

---

# Физиология и клеточная биология

---

## PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

---

УДК 615.322

### ВЛИЯНИЕ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОЧЕТАНИИ С МОДУЛЯТОРАМИ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ НА РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Т. И. ТЕРПИНСКАЯ<sup>1)</sup>, Т. Л. ЯНЧЕНКО<sup>1)</sup>, К. В. МАРКЕВИЧ<sup>1)</sup>,  
М. А. РУБИНСКАЯ<sup>1)</sup>, Е. Ф. ПОЛУКОШКО<sup>1)</sup>, Ю. А. ПИВЕНЬ<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Беларусь

<sup>2)</sup>Институт биоорганической химии НАН Беларуси,  
ул. Академика Купревича, 5, корп. 2, 220084, г. Минск, Беларусь

**Аннотация.** В опытах *in vitro* показано, что бетулиновая кислота и ее производное подавляют рост клеток глиомы С6 и HeLa, слабо влияя на незлокачественные клетки. Комбинирование этих соединений с модуляторами активности кальциевых каналов (транспортёров) и кальцийсвязывающих белков – SKF-96365, хлорпромазином и циклоспорином А, а также с хелатором ионов кальция EGTA способствует усилению противоопухолевого эффекта по сравнению с таковым при отдельном использовании препаратов. Наиболее выраженный синергизм выявлен в случае совместного применения SKF-96365 с бетулиновой кислотой или ее производным. Данное обстоятельство позволяет предположить, что для реализации противоопухолевого действия бетулиновой кислоты и ее производного не требуется активация ингибируемых SKF-96365, хлорпромазином и циклоспорином А мишеней, включая депоуправляемые каналы, каналы транзитного рецепторного потенциала, кальмодулин и кальциневрин. Более того, есть вероятность, что чувствительные к SKF-96365 механизмы, а также кальмодулин- и кальциневринзависимые механизмы способствуют росту опухолевых клеток и их устойчивости к бетулиновой кислоте и ее производному. Бетулиновая кислота, ее производное и их комбинации с модуляторами кальциевого гомеостаза могут вызывать повышение, а в ряде случаев снижение уровня цитозольного кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Изменения этого по-

---

#### Образец цитирования:

Терпинская ТИ, Янченко ТЛ, Маркевич КВ, Рубинская МА, Полукошко ЕФ, Пивень ЮА. Влияние бетулиновой кислоты в сочетании с модуляторами кальциевой сигнализации на рост опухолевых клеток. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2026;1:4–23.  
EDN: QMMMKG

#### For citation:

Terpinskaya TI, Yanchanka TL, Markevich KV, Rubinskaya MA, Palukoshka AF, Piven YuA. Effect of betulinic acid combined with calcium signalling modulators on tumour cell growth. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2026;1:4–23. Russian.  
EDN: QMMMKG

---

Сведения об авторах см. на с. 23.

Information about the authors see p. 23.

---

казателя не коррелируют однозначно с эффективностью подавления клеточного роста и зависят от типа клеток, использованных препаратов и длительности культивирования. Полученные результаты впервые демонстрируют потенциал комбинированной терапии на основе бетулиновой кислоты (или ее производного) и модуляторов  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации.

**Ключевые слова:** бетулиновая кислота; опухоль; рак; кальцевый канал; SKF-96365; хлорпромазин; циклоспорин А.

## EFFECT OF BETULINIC ACID COMBINED WITH CALCIUM SIGNALLING MODULATORS ON TUMOUR CELL GROWTH

T. I. TERPINSKAYA<sup>a</sup>, T. L. YANCHANKA<sup>a</sup>, K. V. MARKEVICH<sup>a</sup>,  
M. A. RUBINSKAYA<sup>a</sup>, A. F. PALUKOSHKA<sup>a</sup>, Yu. A. PIVEN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
28 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

<sup>b</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,  
5 Akademika Kuprevicha Street, 2 building, Minsk 220084, Belarus

Corresponding author: T. I. Terpinskaya (terpinskayat@mail.ru)

