализа активности каспазы-3. Активность каспазы-3 увеличилась в растущих Сасо-2 клетках, обработанных комбинацией (Рисунок 5 группа D) [31-33]. В выросших Сасо-2 клетках под Ресвератролом и Полидатином в течение 24 часов обнаружено выраженное расщепление поли (АДФ-рибозы) полимеразного белка (PARP), параллельное уменьшение полной длины изоформы белка (Рисунок 6). Аналогичные данные были записаны для каспазы 9, инициатора каспазы. Проведена оценка влияния ресвератрола и полидатина на терминальные ферменты жизнеобеспечивающего ras-зависимого сигнального пути MAPK, Erk-1 и Erk-2, и p-Erk-1 и p-Erk-2. Res вызвал несущественное увеличение Erk-1 и 2 параллельных снижения их активности. Pol в отдельности и в комбинации с Res вызвал резкое уменьшение Erk-1 и Erk-2 экспрессии и сильное увеличение их активности в преконфлюэнтных и пост конфлюэнтных клетках, согласно оценкам вестерн-блот анализа с использованием mAb, полученного из фосфорилированных / активированных изоформ двух ферментов (Рисунок 6).

После этого было оценено влияние отдельных агентов или комбинации на другой важный путь выживания, регулируемый газ, Akt / PKB сигнальными путями. Подробно изучена Akt экспрессия при помощи вестерн- блоттинга. Res в отдельности не вносит существенных изменений в Akt экспрессию, а Pol и комбинация вызвали почти полное снижение экспрессии фермента (Рисунок 6). Чтобы продемонстрировать, что полидатин может увеличить апоптоз общим уменьшением экспрессии и функции АКТ белка, был сгенерирован рост Сасо-2 клеток гиперэкспрессии АКТ при помощи транзиентной трансфекции с полнометражной кодирующей последовательностью доминантного положительного (конститутивно активированного) вектора гена АКТ. Как показано на Рисунке 7. и совокупный АКТ, и фосфорилированный АКТ были снижены в клетках транзиентной трансфекции только после обработки полидатином. При тех же экспериментальных условиях было зарегистрировано сопутствующее увеличение расщепленной формы PARP (Рисунок 7). Все эти данные показывают, что синергический эффект полидатина и комбинации Res/Pol в Caco-2 клетках сопровождается нарушением двух разных путей выживания и увеличением апоптоза.

## Обсуждение

Эпителий тонкого кишечника представляет собой высоко динамичную непрерывно обновляющуюся систему, весь процесс пролиферации, дифференциации, апоптоза происходит в течение 3-5 дней. Процесс дифференциации клеток можно имитировать in vitro с помощью Caco -2 клеточных культур.

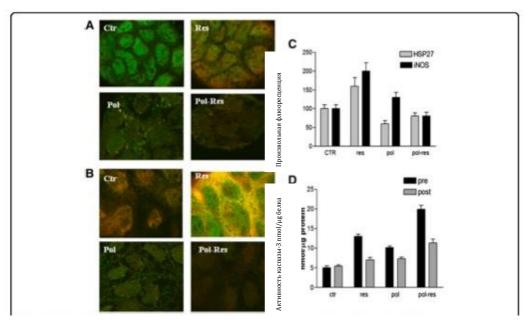


Рисунок 5 Конфокальный анализ обработанных ISBn растущих Caco-2 клеток, окрашенных для iNOS, hsp27 и виментина. Группа A: Субклеточная колокализация филаментов iNOS (красный) и виментина (зеленый) в Caco-2 клетках без ISBn (ctr) и с обработкой Pol, Res, и комбинацией Pol- Res. Клетки были инкубированы с антителами анти-виментина, анти- HSP27, и анти-iNOS. Изображения получены методом конфокальной микроскопии. Группа B: Субклеточная колокализация филаментов HSP-27 (красный) и виментина (зеленый) в Caco-2 клетках без ISBn (ctr) и с обработкой Pol, Res, и комбинацией Pol- Res. Клетки были инкубированы с антителами анти-виментина, анти- HSP27, и анти-iNOS. Изображения получены методом конфокальной микроскопии. Группа C: Уровни экспрессии белков показаны как насыщенность, измеряемая программным обеспечением Image J. Группа D: Активность каспазы-3 на растущие и дифференцированные Caco-2 клетки без ISBn (ctr) и с обработкой Pol, Res, и комбинацией Pol- Res. Активность Каспазы-3 определялась путем инкубации цельноклеточных экстрактов с 40 µM субстратом каспазы-3 и измерением выработки гидролизованных 7- амидо-4-метил- кумариновых (AMC) групп с помощью многоэтапного считывателя. Результаты представлены в четырех отдельных экспериментах; приведенные сводные данные являются средними величинами ± SEM.

