

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Открытый доступ

Противораковое действие *Caempferia parviflora*
на клетки рака яичников SKOV3Сутхасини Парами^{1,2}, Сиригут Сукхи³, Чумпоне Саконвасун³, Мингван На Такуатунг¹,
Питчая Мунгкорнасавакул^{4,5}, Вутигри Нимламул¹ и Сараньяпин Потиканонд^{1*}

Абстрактный

Предыстория: *Caempferia parviflora* (КП) — трава, произрастающая на севере Таиланда и используемая в народной медицине для повышения жизненных сил. Текущие отчеты показали противораковую активность КП. Однако противораковые эффекты КП при высокоагрессивном раке яичников не исследовались. Поэтому мы определили влияние КП на пролиферацию, миграцию и гибель клеток в клетках SKOV3.

Методы. Линию клеток рака яичников SKOV3 использовали для исследования противоракового действия экстракта КП. Жизнеспособность клеток, пролиферацию клеток, активность ММП, миграцию клеток и инвазию измеряли с помощью анализа МТТ, подсчета клеток, желатиновой зимографии, анализа заживления ран и анализов миграции и инвазии Transwell соответственно. Гибель клеток определяли с помощью теста исключения трипанового синего, аннексина V/PI с помощью проточной цитометрии и окрашивания ядер. Уровень фосфорилирования ERK и AKT, а также каспазы-3, каспазы-7, каспазы-9 исследовали методом вестерн-блоттинга.

Результаты: Экстракт КП был цитотоксичен для клеток SKOV3 при увеличении концентрации, и этот эффект можно было наблюдать даже при наличии EGF. Кроме того, время удвоения клеток было значительно увеличено в клетках, обработанных КП. Кроме того, КП сильно подавлял пролиферацию, миграцию и инвазию клеток. Эти последствия могут быть связаны со способностью КП ингибировать активность ММП-2 и ММП-9, определяемой с помощью желатиновой зимографии. Более того, КП в высоких концентрациях может индуцировать апоптоз клеток SKOV3, что подтверждается окрашиванием AnnexinV/PI и проточной цитометрией.

Соответственно, мечение ядер клеток, обработанных экстрактом КП, показало фрагментацию и деформацию ДНК. Индукция каспазы-3, каспазы-7 и каспазы-9 указывает на то, что КП вызывает гибель клеток посредством внутреннего апоптотического пути. Противоопухолевая активность КП может регулироваться посредством путей PI3K/AKT и MAPK, поскольку фосфорилирование AKT и ERK1/2 было снижено.

Выводы. Ингибирующее действие КП на клеточную пролиферацию, миграцию и инвазию клеток вместе с индукцией апоптотической гибели клеток в клетках SKOV3 позволяет предположить, что КП может стать новым кандидатом в качестве химиотерапевтического средства против рака яичников.

Ключевые слова: *Caempferia parviflora*, тайский черный имбирь, рак яичников, противораковая активность.

Актуальность

проблемы Рак яичников является одним из трех распространенных гинекологических видов рака во всем мире после рака шейки матки и матки. Тем не менее, это самая частая причина смерти среди этих трех гинекологических видов рака [2]. По сравнению с другими, рак яичников имеет самый неблагоприятный прогноз, при этом пятилетняя выживаемость составляет 44% на всех стадиях [3]. До 70% всех случаев рака яичников составляют карциномы высокой степени злокачественности.

которые агрессивно растут, быстро метастазируют и обладают высокой хромосомной нестабильностью [4, 5]. Бессимптомность или неспецифические симптомы на ранней стадии вместе с плохим методом скрининга делают рак яичников поздно диагностируемой опухолью. Химиотерапевтические препараты являются выбором лечения нерезектабельной опухоли. Однако они имеют много побочных эффектов, включая выпадение волос, утомляемость, угнетение костного мозга и кровотечения, которые могут снизить качество жизни пациентов [6]. Несмотря на то, что было разработано много новых химиопрепаратов, они менее доступны для многих пациентов из-за их высокой стоимости. Мы надеемся, что наши выводы об эффективных лекарственных растениях проверены in vitro.

* Переписка: saranyapin.p@cmu.ac.th; Spotikanond@gmail.com

¹ Кафедра фармакологии медицинского факультета Чиангмайского университета, Чиангмай 50200, Таиланд
Полный список сведений об авторе доступен в конце статьи.



может стать важным шагом, необходимым для перехода на следующий уровень открытия новых лекарств, а также дополнительным вариантом по разумной цене для пациентов с раком яичников.

Caempferia parviflora (КП) — это традиционное тайское растение семейства Zingiberaceae. Он широко известен как тайский черный имбирь или по-тайски «крачай дум». Ранее было продемонстрировано, что КП обладает несколькими фармакологическими эффектами, включая антиплазмодальные, противогрибковые, антимикобактериальные [7] и противораковые свойства [7–9]. Ранее мы описали противораковое свойство КП против клеток рака шейки матки HeLa, демонстрируя многообещающую возможность использования КП в качестве потенциального агента для лечения рака шейки матки [10]. Однако о противораковых эффектах КП против рака яичников еще не сообщалось. Это заставляет нас исследовать противораковые свойства КП в отношении клеточной линии рака яичников высокой степени злокачественности SKOV3, которая обладает высокой устойчивостью ко многим цитотоксическим агентам. Поскольку рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) сильно экспрессируется при раке яичников [11] и участвует в клеточной пролиферации, клеточной миграции, выживании клеток и метастазировании, поэтому мы изучили влияние КП на SKOV3 отдельно и под влиянием EGF на проверить, может ли КП преодолеть EGF-зависимые пути передачи сигнала роста и выживания. Тем не менее, также изучались молекулярные механизмы того, как КП подавляет рост опухоли и выживаемость. В частности, были определены эффекты КП на пути PI3K/AKT и MAPK, которые являются важными путями передачи сигнала для онкогенеза [12, 13].

Методы

Культура

Клетки рака яичников человека SKOV3 были получены от ATCC (ATCC, Манассас, Вирджиния, США) и поддерживались в среде RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, BRL, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки. (FBS) (Gibco BRL, США) и антибиотики (100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) (Кессон, США) и инкубировали при 37 °C во влажной атмосфере, 5% CO₂. Клетки пересевают каждые 2–3 дня.

Извлечение корневищ *Caempferia parviflora*

Корневища *Caempferia parviflora* с номером образца ваучера (R-CMUKP002), заверенным д-ром Ангхана Инта и депонированным на факультете естественных наук Чиангмайского университета, Таиланд, были собраны из жилища CMU-RSPG *Caempferia* в Чианге. Дао, провинция Чиангмай, Таиланд. Для экстракции измельченные корневища растения экстрагировали 95% этанолом при комнатной температуре (КТ) в течение 3 дней и фильтровали перед концентрацией с использованием роторного испарителя. После выпаривания растворителя спиртовая экстракция растений давала 9,85% сухого веса корневищ КП. Один миллилитр ДМСО был

используется для растворения 1 г экстракта КП с получением исходного раствора с концентрацией 1 г/мл. Исходный раствор КП предварительно разбавляли в среде перед каждой обработкой. Каждый эксперимент проводился с тремя независимыми партиями экстракта КП, каждая из которых анализировалась в трех повторностях. Конечная концентрация ДМСО поддерживалась на уровне ниже 0,5% по объему на протяжении всего эксперимента.

Анализ

жизнеспособности клеток. Цитотоксичность КП на клетках SKOV3 определяли с помощью МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид). Клетки высевали с плотностью 1×10^4 клеток на лунку в 96-луночные планшеты в течение ночи и обрабатывали КП или ДМСО (контроль носителя 0,006–0,1%) в четырех повторностях. В экспериментальной группе клетки инкубировали с полными средами, содержащими различные концентрации экстракта КП, в диапазоне от 0 до 10 мг/мл, в присутствии или в отсутствие 100 нг/мл EGF. Через 24 ч клетки инкубировали с реагентом МТТ 0,5 мг/мл (Applichem GmbH, Германия) в течение 1–3 ч. Супернатант культуры отсасывали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО. Поглощение измеряли при 570 нм с помощью гибридного многорежимного считывателя микропланшетов Synergy™ H4. Анализ жизнеспособности клеток проводили в 3 отдельных экспериментах.

Подсчет клеток

Клетки высевали в 24-луночные планшеты при плотности $0,05 \times 10^6$ клеток/лунку в культуральной среде и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C, 5% CO₂. Клетки обрабатывали экстрактом КП в нетоксичных концентрациях (0,01, 0,025 и 0,05 мг/мл). Общее количество клеток в разные моменты времени (0, 24, 48, 72 и 96 ч) подсчитывали с помощью гемоцитометра. Время удвоения клетки рассчитывали по следующей формуле: $\text{Время удвоения} = (\text{Время} \times \log 2) / (\log(\text{конечное число}) - \log(\text{начальное число}))$.