**Abstract.** *In vitro* studies have shown that betulinic acid and its derivative inhibit the growth of C6 glioma cells and HeLa cells, while having little effect on non-malignant cells. Combination therapy with calcium channel (transporter) and calcium-binding protein modulators (SKF-96365, chlorpromazine and cyclosporine A), as well as the calcium chelator EGTA, enhances the antitumour effect compared to the use of the drugs individually. The most pronounced synergism is observed with the combination of SKF-96365 and betulinic acid or its derivative. This suggests that activation of SKF-96365-, chlorpromazine- and cyclosporine A-inhibited targets, including store-operated channels, transient receptor potential channels, calmodulin and calcineurin, is not required for the effects of betulinic acid and its derivative. Moreover, it is possible that SKF-96365-sensitive, as well as calmodulin- and calcineurin-dependent mechanisms contribute to tumour cell growth and their resistance to betulinic acid and its derivative. Betulinic acid, its derivative and their combinations with calcium homeostasis modulators can cause both an increase and, in some cases, a decrease in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . Changes in this parameter do not correlate unambiguously with the effectiveness of cell growth suppression and depend on the cell type, the drugs used, and the duration of culture. The obtained results demonstrate for the first time the potential of combination therapy based on betulinic acid (or its derivative) and  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling modulators.

**Keywords:** betulinic acid; tumour; cancer; calcium channel; SKF-96365; chlorpromazine; cyclosporine A.

## Введение

Одним из подходов к разработке новых методов противоопухолевой терапии является использование веществ природного происхождения, ингибирующих критические для роста опухолевых клеток биохимические пути без проявления выраженной общей токсичности. К природным веществам с высокой биологической активностью относится бетулиновая кислота – пентациклический тритерпеноид растительного происхождения.

В литературе имеются данные о том, что физиологические эффекты, оказываемые бетулиновой кислотой и ее аналогами на незлокачественные клетки, зависят от ионов кальция. Показано участие кальция в антиатеросклеротическом [1] и антиноцицептивном [2] действии бетулиновой кислоты, нормализации жирового обмена [3], ослаблении нейропатии [4]. В гораздо меньшей степени изучена роль кальцийзависимых механизмов в действии бетулиновой кислоты на опухолевые клетки. С одной стороны, в злокачественных клетках выявлена повышенная экспрессия кальцевых каналов и активность кальцийзависимых сигнальных путей, способствующих выживаемости, росту и лекарственной устойчивости опухолевых клеток [5]. С другой стороны, различные пути клеточной гибели опосредованы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми механизмами [6].

Ионы кальция участвуют в передаче сигнала в клетке, являясь, как правило, вторичным посредником в путях сигнальной трансдукции. Изменение концентрации ионов кальция в клетке в ответ на внешнее воздействие ведет к активации или, напротив, ингибированию активности многих ферментов, а следовательно, к изменению клеточных функций [7]. Селективное поступление кальция в клетку обеспечивают

катионные каналы, среди которых важную роль играют каналы, управляемые кальциевым депо, и каналы транзиторного рецепторного потенциала (*transient receptor potential*, TRP). Кальцийсвязывающие и кальцийзависимые белки, такие как кальмодулин и кальциневрин, опосредуют физиологический ответ на кальциевые сигналы, а также регулируют внутриклеточную транспортировку и запасание ионов кальция [8; 9].

Цель данной работы – изучить влияние на рост опухолевых клеток бетулиновой кислоты или ее производного в сочетании с ингибиторами активности кальциевых каналов и кальцийсвязывающих белков и выяснить роль этих структур в противоопухолевом действии бетулиновой кислоты.

### Материалы и методы исследования

**Реактивы.** В работе использовались бетулиновая кислота (*Glenthams Life Sciences*, Великобритания), производное бетулиновой кислоты, а именно 2-{2-[2-(3β-гидроксилуп-20(29)-ен-28-амидо)этоксигетан-1-аммония хлорид (синтезирован в Институте биоорганической химии НАН Беларуси согласно методике, изложенной в работе [10]), SKF-96365 (*Abcam*, Великобритания), YМ-58483 (*Sigma-Aldrich*, США), этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N,N-тетрауксусная кислота, или EGTA (*Sigma-Aldrich*), хлорпромазина гидрохлорид (*Sigma-Aldrich*), циклоспорин А (*BLD Pharmatech*, Германия), ВСТС (*MedChemExpress*, США), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиумбромид, или МТТ (*Glenthams Life Sciences*).