Хотя раковые по происхождению, эти клетки проходят постепенный процесс дифференциации, который происходит самопроизвольно как только случается слияние. В наших предыдущих исследованиях изучены ISBn иммуномодулирующие [34], противовоспалительные [35], и антираковые [36-38] свойства в меланоме [36], рак груди [37] и рак кишечника [38], производные клеточные модели. В текущем исследовании показано, что полидатин сам по себе или в комбинации с ресвератролом оказывает совместный противоопухолевый эффект на обе растущие и дифференцированные Сасо-2 клеточные линии. Обстоятельно анализ роста клеток показал, что в одиночку полидатин имеет более сильную цитотоксичность (ІС50= 72 µМ), чем ресвератрол (ІС50= 156 иМ) в растуших Сасо-2 клетках. Синергический антипролиферативный эффект был достигнут только при молярном соотношении pol/res 3:1, как показал анализ среднего эффекта и расчет CIs, комбинации при молярном соотношении при 1 и 0,25 были антагонистическими. В дифференцированных Сасо-2 клетках IC50 достиг 192 и 373 µM Pol и Res соответственно, а анализ роста четко показал, что все pol/res комбинации в молярном соотношении были чрезвычайно

Устойчивость клеток аденокарциномы толстого кишечника человека к противоопухолевым препаратам, которые могут вызвать гибель клеток посредством оксидативного стресса, по крайней мере частично связана с высокой эндогенной экспрессией стресс-белков, включая семейство HSP.

Литература включает подробную документацию по антиоксилантному лействию (АО) ресвератрола [39]: однако дифференциальная локализация ресвератрола и полидатина в липидном бислое объяснила[40], что наблюдался синергический эффект. Очевидные противоречия, основанные на многочисленных докладах, обеспечивающих доказательство про-оксидантного эффекта Res. Res в качестве АО для липидов часто имеет про-оксидантное влияние на ДНК или белок. Прооксидантное действие Res может привести к аресту клеточного цикла или апоптозу. В наших экспериментальных условиях Res (100 µМ) проявляет про-оксидантные свойства, о чем свидетельствует увеличение митохондриального супероксид аниона, не сопровождающееся арестом клеточного цикла и апоптозом. Pol, с другой стороны, при 240 µМ после 24 часов влияет на значительное уменьшение митохондриального супероксид аниона в растуших Сасо-2 клетках, этот эффект смягчается при комбинации с Res.

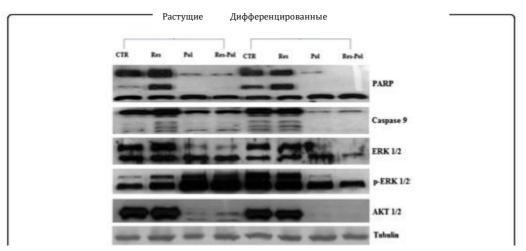


Рисунок 6 Влияние обработки ISBn на PARP, Каспазу 9, общий ERK ½, фосфорилированный ERK ½ (р- ERK), АКТ и экспрессию тубулина оценивалось методом Вестерн-блоттинга. Пре- и постконфлюэнтные Сасо-2 клетки подвергались обработке ISBn в отдельности или в комбинации в течение 24 часов. Полосы, выражающие экспрессию РАRP, Каспазы 9, ЕRK 1/2, фосфорилированного ERK ½ (р- ERK), АКТ и тубулина проявляются после 24 обработки ISBn.

3

Снижение ROS не коррелирует с повышением активности супероксиддисмутазы марганца (MnSOD) и, вероятно, связано с прямой антиоксидантной активностью полидатина. Снижение уровня митохондриального супероксид аниона сопровождалось увеличением выработки свободных NO. что свидетельствует о возможном участии Pol в регулировании баланса между NO и пероксинитрита. Защитное действие свободных NO наблюдалось в гепатокарциноме [41], HT-29 клеточной линии карциномы толстого кишечника человека [42], слизистой мочевого пузыря [43] и воспалительных клетках [44].