Желатиновая

зимография. Активность MMP-2 и MMP-9 исследовали с помощью желатиновой зимографии. Образцы супернатантов культур клеток SKOV3 (1×10^6 клеток в 3-сантиметровой чашке), инкубированных с различными концентрациями экстракта КП (0, 0,01, 0,05 и 0,1 мг/мл) в присутствии или в отсутствие EGF (100 нг/мл) в течение 24 часов. Супернатанты образцов культуры разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с 10% додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE), содержащего 0,1 мг/мл желатина В (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США) в невосстанавливающих условиях в условиях холодного течения. После электрофореза гели дважды (по 30 мин) инкубировали с 2,5% Тритоном X-100 при комнатной температуре и промывали 10 мМ Трис-буфером, pH 8,0, в течение 2 мин. Гели инкубировали с 1% желатиновым буфером (50 мМ Tris HCl, 10 мМ CaCl₂, pH 8) в течение ночи при 37°C.

Гели окрашивали 0,5% (масса/объем) куамасси бриллиантового синего R250 (Bio-Rad Laboratories) в 50% метаноле и

10% ледяной уксусной кислоты в течение 30 мин и обесцвечивали раствором для обесцвечивания (10% уксусная кислота и 50% метанол). Протеолитическую активность MMP-2 и MMP-9 визуализировали в виде прозрачных полос на синем фоне и анализировали с использованием программного обеспечения ImageJ.

Анализ заживления ран

Клетки SKOV3 ($0,5 \times 10^6$ клеток/лунку) высевали и культивировали в 24-луночных планшетах в течение 24 часов. Царапанную рану делали с помощью наконечника пипетки на 200 мкл. Клетки обрабатывали различными концентрациями экстракта КП (0,01, 0,05 и 0,1 мг/мл) в течение 24 часов. Изображения поцарапанных ран были получены в разные моменты времени (0, 12 и 24 ч). Закрытие расцарапанных ран считалось завершением миграционного процесса. Мигрированные области были проанализированы и определены с использованием программного обеспечения ImageJ.

Миграция клеток

Вставку для клеточных культур (8 мкм) (SPL Life Sciences, Южная Корея) использовали для подтверждения эффекта КП на подавление миграции клеток. Клетки с плотностью $0,3 \times 10^6$ клеток/лунку высевали в верхние камеры и культивировали в бессывороточных средах в течение 24 часов. На следующий день клетки верхней камеры обрабатывали различными концентрациями (0, 0,01, 0,05 и 0,1 мг/мл) КП в бессывороточной среде (CCM), а верхние камеры помещали в (нижние) лунки, содержащие RPMI с 5% FBS и инкубировали в течение 24 часов. Абсолютный метанол использовали для фиксации клеток в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем клетки окрашивали 0,5% кристаллическим фиолетовым в течение 30 минут.

Верхние камеры промывали 3 раза водой, клетки, прикрепившиеся к поверхности внутри камеры, удаляли ватным тампоном, а окрашенные клетки, прикрепившиеся к другой части камеры, захватывали и анализировали с помощью программы ImageJ.

Анализ клеточной

инвазии Эффекты КП на клеточную инвазию SKOV3 определяли с использованием вкладышей для клеточных культур (SPL Life Sciences, Корея). Поликарбонатные камеры инвазии (размер пор 8 мкм) покрывали Matrigel® Matrix (356 234, партия 4 272 006, Corning, Bedford, USA) на лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 1–4 часов. Клетки плотностью $0,25 \times 10^6$ клеток на лунку высевали на матригель с 0,01 и 0,05 мг/мл КП в бессывороточных средах и инвазионные камеры помещали в лунки (нижние), содержащие RPMI с 10% FBS, и инкубировали 20 ч. Затем клетки фиксировали абсолютным метанолом в течение 5 мин при комнатной температуре и окрашивали 0,5% кристаллическим фиолетовым в течение 15 мин. После трех промывок водой клетки в камерах для инвазии удаляли ватным тампоном, а фотографии окрашенных клеток, прикрепленных к другому участку камеры для инвазии, были сделаны и проанализированы с помощью программного обеспечения ImageJ.

Тест исключения трипанового

синего Клетки высевали с плотностью $0,05 \times 10^6$ клеток/лунку в 24-луночные планшеты и инкубировали с различными цитотоксическими концентрациями (0, 0,05, 0,1 и 0,25 мг/мл) экстракта КП. Клетки собирали через 3, 6, 12, 24 и 48 ч инкубации. К суспензиям клеток добавляли раствор трипанового синего (Gibco, США) в соотношении 1:1. Общее количество клеток и мертвые клетки (окрашенные синим цветом) подсчитывали с использованием гемоцитометра. Рассчитывали процент живых клеток и мертвых клеток.

Анализ клеточного

апоптоза Апоптоз клеток оценивали с помощью окрашивания аннексин-V-FITC/йодид пропидия (PI). Клетки высевали с плотностью $0,3 \times 10^6$ клеток/лунку в 3-сантиметровые чашки для культивирования клеток и культивировали в течение 24 ч. Клетки обрабатывали экстрактом КП различной концентрации (0, 0,1, 0,3 и 0,5 мг/мл) в течение 12 ч. Клетки собирали и ресуспендировали в 1X буфере для связывания аннексина-V (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 5 мМ EDTA, 0,5 мМ DTT, 50% глицерин). Клетки инкубировали с аннексином V-FITC (ImmunoTools, Германия) и йодидом пропидия (PI) (Sigma Aldrich) в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре перед проведением проточной цитометрии.

Окрашивающие

ядра клетки SKOV3 высевали при плотности $0,5 \times 10^6$ клеток/лунку на покровные стекла в течение 24 часов. Клетки обрабатывали экстрактом КП в разных концентрациях (0,1, 0,3 и 0,5 мг/мл) и инкубировали в течение 7 часов. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом/PBS при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем клетки трижды промывали и инкубировали с 5 мкг/мл Hoechst 33342 в PBS (Thermo Fisher Scientific, Таиланд) в течение 1 часа. После окрашивания предметные стекла дважды промывали PBS по 5 мин каждый раз и монтировали в среду Fluoromount (SouthernBiotech, США). Клетки наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа AX70 Olympus R, Япония, с 40-кратным увеличением, и микрофотографии получали с помощью базового программного обеспечения DP-BSW для цифровой камеры микроскопа DP71.

Вестерн-блот-анализ Клетки

SKOV3 высевали в 3-сантиметровые чашки при плотности $0,3 \times 10^6$ клеток/лунку в течение 24 часов. На следующий день среду меняли на SFM и клетки культивировали в течение 24 часов. Клетки обрабатывали экстрактом КП в нетоксичных концентрациях (0,01 и 0,05 мг/мл) в течение 6 ч и добавляли в лунки 100 нг/мл EGF за 15 мин до сбора клеток. Клеточные лизаты готовили путем добавления 300 мкл 1X восстанавливающего буфера Лэммли и нагревания при 95°C в течение 5 мин. Клеточные лизаты разделяли с помощью SDS-PAGE в течение 90 мин при 140 В и переносили на мембраны PVDF (Immobilon-P; Millipore, Бедфорд, Массачусетс) на 120 мин при 100 В. После электрофореза мембраны блокировали 5% обезжиренным молоком в TBS, содержащие 0,1% твин-20 (TBST) при комнатной температуре в течение 1 часа. Блоты инкубировали с первичными антителами (1:10000).

анти-β-актина, 1:5000 анти-pERK1/2, 1:5000 анти-pAKT, 1:5000 анти-ERK1/2, 1:5000 анти-AKT, 1:3000 каспазы-3, или каспаза-7, или каспаза-9) при 4 ° C в течение ночи. Анти-β-актин был получен от US biological (США), а остальные антитела были приобретены у Cell Signaling Technology (США). Мембраны промывали и инкубировали с антимышиным Ig, конъюгированным с IRDye@800CW (1:5000), или антикроличьим Ig, конъюгированным с IRDye@680RT (1:5000), при комнатной температуре в течение 2 часов. Иммунореактивные полосы визуализировали с помощью Odyssey® CLx Imaging System - LI-COR Biosciences (США). Полосы были проанализированы с помощью Image Studio Lite.

Статистический анализ

Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Данные были проанализированы с помощью одностороннего ANOVA, и значение P < 0,05 считалось статически значимым.