**Клетки.** Для постановки экспериментов применяли клетки глиомы С6 (крыса), HeLa (человек; цервикальная карцинома), FL (человек; амнион) из коллекции Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, а также клетки двухнедельной культуры головного мозга крысы, полученные по описанной в работе [11] методике с соблюдением положений Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза «О защите животных, используемых в научных целях».

**Проведение экспериментов.** Клетки высевали в 96-луночные планшеты в среду ДМЕМ (D5648; *Sigma-Aldrich*), содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотики. Через 24 ч вносили исследуемые препараты – бетулиновую кислоту (40,0 и 60,0 мкмоль/л), производное бетулиновой кислоты (4,0 и 8,0 мкмоль/л), SKF-96365 (20,0 мкмоль/л), YМ-58483 (1,0 мкмоль/л), EGTA (0,2 и 1,0 ммоль/л), хлорпромазина гидрохлорид (14,0 мкмоль/л), циклоспорин А (2,0 мкмоль/л), ВСТС (0,2 мкмоль/л). По истечении 48 ч оценивали ингибирование роста опухолевых клеток с использованием МТТ-теста и световой микроскопии на инвертированном микроскопе Leica DM IL (*Leica Microsystems*, Германия). Изображения клеток получали с помощью цифровой фотокамеры Levenhuk C130 NG (США) при увеличении объектива ×20.

Уровень свободного кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в клетках измеряли через 2 и 48 ч после внесения препаратов с помощью набора Fluo-8 No Wash Calcium Assay Kit (*Abcam*), руководствуясь рекомендациями производителя. Краситель Fluo-8 используется как индикатор изменений содержания цитоплазматического свободного кальция [12; 13]. При окрашивании и последующем анализе клеток смену среды культивирования и отмывку клеток не проводили. Клеточные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (*BD Biosciences*, США) с программным обеспечением Diva (версия 7.0) (*Becton Dickinson*, США).

### Результаты и их обсуждение

Полученные результаты показали дозозависимое действие бетулиновой кислоты и ее производного на опухолевые клетки. Так, бетулиновая кислота в концентрации 10,0–100,0 мкмоль/л подавляла рост клеток глиомы С6 и HeLa на 12–74 %, а ее производное в концентрации 3,5–16,0 мкмоль/л ингибировало рост этих клеток на 14–68 % (рис. 1, а и б). В то же время бетулиновая кислота слабо подавляла рост клеток FL (на 5–12 %) и не влияла на рост первичной культуры клеток головного мозга крысы (рис. 1, в и г), которая, как было показано в работах [11; 14], на 90 % или более состоит из астроцитов и включает небольшое количество других типов клеток, характерных для ткани головного мозга. Производное бетулиновой кислоты в концентрации 8,5–16,0 мкмоль/л ингибировало рост клеток FL на 13–24 %, а в концентрации 11,0–16,0 мкмоль/л подавляло рост первичной культуры клеток головного мозга крысы на 17–37 % (см. рис. 1, в и г).

Приведенные данные свидетельствуют, что бетулиновая кислота и ее производное обладают более выраженным ингибирующим действием в отношении использованных нами опухолевых линий, чем в отношении незлокачественных клеток. Противоопухолевый эффект этих соединений связывают прежде всего с подавлением биохимических путей, обеспечивающих выживаемость опухолевых клеток, повышением синтеза активных форм кислорода митохондриального происхождения, торможением пролиферации, апоптозом [15–17].