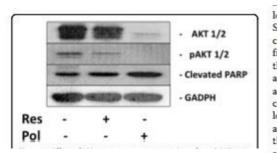


Рисунок 7 Влияние обработки ISBn на экспрессию общего АКТ-1/2, фосфо- АКТ- 1/2 и расщепленная изоформа ПАРП (PARP) в доминантной положительной АКТ- транзиентно трансфицированной Сасо-2 клетке (как описано в "Материалах и Методиках"). Клетки были обработаны Pol и Res в их IC:50 концентрациях в течение 24 часов, затем подготовлены для анализа методом Вестерн-блоттинга, как описано в « Материалах и методиках». GAPDH использовался в качестве транспортного контроля. Блоты показаны из одного репрезентативного эксперимента, полученного из трех различных экспериментов, которые дают всегда похожие результаты.

Повышенный уровень свободных NO может быть ответственен за динамику цитоскелета [45]и дифференциацию клеток [46]. Наши исследования говорят о том, что снижение жизнеспособности в растущих Сасо-2 клетках, вызванное полидатином, также указывает на клеточные структурные изменения. Мы наблюдали повышенную дифференциацию по ALP активности с сопутствующим перераспределением Виментина и HSP27 белков. Пре-конфлюэнтная Сасо-2 клеточная популяция, выжившая после обработки РоІ (240 µМ, 24 часа), имела ядерную локализацию HSP27 и наблюдался рост количества клеток в S- фазе. Все данные исследования показывают, что полилатин влияет на питотоксическую активность через механизмы воздействия, отличающиеся от ресвератрола. Кроме того, допустимо, что причиной гибели полидатин- индуцированных клеток стал апоптоз, как предполагала активация цистеиновой протеазы каспазы-3, являясь основным эффектором для апоптотических процессов, зарождающихся на клеточном мембранном и митохондриальном уровнях [47]. В действительности доказано, что полидатин повлиял на апоптоз в Сасо-2 клетках как вторичное воздействие после модуляции окислительного стресса. что в свою очередь вызвало перераспределение HSP27 и виментина и дифференциацию Сасо-2 клеток в энтероциты, указывая на дозозависимый переход от антиоксидантных эффектов к прооксидантным. Ресвератрол существенно увеличил экспрессию iNOS. Для определения механизмов, лежащих в основе pol- опосредованной гиперэкспрессии p21, было проведено тестирование активации ERK: важного регулятора р21 в других клеточных линиях [47]. В растущих Сасо-2 клеточных линиях полидатин и ресвератрол значительно увеличил ERK1/2 фосфорилирование и индуцировал каспазу-3, активировав апоптоз. Это воздействие, достигшее максимальной выраженности после 24 часов обработки, повлияло на сопутствующее уменьшение числа клеток. Снижение жизнеспособности клеток, вызванное двумя этими соединениями, также было связано со структурными изменениями клеток, вероятно. вызванными перестройками цитоскелета, которые могли оказаться причиной потери сигналов к выживанию клетки. Это подразумевает, что гибель клетки предшествовала соответствующим клеточным изменениям, влияющим на жизнеспособность и пролиферацию клетки. Кроме того есть предположение, что причиной гибели ISBsиндуцированных клеток стал апоптоз, как предполагала активация каспазы-3, являясь основным эффектором для апоптотических процессов, зарождающихся на клеточном мембранном и митохондриальном уровнях [48].

Способствование гибели клетки ERK активацией может исходить от подавления сигналов к выживанию клеток. Фосфатидилинозитол 3киназы/ Akt путь играет критическую роль в регуляции жизнеспособности клетки, а наибольший рост и факторы выживания активируют этот путь [49]. Недавно сообщалось, что вывод растворимых факторов выживания из первичных культур проксимальных трубчатых клеток почек мыши привел к активации ERK1/2, что сопровождалось постепенным снижением активности Akt и апоптоза [50]. Предлагалось мнение, что дифференцированная клеточная линия Сасо-2 может считаться подходящей моделью для нормальных клеток кишечника из-за ее способности приобретать фенотип зрелых мелких кишечных клеток [51,52]. Нами исследовано, что полидатин имеет хороший профиль по отоношению к селективности клетки, на самом деле он имел подобную и мошную цитотоксическую активность против растущих Сасо-2 клеточных линий, в то время как в дифференцированных Сасо-2 клетках он был в три раза менее мошным. Способность полидатина смешать недифференцированные Сасо-2 клетки в дифференцированные энтероциты, а затем проходить процесс запрограммированной гибели клеток, настоятельно рекомендует, что это соединение должно быть дополнительно исследовано для его потенциального использования в новой комбинированной химиотерапии при раке кишечника.