Результаты Влияние КП на жизнеспособность клеток

SKOV3 и клеточную пролиферацию. Чтобы исследовать противоопухолевые свойства КП, мы сначала оценили его цитотоксичность по отношению к SKOV3 с помощью анализа МТТ. Мы обнаружили, что клетки, обработанные экстрактом КП в различных концентрациях (0,006–1 мг/мл) в течение 24 ч, демонстрировали значительное снижение жизнеспособности клеток в зависимости от концентрации в диапазоне от 0,09 мг/мл до 1 мг/мл, как показано на рис. Рис. 1a. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC50) экстракта КП составила 0,53 ± 0,08 мг/мл. Поскольку рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который в высокой степени экспрессируется в клетках рака яичников, является очень важным фактором для роста опухоли [11], поэтому мы стимулировали клетки SKOV3 с помощью EGF и провели анализ МТТ, чтобы оценить, способна ли КП по-прежнему подавлять жизнеспособность клеток. Как показано на рис. 1b, EGF значительно увеличивал жизнеспособность клеток примерно на 15%. Интересно, что в присутствии EGF КП по-прежнему демонстрировал сильное подавление роста в зависимости от концентрации. Контрольный носитель, ДМСО, при всех концентрациях не проявлял никакого цитотоксического действия. IC50 экстракта КП в присутствии EGF составляла 0,63 ± 0,08 мг/мл, что сходно с IC50 при лечении КП без EGF. Далее мы провели подсчет клеток через 24, 48, 72, 96 ч после обработки КП и обнаружили, что экстракт КП значительно снижает количество клеток в зависимости от концентрации (рис. 2). Эти наблюдения все еще наблюдались при лечении в присутствии EGF. Количество клеток из разных моментов времени использовали для расчета времени удвоения, которое представляет собой время, необходимое для деления клетки от одной до двух клеток. Время удвоения клетки SKOV3 составляло примерно 24 часа. Интересно, что клетки, обработанные КП в дозах 0,025 и 0,05 мг/мл, значительно увеличили время удвоения клеток, до 32,5 и 31,5 часов соответственно.

Влияние КП на ингибирование активности MMP-9 и MMP-2

Затем мы определили, подавляет ли экстракт КП активность MMP-9 и MMP-2. Данные зимографического анализа показали, что клетки, обработанные экстрактом КП в дозах 0,01 и 0,05 мг/мл, снижали активность MMP-9 до 92,52 ± 8,55% и 81,92 ± 5,18%, а активность MMP-2 до 88,66 ± 6,17 и 68,83 ± 6,17% соответственно. Рис. 3a и б). EGF в дозе 100 нг/мл сильно повышал активность MMP-2 и MMP-9 более чем на 140%. Как мы и ожидали, экстракт КП в присутствии EGF по-прежнему способен подавлять активность MMP-9 и MMP-2. Процент снижения активности MMP-9 составил 113,97 ± 10,7 и 106,64 ± 9,9 мг/мл, а активности MMP-2 составил 121,4 ± 4,7 и 104,01 ± 10,12 мг/мл для клеток, обработанных КП в дозах 0,01 и 0,05 мг/мл соответственно. Иммунореактивные полосы β-актина, обнаруженные Вестерном, указывали на одинаковое количество клеток во всех обработанных группах.

Влияние КП на ингибирование миграции и инвазии клеток.

Основываясь на том факте, что MMP-9 и MMP-2 являются решающими факторами миграции и метастазирования опухоли, мы провели анализ заживления ран для изучения миграции клеток и обнаружили, что клетки, обработанные КП в 0,01, 0,05 и 0,1 мг/мл эффективно снижали процент миграции клеток до 58,30 ± 5,8, 52,91 ± 5,32 и 40,50 ± 9,27% соответственно (рис. 4a и б). Кроме того, мы подтвердили способность КП ингибировать миграционную функцию клеток SKOV3 с помощью анализа миграции Transwell. Результаты показали, что клетки SKOV3 без какой-либо обработки могли мигрировать через верхнюю лунку в нижнюю камеру.

Однако количество мигрирующих клеток было резко снижено в клетках, обработанных экстрактом КП, тогда как контрольный носитель не проявлял какого-либо ингибирующего действия на миграцию клеток SKOV3 (рис. 4c и d). Влияние КП на инвазию клеток определяли с помощью анализа Transwell в присутствии матригеля. Подобно анализу миграции клеток, клетки, обработанные КП 0,01 и 0,05 мг/мл, показали снижение процента клеточной инвазии до 44,42 ± 2,37% и 30,46 ± 2,23% соответственно (рис. 4e и f), в то время как носитель ДМСО не показал значительный ингибирующий эффект на клеточную инвазию.

Влияние КП на ингибирование путей передачи сигнала роста и выживания. Несколько сигнальных молекул участвуют в процессах роста и выживания клеток в ответ на стимуляцию EGF.

Эти молекулы включают белки ERK1/2 и AKT.

Поэтому мы исследовали возможный механизм, лежащий в основе КП, который подавляет рост клеток SKOV3. Как показано на рис. 5, мы обнаружили, что клетки, обработанные КП в дозе 0,01 и 0,05 мг/мл, демонстрировали снижение фосфорилирования ERK1/2 до 0,85 ± 0,02 и 0,64 ± 0,031 соответственно. Несмотря на то, что EGF сильно стимулирует фосфорилирование ERK1/2

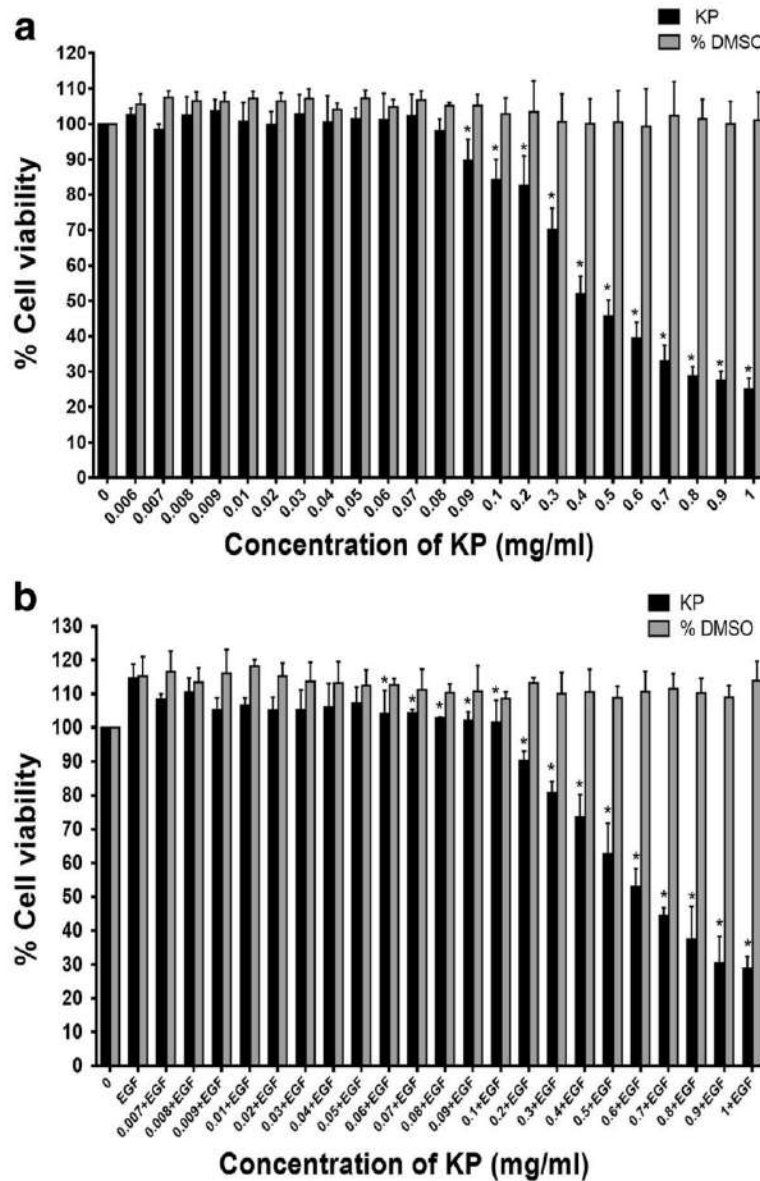


Рис. 1. Цитотоксическое действие различных концентраций этанольного экстракта КП на клетки SKOV3 без EGF (а) и с 100 нг/мл EGF (б). Все данные были получены из 3 независимых экспериментов и представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для каждого четырехкратного повторения $p < 0.05$ по сравнению с контролем (без лечения и EGF)

фосфорилирование (в 2,6 раза), КП в дозах 0,01 и 0,05 мг/мл смог снизить фосфорилирование ERK1/2 до $2,38 \pm 0,22$ и $2,21 \pm 0,23$ соответственно. Более того, экстракт КП в дозах 0,01 и 0,05 мг/мл снижал фосфорилирование АКТ до $0,87 \pm 0,04$ и $0,58 \pm 0,03$ без присутствия EGF и до $0,89 \pm 0,04$ и $0,7 \pm 0,07$ в присутствии EGF соответственно.

Влияние КП на индукцию апоптотической гибели клеток.