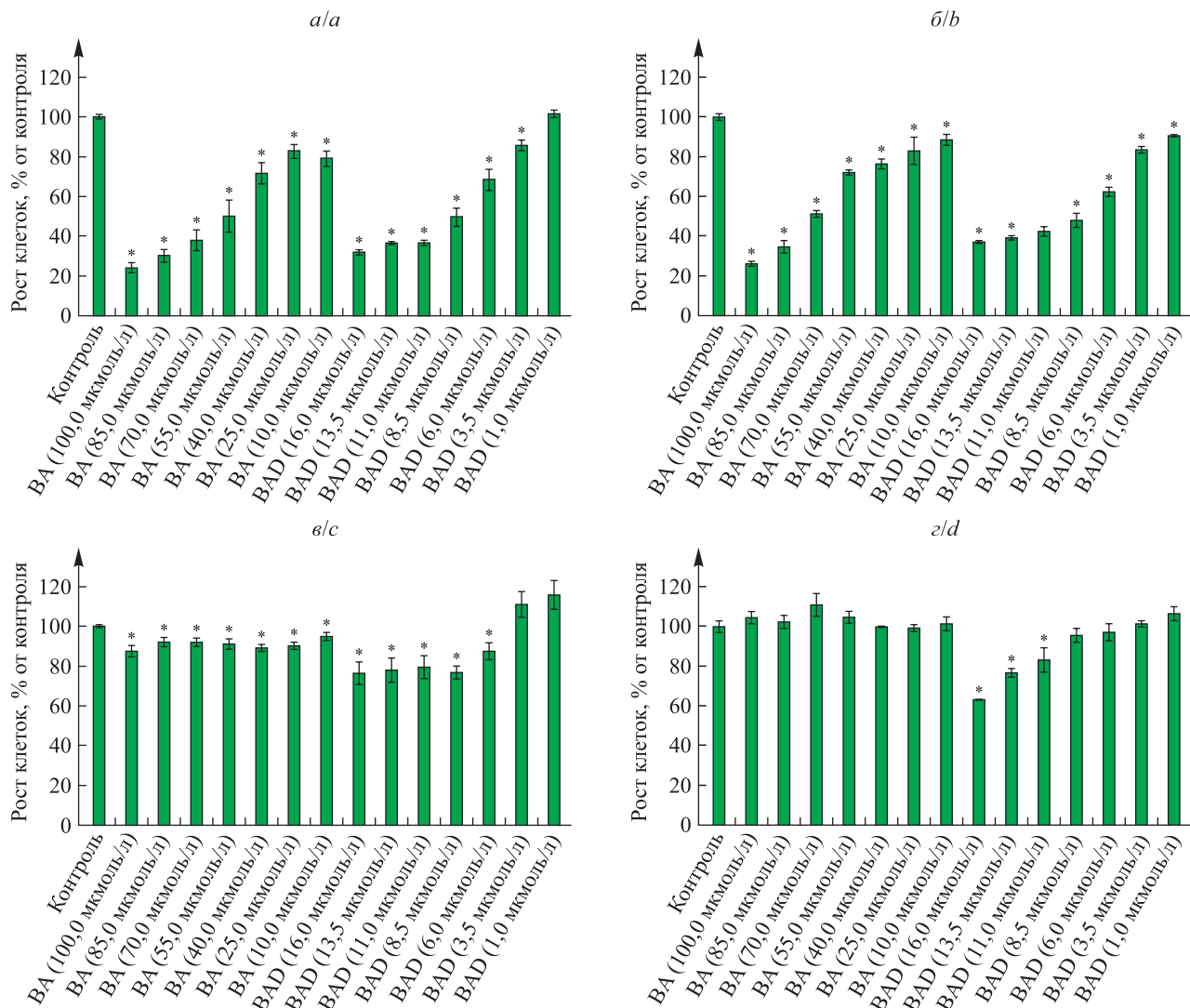


Рис. 1. Влияние бетулиновой кислоты (BA) и производного бетулиновой кислоты (BAD) на рост клеток глиомы C6 ( $n = 18$ ) (а), HeLa ( $n = 6$ ) (б), FL ( $n = 12-18$ ) (в) и первичной культуры клеток головного мозга крысы ( $n = 6$ ) (г). Данные получены с использованием МТТ-теста. Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)  
Fig. 1. The effect of betulinic acid (BA) and betulinic acid derivative (BAD) on the growth of C6 glioma ( $n = 18$ ) (a), HeLa ( $n = 6$ ) (b), FL ( $n = 12-18$ ) (c) cells and culture of rat brain ( $n = 6$ ) (d). Data obtained using the MTT test. Sign \* indicates significant differences compared to the control ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

Для выявления роли депоуправляемых каналов в ингибирующем действии бетулиновой кислоты на опухолевые клетки использовали препараты SKF-96365, YM-58483 (также известен как ВТР2) и ВСТС (также известен как SML0355).

Депоуправляемый вход кальция, являющийся ключевым механизмом регуляции внутриклеточного уровня ионов кальция, выявлен в большинстве типов клеток, включая клетки глиомы C6 [18; 19] и HeLa [20–22].