### Аббревиатуры

NO: окись азота, ТВА: 2-тиобарбитуровая кислота, САТ: Каталаза, ROS: Активные формы кислорода, SOD: Супероксиддисмутаза, iNOS: Индуцибельная синтаза оксида азота, HE: Гидроэтидин.

#### Конкурирующие интересы

Авторы заявляют, что конкурирующие интересы отсутствуют.

## Авторский вклад

SDM, SI, LA, CM, AN, CM, RGP и PS критически изучили рукопись и внесли существенный вклад в концепцию. Все авторы прочли и утвердили финальную версию рукописи.

## Сведения об авторе

<sup>1</sup>Оперативное Подразделение GLURES в Неаполе, Академический СПИН-ОФФ Университета Ка Фоскари в Венеции, Венеция, Италия. <sup>2</sup>Институт «Массимо Д'Азелио», Марано ди Наполи, Неаполь 80016, Италия. <sup>3</sup>Кафедра Биохимии, Биофизики и Общей Патологии, Второй Университет Неаполя, Неаполь, Италия. <sup>4</sup>Кафедра Экспериментальной и Клинической Медицины, Катанзарский Университет Маньа Граесиа, Катанзаро, Италия. <sup>5</sup>Кафедра Молекулярных Наук и Наносистем, Университет Ка Фоскари в Венеции, Венеция, Италия.