Поскольку анализ жизнеспособности клеток показал цитотоксичность экстракта КП в концентрациях более 0,1 мг/мл. Таким образом, мы исследовали, увеличивает ли экстракт КП гибель клеток при использовании

тест на исключение синего. Мы обнаружили, что клетки, обработанные экстрактом КП в концентрации 0,1 и 0,25 мг/мл, значительно увеличивали гибель клеток через 24 часа инкубации. Процент гибели клеток составил $15,67 \pm 2\%$ и $26,33 \pm 3,5\%$ при обработке КП в дозах 0,1 и 0,25 мг/мл соответственно (рис. 6а). Важно отметить, что в присутствии EGF 100 нг/мл экстракт КП в концентрации 0,1 и 0,25 мг/мл был способен вызывать гибель клеток до $13,17 \pm 1,8\%$ и $21,25 \pm 2\%$. Чтобы подтвердить, являются ли мертвые клетки апоптотическими клетками, флуоресцентное окрашивание ядер с использованием Hoechst 33342 проводили после обработки клеток КП в течение 6 часов. На рис. 6б показана фрагментация ядер клеток SKOV3, обработанных экстрактом КП в концентрации 0,3 и

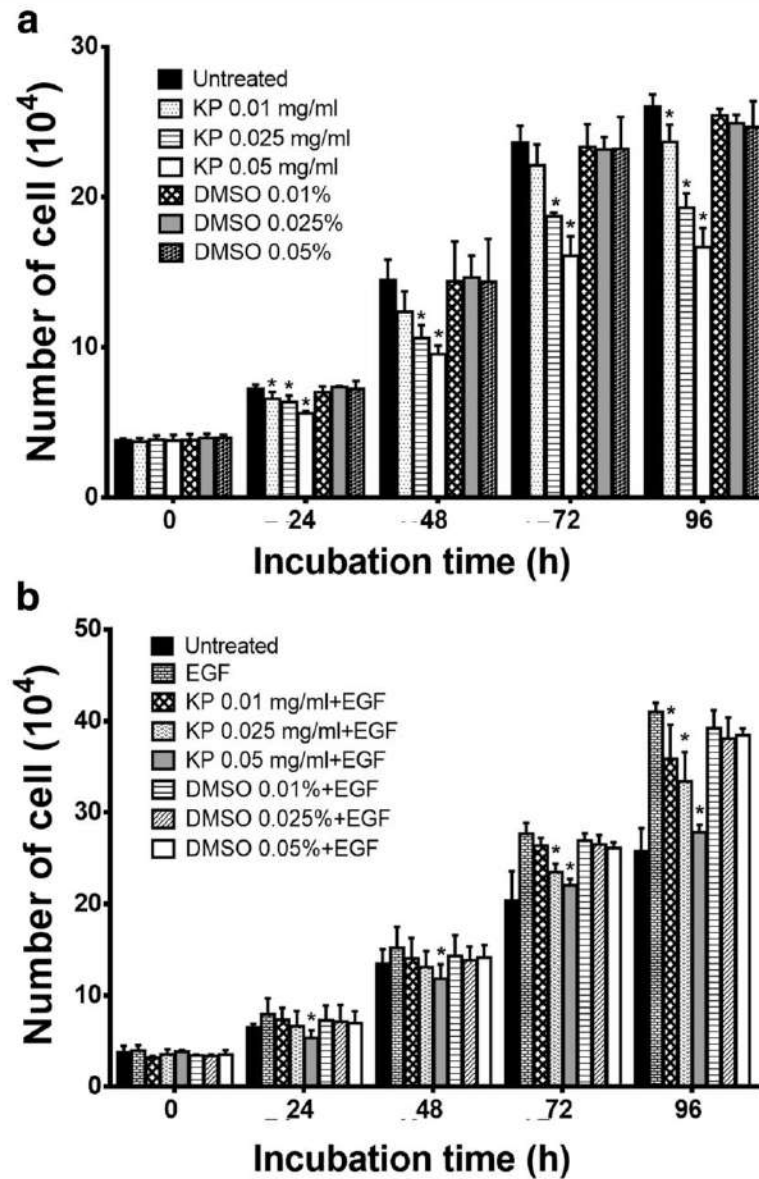


Рис. 2 Количество клеток SKOV3, обработанных нетоксичными концентрациями КП (0,01, 0,025, 0,05 мг/мл) без ЭФР (а) и с 100 нг/мл ЭФР (б) через 24, 48, 72 и 96 ч. Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n = 3). * P < 0,05 по сравнению с необработанным (а) или EGF (б)

Этот эффект наблюдался в клетках, обработанных ДМСО.

Основываясь на этом наблюдении, мы предположили, что экстракт КП вызывает гибель клеток посредством механизма апоптоза. Затем мы определили событие апоптоза, выполнив флуоресцентное окрашивание AnnexinV и PI и выявив его с помощью проточного цитометра. Мы обнаружили, что клетки, обработанные экстрактом КП в концентрации 0,3 и 0,5 мг/мл, увеличивали апоптоз до $22,13 \pm 7,6\%$ и $41,13 \pm 19,15\%$ соответственно (рис. 7а, б). Далее мы исследовали активацию каспазы-9, каспазы-3 и каспазы-7 с помощью вестерн-блоттинга и обнаружили, что полная длина всех каспаз значительно уменьшалась в зависимости от концентрации (рис. 7в, г). Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что КП вызывает гибель клеток посредством активации апоптотической гибели клеток.

Обсуждение

Рак яичников является наиболее частой причиной смерти от рака среди других гинекологических онкологических заболеваний [14]. На ранней стадии нет явных симптомов, поэтому у большинства пациентов рак диагностируется на поздней стадии, что приводит к плохому ответу на химиотерапию [15]. Стадирование является важным фактором, определяющим прогноз и клинический исход. Стадия I определяется как опухоль, ограниченная яичником. На этой стадии общая выживаемость составляет примерно 84 месяца. В частности, стадия IV имеет гораздо меньшую общую выживаемость — всего 10 мес [15]. Выживаемость связана не только со стадиями заболевания, но и с типами клеток яичников. Несколько типов