Препарат SKF-96365 блокирует депоуправляемый вход кальция [23], каналы TRP, проницаемые для катионов, в том числе для ионов кальция (канонические каналы TRPC3 [24] и TRPC6 [25], ванилоидные рецепторы TRPV2 [26]), и часто рассматривается как неселективный ингибитор катионных каналов [27; 28]. Наряду с этим показано влияние SKF-96365 на работу  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (NCX), локализованного в плазматической мембране. Обычно NCX работает в «прямом» режиме, по механизму антипорта обеспечивая вход трех ионов  $\text{Na}^+$  и выход одного иона  $\text{Ca}^{2+}$ . Однако в зависимости от концентрации ионов может включаться «обратный», или «реверсный», режим, приводящий к выходу  $\text{Na}^+$  и входу  $\text{Ca}^{2+}$  [29]. В экспериментах с клетками глиобластомы SKF-96365 способствовал активации «обратного» режима работы NCX [30]. При проведении исследований с использованием клеток HL-60 (клетки лейкемии человека), MDCK (клетки почки собаки) [31] и эндотелиальных клеток человека [32] также получены данные о том, что SKF-96365 может способствовать высвобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо.

Препарат ВСТС блокирует меластатиновые и ванилоидные рецепторы, в частности TRPM8 и TRPV1 [33]. Препарат УМ-58483 является селективным ингибитором депоуправляемых каналов и не влияет на другие механизмы, связанные с кальциевой сигнализацией [34].

Как видно из рис. 2–4, препарат SKF-96365 в различных экспериментах подавлял рост клеток глиомы С6 и HeLa в 1,4–2,3 раза. Бетулиновая кислота ингибировала рост этих клеток в 1,4–1,8 раза. При комбинированном применении SKF-96365 и бетулиновой кислоты наблюдалось значительное усиление противоопухолевого эффекта: в данном случае подавление клеточного роста было в 3,4–8,1 раза более выраженным, чем при использовании указанных препаратов по отдельности (см. рис. 2). В то же время препараты ВСТС и УМ-58483 оказывали слабое влияние на опухолевые клетки, способствуя подавлению клеточного роста до 1,2 раза или вызывая тенденцию к его подавлению и усиливая ингибирующее действие бетулиновой кислоты на опухолевые клетки в 1,2–1,6 раза, причем ВСТС обладал более выраженным эффектом (см. рис. 2).

В экспериментах с производным бетулиновой кислоты использовали препараты SKF-96365 и ВСТС, обеспечившие в сочетании с бетулиновой кислотой более значительное подавление роста опухолевых клеток, чем препарат УМ-58483. Производное бетулиновой кислоты в концентрации 4,0 и 8,0 мкмоль/л дозозависимо ингибировало рост опухолевых клеток в 1,3–2,1 раза. Сочетание производного бетулиновой кислоты с SKF-96365 обеспечило усиление противоопухолевого эффекта в 2,1–6,3 раза по сравнению с эффектом, наблюдаемым при использовании этих препаратов по отдельности (см. рис. 3 и 4).