Получено: 23 Июля 2013 Принято: 8 Октября 2013 Опубликовано: 20 Октября 2013

#### Библиография

- Bamia C, Lagiou P, Buckland G, Grioni S, Agnoli C, Taylor AJ, Dahm CC и др.
   Средиземноморская диета и риск колоректального рака: результаты
   Европейской когорты. Eur J Epidemiol 2013. [Epub ahead of print] PubMed
   PMID: 23579425.
- Hu F, Li D, Wang Y, Yao X, Zhang W, Liang J, Lin C, Ren J, Zhu L, Wu Z, Li S и др.: Модификации ДНК и частота мутаций генов hMLH1 и hMSH2 при колоректальном раке у населения Северо-Восточного Китая. PLoS One 2013, 8(4):e60233.doi: 10.1371/journal.pone.0060233. Epub2013 Apr 3. PubMed PMID: 23573243; PubMed Central PMCID: PMC3616036.
- Zhu C, Bassig BA, Zaridze D,Boyle P, Dai M, Li Q, Zheng T: Когортный анализ происхождения раковых заболеваний восходящего и нисходящего отделов кишечника в Соединенных Штатах, 1973-2008. Cancer Causes Control 2013. Epub ahead of print] PubMed PMID: 23535866.
- Jolly C, Morimoto RI: Роль HSE и молекулярных шаперонов в онкогенезе и гибели клеток. J Natl Cancer Inst 2000, 92(19): 1564-1572. Review. PubMed PMID: 11018092.
- Claderwood SK, Khalegue MA, Sawer DB, Ciocca DR: HSP в раке: шапероны в канцерогенезе. Trends Biochem Sci 2006, 31(3):164-172. Epub 2006 Feb 17. Review. PubMed PMID: 1648378.
- Manson MM, Farmer PB, Gescher A, Steward WP: Инновационные препараты в профилактике рака. Новые результаты исследований в области рака. Fortschritte der Krebsforschung 2005, 166: 257-275.
- Zamora-Ros R, Andres- Lacueva C, Lamuela-Raventos RM, Berenguer T, Jakszyn P, Martinez C, Sanchez MJ, Navarro C, Chirlaque MD, Tormo MJ, Quiros JR, Amiano P, Dorronsoro M, Larranaga N, Barricarte A, Ardanaz E, Gonzalez CA: Концентрации ресвератрола и его производных в продуктах питания и оценка рациона питания испанского населения: Европейское перспективное исследование рака и питания (EPIC) – когорта Испании. Вг J Nutr 2008, 100(1): 188-196. Epub 2007 Dec 21. PubMed PMID: 18096094.
- Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Forstermann U: Ресвератрол, полифенольный фитоалексин, присутствующий в красном вине, усиливает экспрессию и активность эндотелиальной синтазы окиси азота. Circulation 2002, 106(13): 1652-1658.
- Russell J, Okayama N, Alexander JS, Granger DN, Hsia CJ: Предварительная обработка полинитроксил альбумином (PNA) препятствует ишемииреперфузии, индуцированной лейкоцитарно-эндотелиальной адгезии клеток. Free Radic Biol Med 1998, 12(2):153-159.
- Thom SR, Bhopale VM, Milovanova TN, Yang M, Bogush M, Buerk DG: Синтез- 2 окиси азота связан с киназой фокальной адгезии в нейтрофилах и влияет на активность ферментов и функцию β2 интегрина. J Biol Chem 2013, 288(7): 4810-4818.
- Маgrone T, JirilloE: Взаимодействие иммунной системы кишечника и микробиоты в норме и патологии: нутрицевтическое вмешательство с целью восстановления гомеостаза кишечника. Curr Pharm Des 2013, 19(7):1329-1342.
- Shaked H, Hofseth LJ, Chumanevich A, Chumanevich AA, Wang J, Wang Y, Tanuguchi K, Guma M, Shenouda S, Clevers H, Harris CC, Karin M: Хроническая эпителиальная NF-kB активация ускоряет APC потерю и кишечную инициализацию опухоли через iNOS регуляцию. Proc Natl Acad Sci USA 2012, 109(35):14007-14012. doi: 10.1073/pnas.1211509109. Epub 2012 Aug 14.
- Miki K, Kumar A, Yang R, Killeen ME, Delude RL: Внеклеточная активация аргиназы-1 снижает индуциреумую энтероцитами активность синтазы оксида азота при системном воспалении. Am I Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009, 297(4): G840-848. doi: 10.1152/ajpgi.90716.2008. Epub 2009 Aug 27
- Keklikoglu N, Koray M, Kocaelli H, Akinci S: Экспрессия iNOS в слизистой оболочке полости рта и желудочно-кишечного тракта. Dig Dis Sci 2008,53(6):1437-1442.
- Barbieri A, Palma G, Rosati A, Giudice A, Falco A, Petrillo A. Petrillo M, Bimonte S, Di Benedetto M, Esposito G, Stiuso P, Abbruzzese A, Caraglia M, Arra C: Роль эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) при хроническом стрессстимулированном росте опухоли. J Cell Mol Med 2012, 16(4):920-926. doi: 10.1111/j.1582-4935.2011.01375.x.
- Washo Stulz D, Hohlen N, Berstein H, Berstein C, Payne CM: Роль окиси азота и пероксинитрита в апоптозе желчи, индуцированном солью: актуальность для канцерогенеза кишечника.
- Saeki M, Kamisaki Y, Maeda S: Вовлечение митоген- активированной протеинкиназы в пероксинитрит-индуцированную гибель клеток нейробластомы SH-SYSY человека. Neurosci Res 2000. 38(2):213-216.