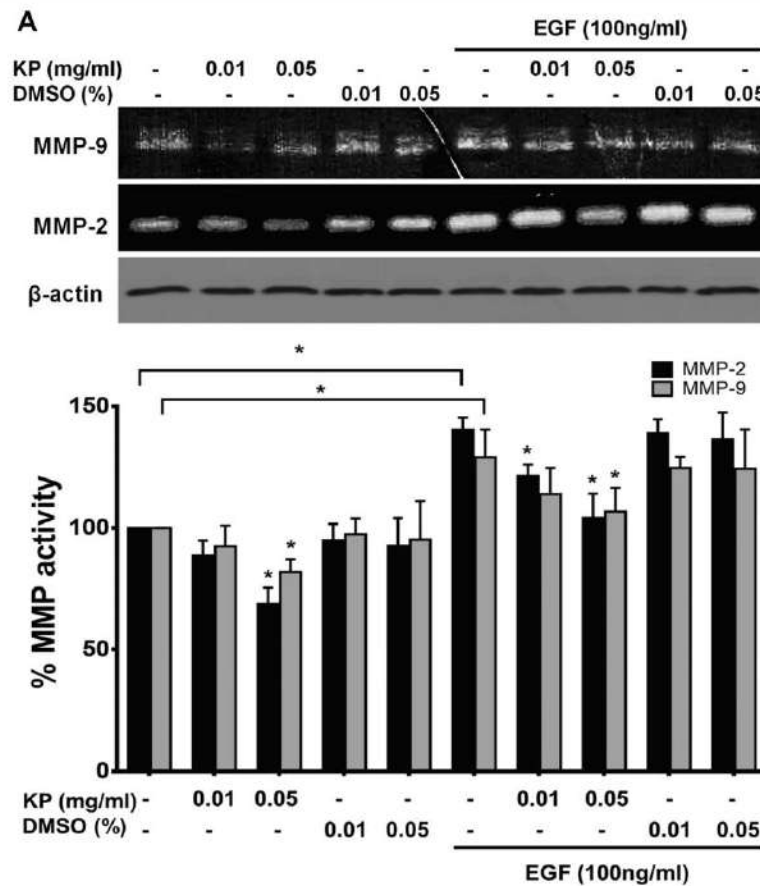


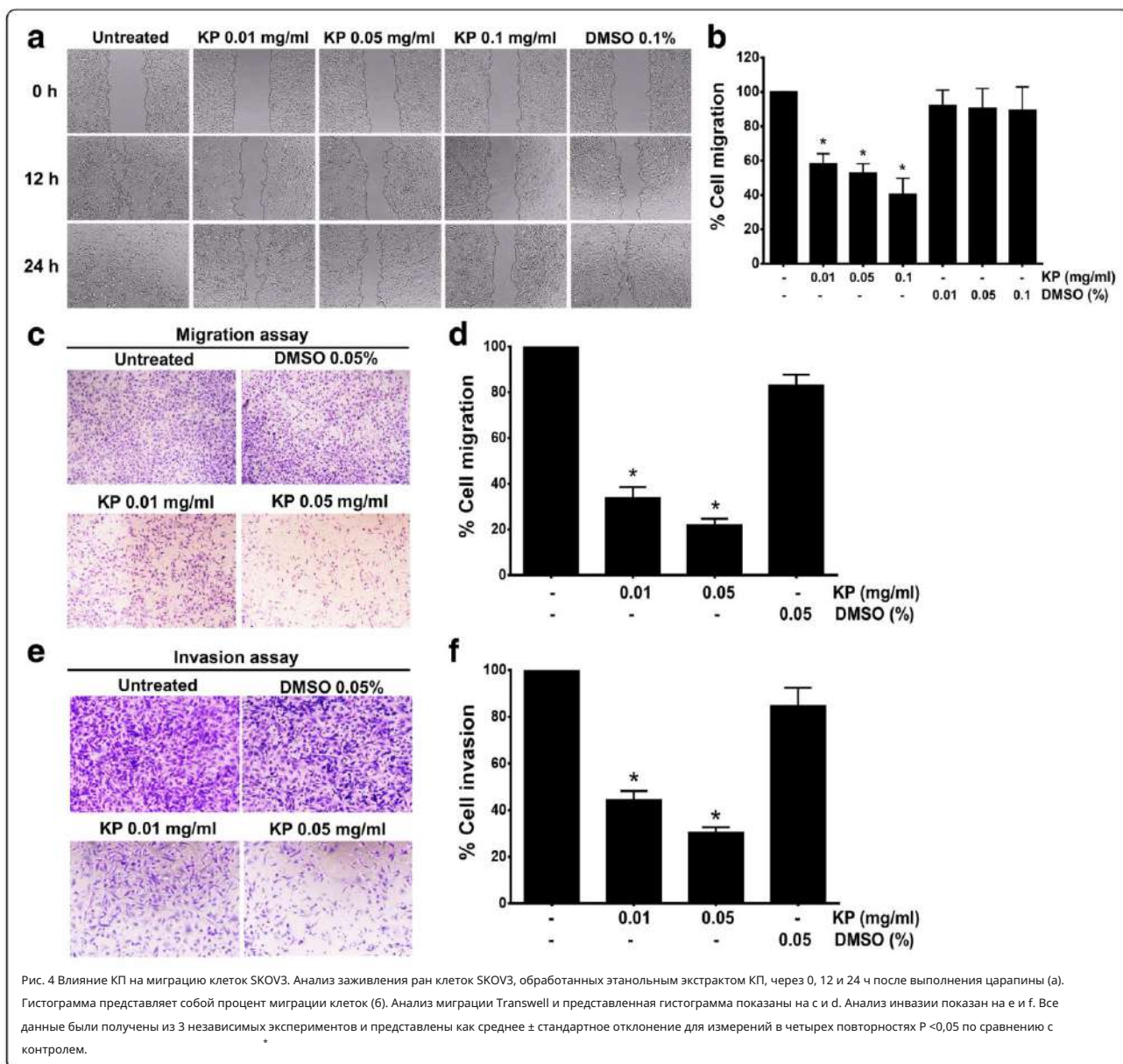
Рис. 3 Влияние этанольного экстракта КР на активность MMP-9 и MMP-2. Желатиновая зимограмма, показывающая активность MMP9 и MMP2 (а), иммунореактивные полосы β -актина использовали в качестве контроля нагрузки. Гистограмма активности MMP-2 и MMP-9 представлена в процентах от активности (б). Все данные были получены из 3 независимых экспериментов. *P < 0,05

были выявлены при раке яичников. Наиболее распространенным гистологическим подтипом является серозная аденокарцинома высокой степени злокачественности, которая имеет наихудший прогноз [16, 17]. Мы особенно заинтересованы в использовании клеточной линии серозной аденокарциномы высокой степени злокачественности SKOV3 в качестве модели для исследования противораковой активности *Caempferia parviflora* при раке яичников.

Сначала мы провели анализ жизнеспособности клеток, чтобы оценить цитотоксичность экстракта КР в клетках SKOV3. Было обнаружено, что экстракт КР снижал жизнеспособность клеток рака яичников в зависимости от концентрации с IC50 примерно 0,5 мг/мл, что было немного выше, чем ранее сообщавшееся IC50 КР в клеточной линии рака шейки матки, HeLa [10]. Интересно, что экстракт КР также сильно продемонстрировал снижение жизнеспособности клеток рака яичников в присутствии EGF, что позволяет предположить, что КР обладает мощными цитотоксическими эффектами, которые преодолевают влияние EGF на поддержание жизнеспособности клеток. Кроме того, мы обнаружили, что обработка клеток экстрактом КР в нетоксичных концентрациях (с присутствием EGF или без него) в различные моменты времени может значительно ингибировать количество клеток в зависимости от концентрации. Следовательно, удвоение

время было увеличено примерно в 1,3–1,4 раза по сравнению с необработанными клетками SKOV3. Это наблюдение предполагает, что экстракт КР может подавлять пролиферацию клеток SKOV3. По результатам жизнеспособности клеток для дальнейших экспериментов выбрали нетоксичные концентрации.

Важно известно, что клетки SKOV3 представляют собой серозную аденокарциному высокой степени злокачественности, которая, как сообщается, имеет высокую скорость метастазирования [16, 18]. Одним из основных факторов, играющих важную роль в клеточной инвазии и метастазировании, является матриксная металлопротеиназа (ММП). Было показано обширное доказательство того, что повышенный уровень ММП коррелирует с прогрессированием опухоли и метастазированием, особенно при распространенном серозном раке яичников [19, 20]. Было показано, что экспрессия ММП, особенно MMP-2 и MMP-9, имеет клиническую связь с прогрессированием рака яичников [21, 22]. ММП разрушают различные компоненты внеклеточного матрикса и играют решающую роль в онкогенезе, миграции, инвазии и метастазировании [23], а ингибирование ММП специфическими ингибиторами заметно подавляет инвазию и метастазирование опухоли [24, 25]. Основываясь на этих предыдущих отчетах, мы предположили, что экстракт КР



может быть в состоянии модулировать экспрессию MMPs. Несомненно, наше зимографическое исследование показало, что экстракт КП резко ингибирует активность MMP-2 и MMP-9 зависимым от концентрации образом в клетках SKOV3. Способность экстракта КП подавлять активность MMPs не зависела от присутствия EGF, поскольку экстракт КП мог сильно преодолеть эффекты EGF. Наши результаты согласуются с нашими предыдущими исследованиями, показывающими, что КП подавляет продукцию MMP-2 при раке шейки матки, клетках HeLa [10]. Аналогичное наблюдение было зарегистрировано в клетках колоректальной карциномы, где флавоноид, мирицетин, ингибировал активность MMP-2 и инвазию клеток [26]. Это позволяет нам полагать, что экстракт КП также может уменьшать миграцию раковых клеток.

и вторжение. Поэтому мы дополнительно исследовали влияние экстракта КП на миграцию и инвазию клеток.

Как правило, миграция раковых клеток связана с изменением интерфейса клеток и матрикса на клеточной поверхности [27]. Сверхэкспрессия MMP может усилить миграцию клеток [28], тогда как ингибирование активности MMP или сверхэкспрессия тканевого ингибитора металлопротеиназ (ТИМП) приводит к снижению миграции раковых клеток [29]. Наши результаты тестов на заживление ран показали, что экстракт КП подавляет миграцию клеток SKOV3 в зависимости от концентрации. Кроме того, миграционная функция клеток была подтверждена миграцией Transwell, показывающей, что экстракт КП резко ингибирует миграцию и инвазию клеток SKOV3. Результаты исследования инвазии с наличием