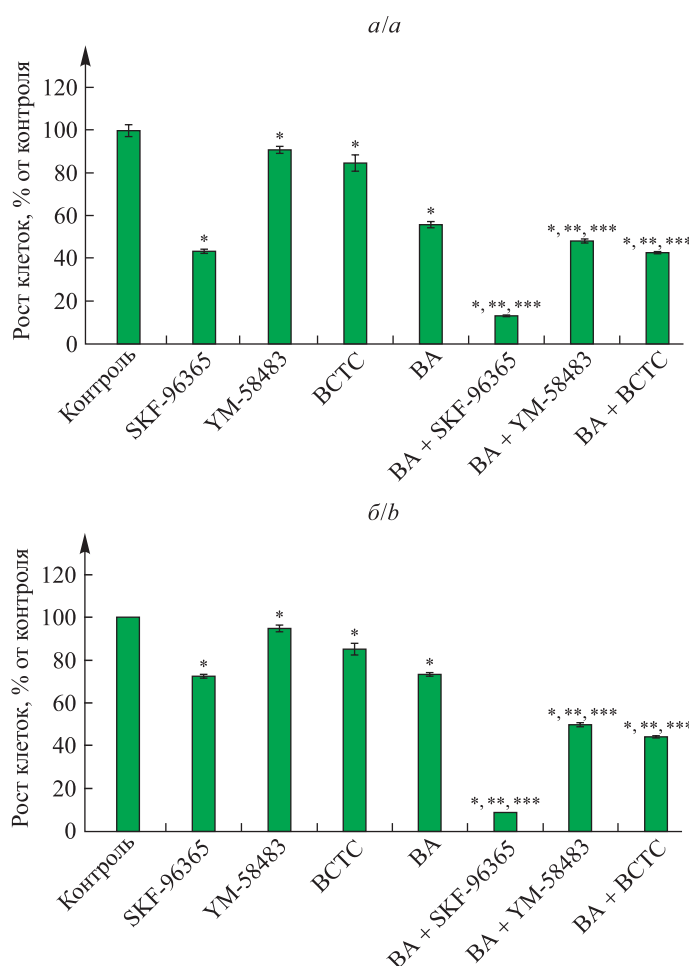


Рис. 2. Влияние SKF-96365 (20,0 мкмоль/л), УМ-58483 (1,0 мкмоль/л), ВСТС (0,2 мкмоль/л), бетулиновой кислоты (BA; 60,0 мкмоль/л) и ее комбинаций с указанными препаратами на рост клеток глиомы С6 ( $n = 8$ ) (а) и HeLa ( $n = 8$ ) (б). Данные получены с использованием МТТ-теста. Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию SKF-96365 или ВСТС, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию бетулиновой кислоты ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)

Fig. 2. The effect of SKF-96365 (20.0  $\mu\text{mol/L}$ ), УМ-58483 (1.0  $\mu\text{mol/L}$ ), ВСТС (0.2  $\mu\text{mol/L}$ ), betulinic acid (BA; 60.0  $\mu\text{mol/L}$ ) and its combinations with these drugs on the growth of C6 glioma ( $n = 8$ ) (a) and HeLa ( $n = 8$ ) (b) cells. Data obtained using the MTT test. Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of SKF-96365 or ВСТС, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of betulinic acid ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