- 18. Ross GR, Kang M, Akbarali HI: Воспаление кишечника изменяет Src киназозависимые свойства одиночных каналов Ca2+ посредством нитрования тирозина. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010, 298(6): G976-984. 19. Kusaka G, Uno K, L=IIjima K, Endo H, Asano N, Koike T, Inatani A, Shimosegawa T: Роль окиси азота в индукции гомеобокса 2 каудального типа через рецептор эпидермального фактора роста в развитии пищевода Барретта. Scand J Gastroenterol 2012, 47(10):1148-1158. Epub 2012 Jul 27.
- 20. Cotter AA, Jewell C, Cashman KD: Влияние эстрогенов и биологически активных фито-эстрогенов на трансэпителиальный транспорт кальция в Сасо-2 клетках кишечника человека. Вг J Nutr 2003, 89(6):755-765.
- 21. Kamath AV, Darling IM, Morris ME: Поглощение холина в Сасо-2 клетках кишечника человека опосредовано переносчиками. J Nutr 2003, **133**(8):2607-2611
- 22. Ravagnan G, Falchetti R, Lanzilli G, Fuggetta MP, Tricarico M, Mattivi F: Применение экстрактов семенных растений с противоопухолевой активностью. Pat. EP 12923219B1.
- 23. Ravagnan G, Falchetti R, Lanzilli G, Fuggetta MP, Tricarico M, Mattivi F: Применение экстрактов семенных растений с иммуномодулирующей активностью. Pat. EP 1292320.
- 24. Herz F, Schermer A, Halwer M, Bogart LH: Алькалиновая фосфатаза в HT-29, линия раковых клеток толстого кишечника человека: влияние бутирата натрия и гиперосмолярности. Arch Biochem Biophys 1981, 210(2):581-591.
- 25. Bradford MM: Быстрый и сенситивный способ определения количества микрограмм белка при помощи метода окрашивания и связывания белков. Anal Biochem 1976, **72**:248-254.
- 26. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Анализ нитрата, нитрита и [15N]нитрата в биологических жидкостях. Anal Biochem 1982, 126(1):131-138.
- 27. Amodio N, Di Martino MT, Foresta U и др.: miR-29b сенсибилизирует множественные клетки миеломы к вызванному бортезомибом апоптозу посредством активации контура обратной связи с фактором транскрипции Sp1. Cell Death Dis 2012, 3:e436. doi:10.1038/cddis.2012.175.
- 28. Chou TC, Talalay P: Количественный анализ зависимостей дозового эффекта: комбинированное дейсвтие нескольких препаратов или ингибиторов ферментов. Adv Enzyme Regul 1984, 22:27-55.
- 29. Ding QM, Ko TC, Evers BM: Дифференциация Caco-2 клеток кишечника связано с арестом G1 и супрессией CDK2 и CDK4. Am J Physiol 1998, 275(5 Pt 1):C1193-C1200. 30. Morin MJ, Unno N, Hodin RA и др. Дифференциальная экспрессия индуцибельной синтазы окиси азота PHK вдоль оси крипта-ворсинки и продольной оси кишечника у эндотоксемических крыс.: . Crit Care Med 1998, 26:1258-1265.
- 31. Wink DA, Mitchell JB: Химическая биология окиси азота: концепция регуляторных, цитотоксических и цитопротекторных механизмов окиси азота. FreeRadic Biol Med 1998, 25 (4-5):434-456. Review.
- 32. Bruey JM, Ducasse C,Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA и др. **Hsp27 негативно регулирует гибель клеток путем взаимодействия с цитохромом с**: . Nat Cell Biol 2000, **2**:645-652.
- 33. Bryantsev AL, Loktionova SA, Ilyinskaya OP, Tararak EM, Kampinga HH, Kabakov AE: Распределение, фосфорилирование и активность Hsp25 в подверженных тепловому стрессу H9c2 миобластах: функциональная связь с цитопротекцией. Cell Stress Chaperones 2002, 7:146-155.
- 34. Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G: Влияние ресвератрола на иммунную функцию клеток человека. Life Sci 2001, 70 (1):81-96. 35. Lanzilli G, Cottarelli A, Nicotera G, Guida S, Racagnan G, Fuggetta MP: Противовоспалительный эффект ресвератрола и полидатина in vitro IL-17 модуляцией. Inflammation 2012, 35(1):240-248.
- 36. Fuggetta MP, D'Atri S. Lanzilli G, Tricarico M, Cannavo E, Zambruno G, Falchetti R, Ravagnan G: In vitro противоопухолевое действие ресвератрола в клетках меланомы человека, чувствительных или устойчивых к темозоломиду. Melanoma Res 2004, 14(3):189-196.
- 37. Lanzilli G, Fuggetta MP. Tricarico M, Cottarelli A, Serafino A, Falchetti RN, Ravagnan G, Turriziani M, Adamo R, Franzese O, Bonmassar E: Ресвератрол снижает рост и активность теломеразы клеток рака молочной железы in vitro. Int J Oncol 2006, 28(3):641-648.
- 38. Fuggetta MP, Lanzailli G, Tricarico M, Cottarelli A, Falchetti R, Ravagnan G, Bonmassar E: Влияние ресвератрола на пролиферативную и теломеразную активность раковых клеток толстого кишечника человека in vitro. J Exp Clin Cancer Res 2006, 25(2): 189-193.