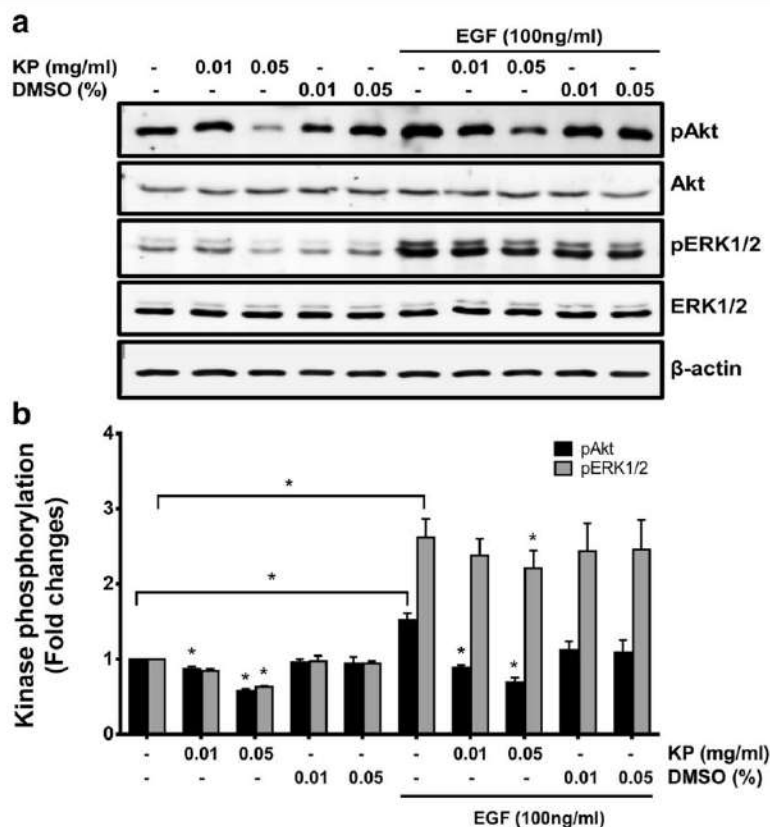


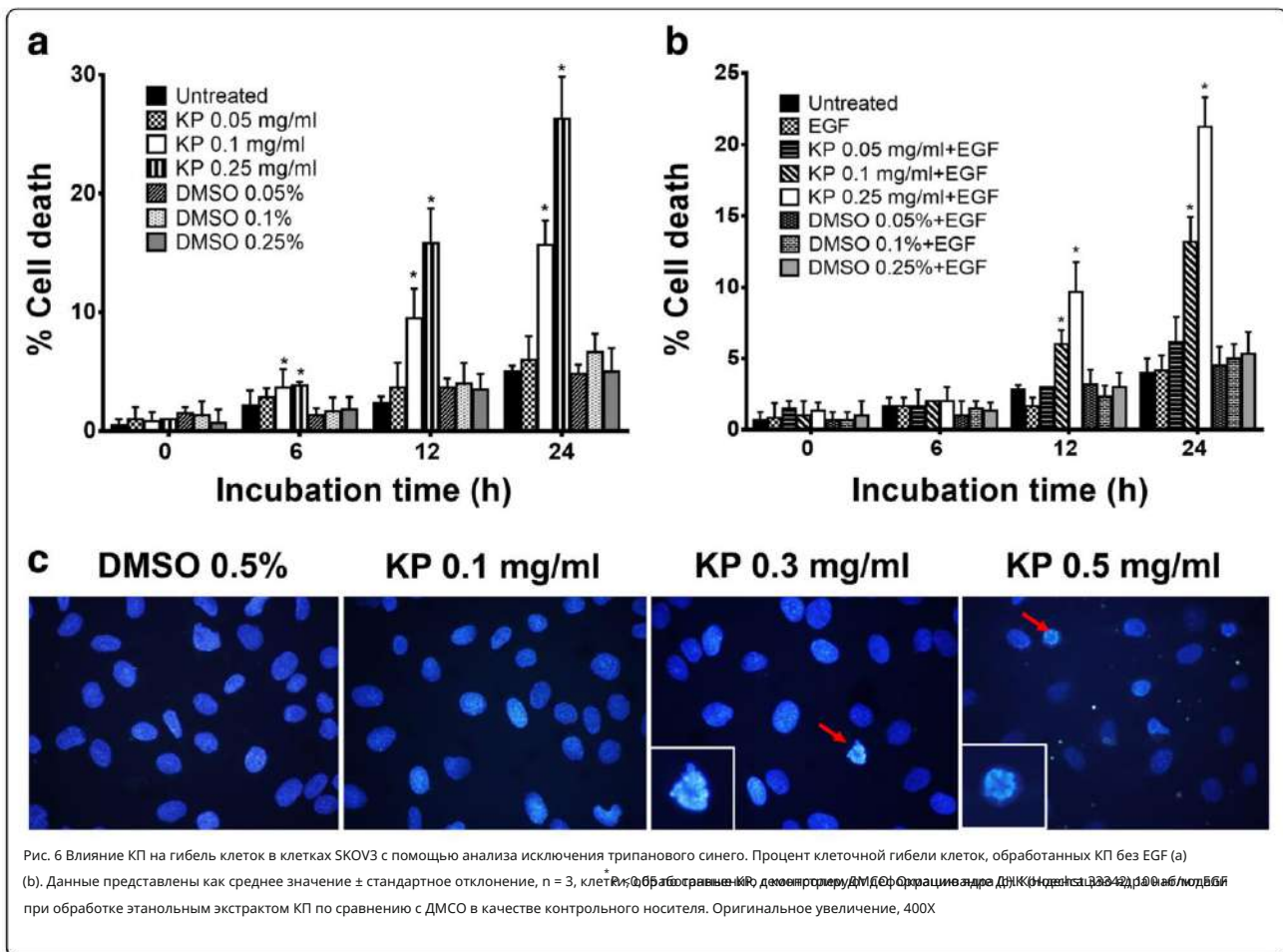
Рис. 5 Влияние КП на передачу сигнала PI3K/AKT и ERK1/2 MAPK в клетках SKOV3. Иммунореактивные полосы pAkt, Akt, pERK1/2

и ERK1/2 (a). Гистограмма уровня фосфорилирования AKT и ERK1/2 (b). β -актин использовали в качестве контроля нагрузки. Данные выражены как среднее \pm стандартное отклонение (n = 3). *P < 0,05

матригель окончательно подтвердил, что экстракт КП может быть способен подавлять инвазию клеток SKOV3. Вместе, эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что КП обладает ингибирующее действие на миграцию и инвазию SKOV3. Эти наблюдения согласуются с зимографией. результаты, предполагающие, что сниженная активность MMP может в значительной степени способствовать уменьшению раковых клеток вторжение и миграция.

Помимо способности экстракта КП с точки зрения подавления метастазирования раковых клеток яичников, мы также хотели бы исследовать его влияние на рост клеток рака яичников и выживание. В частности, поскольку клетки SKOV3, по-видимому, экспрессируют рецептора EGF (EGFR) [30], поэтому мы исследовали, Экстракт КП может преодолеть влияние EGF на активацию пути передачи молекулярного сигнала, относящиеся к клетке рост и выживание. EGFR участвует в пролиферации клеток, подвижность, адгезия, ангиогенез и выживаемость за счет активации пути фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K/AKT), и путь киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK) [31]. EGFR широко экспрессируется в 33–75% случаев рака яичников. и участвует в росте и развитии этого рака [32–34]; следовательно, EGFR важен представлять собой потенциальную мишень для противоопухолевого препарата

разработка. Пример EGFR-направленного моноклонального антитело – цетуксимаб, ингибирует рост клеток в OVCAR-2, тогда как рост клеток SKOV3 не пострадавших [35]. Другой класс ингибиторов EGFR представляет собой группу низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназы, которые нацелены на рецепторный каталитический домен EGFR. К ним относятся gefitinib и erlotinib [36]. AKT и ERK являются основными нижележащими сигнальными молекулами EGFR [37]. Предыдущий данные показали, что экстракт КП значительно подавлял фосфорилирование PI3K, AKT, ERK1/2 и Elk1 в клетках HeLa [10], поэтому мы предположили, что КП экстракт может подавлять активацию ERK1/2 и AKT передачи сигналов при серозном раке яичников высокой степени злокачественности. Наш исследование ясно показало, что экстракт КП заметно подавлял фосфорилирование ERK1/2 и AKT. Это наблюдение все еще наблюдалось, когда эксперимент был проводится в присутствии EGF. Настоящие результаты показывают, что экстракт КП подавляет путь ERK1/2, который обычно участвует в пролиферации клеток, и экстракт подавлял путь AKT, который играет роль в выживания клеток. Исследования на дрозофиле показали, что Мутация с усилением функции, которая приводит к усилению ERK1/2 возможности сигнализации могут поддерживать активацию ERK1/2



в раковых клетках [38]. Наши выводы подтверждаются недавними исследованиями, показавшими, что использование РНК-интерференции для подавления фосфорилирования ERK1/2 приводит к полному подавлению пролиферации опухолевых клеток [39].

Поскольку различные виды рака имеют aberrantную регуляцию пути АКТ, что приводит к увеличению выживаемости опухоли [40], а предыдущие исследования показали, что ингибирование активности АКТ полезно в качестве терапевтического подхода для терапии цисплатинорезистентного рака яичников, поскольку активация АКТ способствует устойчивости к цисплатину [41, 42], мы надеемся, что КП может быть новым и эффективным агентом, который имеет некоторые потенциальные мишени в передаче сигналов АКТ и, следовательно, может быть полезен для разработки средств лечения рака.

Одним из наших ключевых наблюдений было увеличение гибели клеток через 24 часа после обработки экстрактом КП в токсичных концентрациях.

Фрагментация ядер, являющаяся результатом расщепления хромосомной ДНК на фрагменты олигонуклеосомного размера, является неотъемлемой частью апоптоза [43]. Апоптоз клеток приводит к деформации ядерной пластинки и, как следствие, увеличению активности каспаз [44]. Поэтому, чтобы подтвердить, были ли эти мертвые клетки апоптозными клетками, мы окрашивали клетки SKOV3 с помощью Hoechst 33342 и наблюдали

ядерная фрагментация клеток SKOV3, обработанных экстрактом КП. Этот вывод согласуется с Potikanond et al. (2017), указывая на то, что ядерная деформация и ядерная фрагментация были вызваны обработкой КП в клетках HeLa. Кроме того, событие апоптоза SKOV3, обработанного КП, дополнительно определяли с помощью аннексина V/PI и анализа проточной цитометрии. Наши результаты ясно показали, что КП значительно индуцирует апоптоз в клетках SKOV3 в зависимости от концентрации. Чтобы подтвердить нашу гипотезу о том, что экстракт КП индуцирует апоптоз в клетках рака яичников, мы специально проанализировали ключевые ферменты, осуществляющие апоптоз, каспазу-3, каспазу-7 и каспазу-9 в клетках SKOV3, обработанных экстрактом КП. Результаты показали, что полноразмерная структура всех каспаз была уменьшена в зависимости от концентрации в клетках SKOV3, обработанных экстрактом КП, что указывает на то, что гибель клеток SKOV3 при обработке КП осуществлялась посредством запрограммированного сигнального пути гибели клеток.

Выводы

Текущее исследование продемонстрировало, что экстракт КП обладает противораковыми свойствами в отношении серьезных поражений высокой степени.