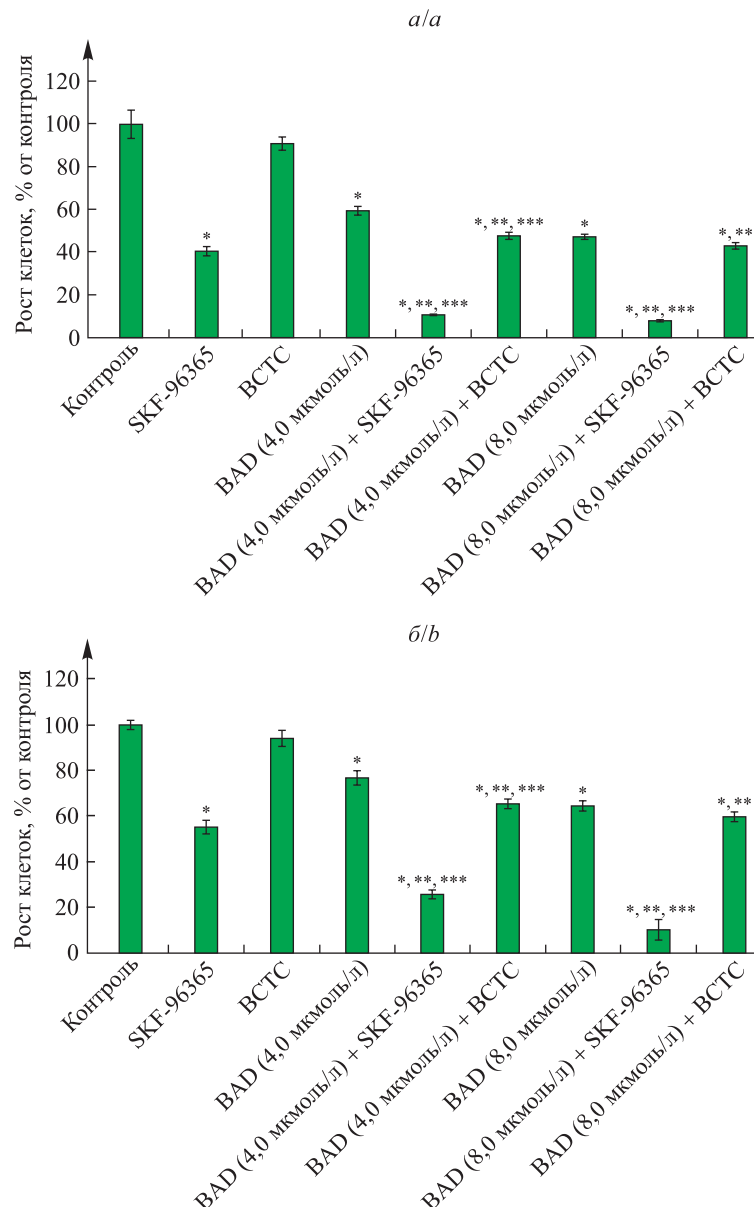


Рис. 3. Влияние SKF-96365 (20,0 мкмоль/л), BCTC (1,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 и 8,0 мкмоль/л) и его комбинаций с указанными препаратами на рост клеток глиомы C6 ( $n = 4$ ) (а) и HeLa ( $n = 4$ ) (б). Данные получены с использованием МТТ-теста. Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию SKF-96365 или BCTC, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию производного бетулиновой кислоты ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)

Fig. 3. The effect of SKF-96365 (20.0  $\mu\text{mol/L}$ ), BCTC (1.0  $\mu\text{mol/L}$ ), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0 and 8.0  $\mu\text{mol/L}$ ) and its combinations with these drugs on the growth of C6 glioma ( $n = 4$ ) (a) and HeLa ( $n = 4$ ) (b) cells. Data obtained using the MTT test. Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of SKF-96365 or BCTC, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of a betulinic acid derivative ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

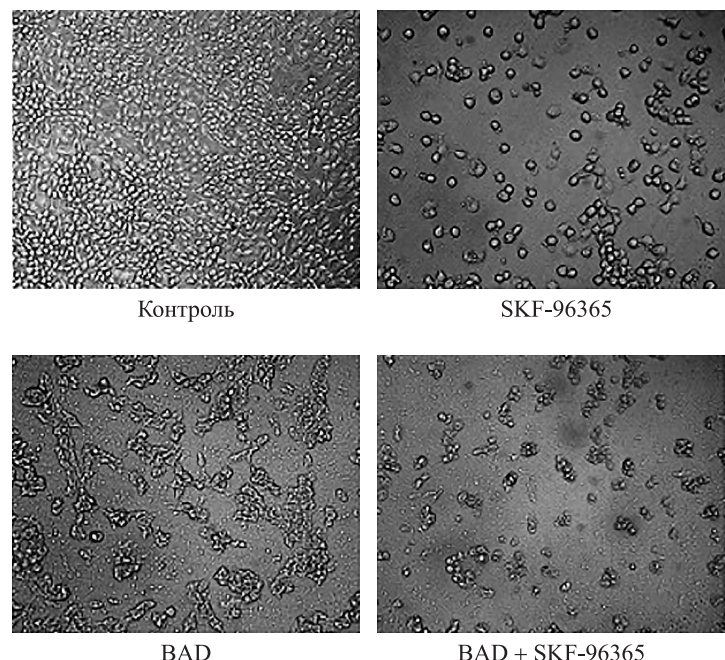


Рис. 4. Влияние SKF-96365 (20,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 мкмоль/л) и их комбинации на рост клеток HeLa. Данные получены с использованием световой микроскопии (увеличение  $\times 20$ )

Fig. 4. The effect of SKF-96365 (20.0  $\mu\text{mol/L}$ ), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0  $\mu\text{mol/L}$ ) and their combination on the growth of HeLa cells. Data obtained using light microscopy (magnification  $\times 20$ )

Среди белков, опосредующих влияние ионов кальция на функции клетки, важную роль играет кальмодулин – сенсор кальция и кальцийсвязывающий белок, который функционирует в качестве интегральной субъединицы многих ферментов, регулируя их активность [8]. Одной из мишеней кальмодулина является кальциневрин – белок, связывающий  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулин и проявляющий активность протеинфосфатазы [35; 36]. Наиболее изученной функцией кальциневрина выступает дефосфорилирование семейства факторов транскрипции ядерного фактора активированных Т-клеток (*nuclear factor of activated T-cells*, NFAT), что приводит к их перемещению в ядро, где они активируют экспрессию генов. В Т-клетках активация NFAT инициирует адаптивный иммунный ответ. По этой причине ингибиторы кальциневрина, в частности циклоспорин А, используются в клинической практике в качестве иммунодепрессантов для предотвращения отторжения органов и при аутоиммунных расстройствах (например, атопическом дерматите и псориазе). В то же время циклоспорин А оказывает влияние не только на иммунные, но и на другие клетки организма, регулируя многие кальцийзависимые процессы [9].