- Коvacic P, Somanathan R: Разносторонний подход к биоактивности ресвератрола фокусируется на антиоксидантном действии, клеточной сигнализации и безопасности. Oxid Med Cell Longev 2010, 3(2):86-100.
- Fabris S, Momo F, Ravagnan G, Stevanato R: Антиоксидантные свойства ресвератрола и влияние на перекисное окисление липидов в мицеллах и моноламеллярных липосомах. Biophys Chem 2008, 135(1-3): 76-83.
- Caraglia M, Giuberti G, Marra M, Addeo R, Montella L, Murolo M, Sperlongano P, Vincenzi B, Naviglio S, Prete SD, Abbruzzese A, Stiuso P: Оксидативный стресс и ERK1/2 фосфорилирование, как предикторы исхода у пациентов с гепатоцеллюлярной карценомой, принимавших сорафениб плюс октреотид Лар. Cell Death Dis 2006, 20(6):765-773.
- Wenzel U, Kuntz S, Daniel H: Уровни окиси азота в предраковых колоноцитах человека определяют их чувствительность к противораковым препаратам. Mol Pharmacol 2003, 64(6):1494-1502.
- Andersson MC, Tobin G, Griglio D: Холинергические высвобождения окиси азота из слизистой оболочки мочевого пузыря в циклофосфамид индуцированный цистит у анестезируемых крыс. Вг J Pharmacol 2008, 153(7):1438-1444. doi: 10.1038/bjp.2008.6. Epub 2008 Feb 4.
- Ronchetti D, Borghi V, Gaitan G, Herrero JF, Impagnatielo F: NCX 2057 новое NO производное феруловой кислоты, устраняет воспалительные и ноцицептивные реакции в моделях in vitro и in vivo. Вг J Pharmacol 2009, 158(2):569-579. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00324.x. Epub 2009 Jul 7.
- Китагареli AR, Wang X: Генетические изменения сердца: шапероны и цитоскелет. J Mol Cell Cardiol 2004, 37(6): 1097-1109.
- Koti RS, Seifalian AM, McBride AG, Yang W, Davidson BR: Взаимосвязь оксигенации печеночной ткани с метаболизмом окиси азота при ишемическом прекондиционировании печени. FASEB J 2002, 16(12):1654-1656
- Zhu H, Zhang L, Wu S, Teraishi F, Davis J, Jacob D, Fang B: Индукция ареста S-фазы и гиперэкспрессия p21 малой молекулой 2[[3-(2,3-дихлорфенокси)пропил]амино] этанола в корреляции с активацией ERK. Oncogene 2004, 23:4984-4992.
- O'Sullivan MP, Tyner JW, Holtzman MJ: Апоптоз в дыхательных путях: еще один балансирующий акт в эпителиальной программе. Am J Respir Cell Mol Biol 2003, 29(1):3-7.
- Amaravadi R, Thompson CB: Киназы выживания Akt и Pim как потенциальные фармакологические цели. J Clin Invest 2005, 115(10):2618-2624
- Sinha D, Wang z, Ruchalski KL, Levine JS, Krishnan S, Lieberthal W, Shwartz JH, Borkan SC: Литий активирует Wnt и фосфатидилиностинол 3-киназа Akt, указывая пути повышения жизнеспособности клетки при отсутствии факторов выживания. Am J Physiol Renal Physiol 2005, 288(4):703-713. Epub
- Rousset M: Клеточные линии HT-29 и Сасо-2 карциномы толстого кишечника человека: две модели in vitro для исследования кишечной дифференциации. Biochimie 1986, 68(9):1035-1040. Review. No abstract available
- Stierum R, Gaspari M, Dommels Y, Ouatas T, Pluk H, Jespersen S, Vogels J, Verhoeckz K, Groten J, van Ommen В: Протеомный анализ выявляет новые белки, связанные с пролиферацией и дифференциацией колоректальной раковой клеточной линии Caco-2. Biochim Biophys Acts 2003, 1650(1-2):73-21.

doi: 10.1186/1479-5876-11-264

Цитировать данную статью как: Де Мария и др.: Полидатин, природный предшественник ресвератрола, приводит к аресту клеточного цикла и дифференциации колоректальных клеток человека Caco-2. Журнал Трансляционная Медицина 2013 11:264.