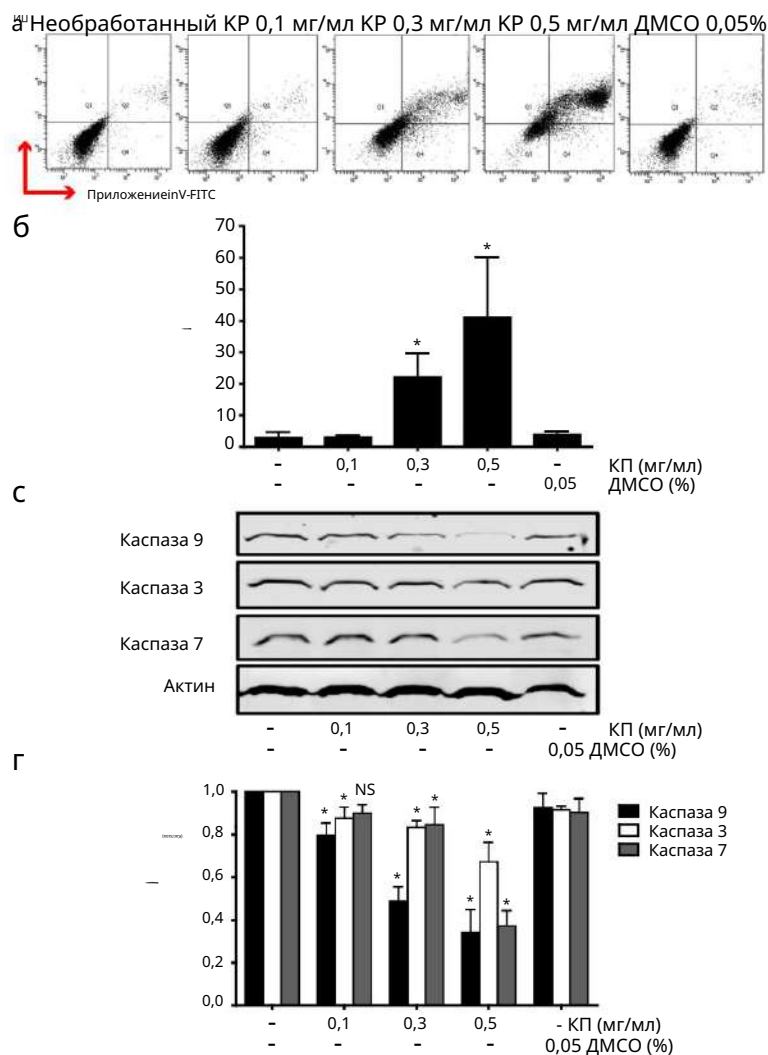


Рис. 7 Влияние этанольного экстракта КП на апоптоз и каспазы в клетках SKOV3. Было измерено мечение аннексина V-FITC и PI в клетках, обработанных КР. на проточном цитометре (а), а гистограмма процента апоптотических клеток показана на б. Уровень каспазы-3, -9 и -7 по вестерн-блоттингу: показано в в. Гистограмма относительной интенсивности полноразмерных каспаз-3, -9 и -7. β -актин используется в качестве контроля загрузки белка (д). Эти данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение для трех повторений. * $P < 0,05$ указывает на значительную разницу по сравнению с контролем

аденокарцинома, SKOV3. В частности, несмотря на то, что SKOV3 клетки агрессивны и устойчивы ко многим химиотерапевтическим агентам, наши результаты показали, что экстракт КП способен для подавления активности MMP-2 и MMP-9, миграции инвазию, активацию путей передачи сигналов роста и выживания и индукцию апоптотической гибели клеток. Эти наблюдения убеждают нас в том, что экстракт КП является потенциальным агентом для дальнейшего развития в качестве эффективного терапии рака яичников.

Сокращения

ДМСО: диметилсульфоксид; EGF: эпидермальный фактор роста; КП: Кемпферия парвифлора; MMP: матриксная металлопротеиназа

Благодарности

Мы благодарим г-на Sathit Monkawee за помощь в лабораторной поддержке.

Финансирование

Эта работа была поддержана финансированием CMB, Медицинский факультет, Чиангмай. Университет (SPO) и Центр инноваций в химии (PERCH-CIC), Комиссия по высшему образованию Министерства образования (на факультете наук, Университет Махидол, Таиланд) (SPO). Мы также благодарны за поддержку Таиландский исследовательский фонд (MRG6080193) (WN) и Plant Генетический Проект Сохранения в рамках Королевской Инициативы Ее Королевского Высочество принцесса Маха Чакри Сириндхорн (RSPG) (SS и CS) и исследования Центр фармацевтических нанотехнологий Чиангмайского университета (SPO) для частичная финансовая поддержка. Спонсоры не принимали участия в разработке проекта, данные сборник, интерпретация или решение о публикации.

Наличие данных и материалов

Наборы данных, использованные и/или проанализированные в ходе текущего исследования, доступны по адресу соответствующий автор по обоснованному запросу.

Вклад авторов

Выращивание, сбор, заготовку и идентификацию растений проводили СС и КС. ПМ готовил растительный экстракт. Эксперименты, анализ данных,

и написание рукописи проводились SPA и MNT. SPO и WN профинансировали исследовательский проект, разработали, провели эксперименты, подготовили рукопись и внесли свой вклад в финансирование проекта. Все авторы прочитали и одобрили рукопись.

Одобрение этических норм и согласие на участие
Неприменимо.

Конкурирующие интересы

Авторы заявляют, что у них нет конкурирующих интересов.

Примечание издателя Springer

Nature остается нейтральной в отношении юрисдикционных претензий в опубликованных картах и институциональной принадлежности.

Сведения об авторе

¹ Кафедра фармакологии медицинского факультета Чиангмайского университета, Чиангмай 50200, Таиланд. ² Аспирантура Чиангмайского университета, Чиангмай 50200, Таиланд. ³ Кафедра микробиологии медицинского факультета, Чиангмайский университет, Чиангмай 50200, Таиланд. ⁴ Министерство Химия, Факультет естественных наук, Чиангмайский университет, Чиангмай 50200, Таиланд. ⁵ Программа экологических наук, Факультет естественных наук, Чиангмайский университет, Чиангмай 50200, Таиланд.

Получено: 23 ноября 2017 г. Одобрено: 25 мая 2018 г.

Published online: 11 June 2018

Ссылки 1.

- Waldmann A, Eisemann N, Katalinic A. Эпидемиология злокачественных опухолей шейки матки, тела матки и яичников – текущие данные и эпидемиологические тенденции. *Geburtshilfe Frauenheilkd. Медицинские издательства Тиме; 2013* [цитировано 14 ноября 2017 г.]; 73: 123–9.
- Сигел Р.Л., Миллер К.Д., Джемал А. Статистика рака, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017 [цитировано 10 мая 2018 г.]; 67: 7–30.
- Желовац Д., Армстронг Д.К. Последние достижения в диагностике и лечении рака яичников. *CA Rak J Clin. Публичный доступ Национального института здравоохранения.* 2011;61:183–203.
- Ванг Р., Ши И.М., Курман Р.Дж. Яичник низкосортный и высокосортный серозный карцинома: патогенез, клинико-патологические и молекулярно-биологические особенности, проблемы диагностики. *Адвокат Анат Патол. Публичный доступ Национального института здравоохранения.* 2009; 16: 267–82.
- Курман Р.Дж. Происхождение и молекулярный патогенез высокозлокачественной серозной карцинома. *Энн Онкол.* 2013;24:x16–21.
- Мухтар Э., Адахми В.М., Мухтар Х. Ориентация на микротрубочки естественным путем. средства для лечения рака. *Мол Рап Тер. Публичный доступ Национального института здравоохранения.* 2014;13:275–84.
- Yenjai C, Prasaphen K, Daodee S, Wongphanich V, Kittakoop P. Биоактивные флавоноиды из *Caempferia raviviflora*. *Фитотерапия.* 2004; 75: 89–92.
- Патанасетханонт Д., Нагаи Дж., Мацуура С., Фухуи К., Суттанут К., Шрипанидулчай Б. и др. Модуляция функции белков, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью, экстрактами *Caempferia raviviflora* и их компонентами. *Евр Дж Фармакол.* 2007; 566: 67–74.
- Банджердпонгчай Р., Чанвикрой Ю., Раттанпаноне В., Шрипанидулчай Б. Индукция апоптоза в лейкемической клеточной линии человека U937 экстрактом *Caempferia raviviflora* Wall.ex.Baker и эффектами паклитаксела и камптотецина. *Азиатский Рас J Rak Prev.* 2009; 10:1137–40.
- Potikanond S, Sookhee S, Na Takuathung M, Mungkornasawakul P, Wikan N, Smith DR, et al. Экстракт *Caempferia raviviflora* проявляет противораковую активность в отношении клеток рака шейки матки HeLa. *Фронт Фармакол.* 2017;8:630.
- Хадсон Л.Г., Зайнеддин Р., Зильберберг М., Стэк М.С. Активированный рецептор эпидермального фактора роста при раке яичников. *Лечение рака Res. Публичный доступ Национального института здравоохранения.* 2009; 149: 203–26.
- Catasús L, Bussaglia E, Rodríguez I, Gallardo A, Pons C, Irving JA, et al. Молекулярно-генетические изменения при эндометриальных карциномах яичника: аналогичная частота аномалий бета-катенина, но более низкая частота микрострателитной нестабильности и изменений PTEN, чем при эндометриальных карциномах матки. *Хум Патол.* 2004; 35:1360–8.
- Мандай М., Кониси И., Курода Х., Комацу Т., Ямамото С., Нанбу К. и др. Гетерогенное распределение эпителия с мутацией K-ras в муцинозных опухолях яичников с особым упором на гистопатологию. *Хум Патол.* 1998; 29:34–40.
- Wilailak S. Эпидемиологический отчет о гинекологическом раке в Таиланде. *Дж Гинекол Онкол. Кореяское общество гинекологической онкологии и кольпоскопии.* 2009;20:81.

- Кристи М., Хан Э., Салмон Л., Морган Р.Дж. Обзор: практические аспекты химиотерапии рака яичников. *The Adv Med Oncol.* 2010;2:175–87.
- Англесмо М.С., Виганд К.С., Мельник Н., Чоу С., Саламанка С., Прентис Л.М. и соавт. Типоспецифические модели клеточных линий для исследования типоспецифического рака яичников. *ПЛОС Один.* 2013;8:e72162.
- Рид Б.М., Пермут Дж.Б., Селлерс Т.А. Эпидемиология рака яичников: обзор. *Рак Биол Мед. Китайская ассоциация борьбы с раком.* 2017; 14:9–32.
- Бофорт К.М., Хельмиджр Дж.К.А., Пискорз А.М., Хугстраат М., Руигок-Ритстиер К., Бесселин Н. и соавт. Панель клеточных линий рака яичников (OCCP): клиническое значение морфологических подтипов in vitro. *Пирсон Р., редактор. ПЛОС Один.* 2014;9:e103988.
- Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, De Nicolis M, Garbisa S, et al. Экспрессия металлопротеиназы тканей и сыворотки (MMP-2) при запущенных серозных цистоденокарциномах яичников: клинические и прогностические последствия. *Противораковый Рез.* 1995; 15: 2799–804.
- Фишман Д.А., Бафетти Л.М., Банионис С., Кернс А.С., Чилукири К., Стэк М.С. Продукция протеиназ, разлагающих внеклеточный матрикс, первичными культурами клеток эпителиальной карциномы яичников человека. *Рак.* 1997; 80: 1457–63.
- Лопата А., Агреста Ф., Куинн М.А., Смит С., Остор А.Г., Саламонсен Л.А. Выявление рака эндометрия путем определения матриксных металлопротеиназ в полости матки. *Гинекол Онкол. Академическая пресса.* 2003; 90: 318–24.
- Tong PL, Mao TL, Chan WY, Huang SC, Lin ST. Прогностическое значение стромальной металлопротеиназы-2 при аденокарциноме яичников и ее связь с прогрессированием рака. *Гинекол Онкол.* 2004; 92: 559–67.
- Vauvois B. Новые аспекты матриксных металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9 в качестве преобразователей клеточной поверхности: передача сигналов снаружи-внутри и связь с прогрессированием опухоли. *Биохим Биофиз Акта. Преподобный Рап.* 2012; 1825: 29–36.
- Лиотта Л.А., Трюгтвасон К., Гарбиса С., Харт И., Фольц К.М., Шафи С. Метастатический потенциал коррелирует с ферментативной деградацией коллагена базальной мембраны. *Природа. Издательская группа «Природа».* 1980; 284: 67–8.
- Стетлер-Стивенсон В.Г. Роль матриксных металлопротеиназ в опухолевой инвазии, метастазировании и ангиогенезе. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001; 10: 383–92.
- Ко Ч., Шен С.К., Ли Т.Дж.Ф., Чен Ю.К. Мирецетин ингибирует экспрессию белка матриксной металлопротеиназы 2 и активность фермента в клетках колоректальной карциномы. *Мол. Рап Тер. Американская ассоциация для. Рап рез.* 2005; 4: 281–90.
- Ким Ю.Х., Кwon Х.Дж., Ким Д.С. Зависимый от матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9) процессинг белка ig-h3 регулирует миграцию, инвазию и адгезию клеток. *Дж. Биол. Хим. Американское общество биохимии и молекулярной биологии.* 2012; 287:38957–69.
- Дерюгина Е.И., Луо Г.Х., Рейсфельд Р.А., Бурдон М.А., Стронгин А. Инвазия опухолевых клеток через матригель регулируется активированной матриксной металлопротеиназой-2. *Противораковый Рез.* 1997; 17:3201–10.
- Джордж С.Дж., Джонсон Дж.Л., Анджелини Г.Д., Ньюби А.С., Бейкер А.Х. аденовирус опосредованный перенос гена TIMP-1 человека ингибирует миграцию гладкомышечных клеток и образование неопитимы в подкожной вене человека. *Гул Джин Тер.* 1998; 9: 867–77.
- Sewell JM, Macleod KG, Ritchie A, Smyth JF, Langdon SP Нацеливание на рецептор EGF при раке яичников с помощью ингибитора тирозинкиназы ZD 1839 ("Iressa"). *Бр Дж Рап. Издательская группа «Природа»;* 2002; 86: 456–62.
- Танака Ю., Тераи Ю., Танаба А., Сасаки Х., Скейдзима Т., Фудзавара С. и др. Прогностический эффект мутаций гена рецептора эпидермального фактора роста и aberrантного фосфорилирования Akt и ERK при раке яичников. *Рак Биол Тер.* 2011;11:50–7.
- Берчак А., Родригес Г.К., Камел А., Додж Р.К., Сопер Дж.Т., Кларк-Пирсон Д.Л. Экспрессия рецептора эпидермального фактора роста в нормальном эпителии яичников и раке яичников: II. Взаимосвязь между экспрессией рецептора и реакцией на эпидермальный фактор роста. *Am J Obstet Gynecol. Мосби.* 1991 год; 164: 745–50.
- Псири А., Кассар М., Ю Э., Бамаис А., Вайнбергер П.М., Маркакис С. и соавт. Влияние уровня экспрессии рецептора эпидермального фактора роста на выживаемость больных эпителиальным раком яичников. *Клин Рап Рез.* 2005; 11:8637–43.
- Stadlmann S, Gueth U, Reiser U, Diener PA, Zeimet AG, Wight E, et al. Статус рецепторов эпителиального фактора роста при первичном и рецидивирующем раке яичников. *Мод Патол. Издательская группа «Природа».* 2006; 19: 607–10.
- Bijman MNA, van Berkel MPA, Kok M, Janmaat ML, Boven E. Ингибирование функциональных членов семейства HER повышает чувствительность к доцетакселу в клеточных линиях рака яичников человека. *Противораковые препараты.* 2009; 20: 450–60.
- Харари П.М. Стратегии ингибирования рецепторов эпидермального фактора роста в онкологии. *Endocr Relat Рап.* 2004; 11: 689–708.
- Bunn PA Jr and Franklin W. Экспрессия рецептора эпидермального фактора роста, сигнальный путь и ингибиторы при немелкоклеточном раке легкого. *Семин Онкол.* 2002; 29 (5 Приложение 14): 38–44.

38. Ботт С.М., Торникрофт С.Г., Маршалл С.Дж. Прибыль семерки
Функциональная мутация в р42 MAP kinase приводит к усилению передачи сигналов и
снижению чувствительности к действию фосфатазы двойной специфичности. *ФЭБС лат.* 1994;
352: 201–5.
39. Steinmetz R, Wagener HA, Zeng P, Hammond JR, Hannon TS, Meyers JL, et al.
Механизмы, регулирующие конститутивную активацию сигнального пути киназы,
регулируемой внеклеточным сигналом (ERK), при раке яичников и влияние интерференции
рибонуклеиновой кислоты для ERK1/2 на пролиферацию раковых клеток.
Мол. Эндокринолог. [Интернет]. Издательство Оксфордского университета; 2004;18:2570–82.
40. Steelman LS, Stadelman KM, Chappell WH, Horn S, Bäsecke J, Cervello M,
и другие. Akt как терапевтическая мишень при раке. Экспертное мнение по этим целям. 2008
г.; 12:1139–65.
41. Ян Х, Фрейзер М., Абедина М.Р., Бай Т., Цанг Б.К. Регуляция апоптоза
индуцирующий фактор-опосредованный цисплатин-индуцированный апоптоз с помощью Akt. *Бр Дж
Рак.* 2008; 98: 803–8.
42. Пэн Д.Дж., Ван Дж., Чжоу Д.Ю., Ву Г.С. Роль пути выживания Akt/mTOR в резистентности к
цисплатину в клетках рака яичников. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;394:600–5.
43. Zhang JH, Ming M. Фрагментация ДНК при апоптозе. *Сотовый рез.* [Интернет].
Издательская группа «Природа». 2000;10:205–11.
44. Элмор С. Апоптоз: обзор запрограммированной гибели клеток. *Токсикол патол.* 2007; 35: 495–
516.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