Учитывая тот факт, что в проведенных нами экспериментах препараты, известные как ингибиторы кальциевых каналов, способствовали усилению противоопухолевого действия бетулиновой кислоты и ее производного, мы исследовали модулирующий эффект соединений, влияющих на активность кальцийзависимых белков. В качестве таких соединений использовались хлорпромазин, который применяется как антипсихотическое средство, но, помимо других свойств, обладает способностью ингибировать кальмодулин [37], и циклоспорин А – ингибитор кальциневрина [38]. Хлорпромазин и циклоспорин А не являются противоопухолевыми препаратами, однако в литературе (см., например, [37; 38]) имеются сведения об их способности подавлять рост опухолевых клеток. В рамках настоящей работы изучалось влияние этих препаратов на противоопухолевый эффект производного бетулиновой кислоты, которое, как видно из рис. 1 и 3, оказывало действие, сходное с действием бетулиновой кислоты, но при этом применялось в гораздо меньшей концентрации.

Проведенные исследования показали, что хлорпромазин (ингибитор кальмодулина) в концентрации 14,0 мкмоль/л и циклоспорин А (ингибитор кальциневрина) в концентрации 2,0 мкмоль/л подавляли рост опухолевых клеток в 1,2–1,3 раза, а при сочетании какого-либо из этих препаратов с производным бетулиновой кислоты эффект был в 1,4–3,8 раза более сильным, чем при их отдельном использовании (рис. 5–7). Вероятно, хлорпромазин и циклоспорин А оказывают дополнительное действие в отношении друг друга, так как при совместном применении данных препаратов наблюдалось более выраженное ингибирование клеточного роста, а также более заметное усиление противоопухолевого эффекта производного бетулиновой кислоты (в 2,5 раза по сравнению с эффектом, наблюдаемым при использовании только производного бетулиновой кислоты) (см. рис. 6, б).

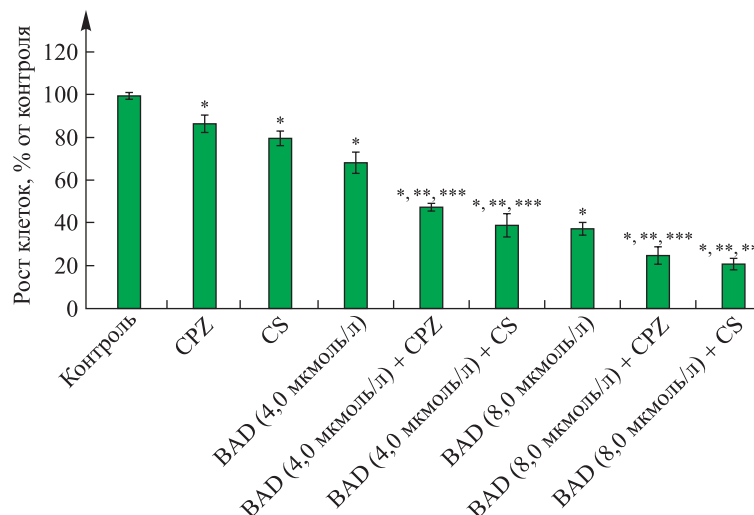


Рис. 5. Влияние хлорпромазина (CPZ; 14,0 мкмоль/л), циклоспорина А (CS; 2,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 и 8,0 мкмоль/л) и его комбинаций с указанными препаратами на рост клеток глиомы С6 ( $n = 12$ ). Данные получены с использованием МТТ-теста.

Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию хлорпромазина или циклоспорина А, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию производного бетулиновой кислоты ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)

Fig. 5. The effect of chlorpromazine (CPZ; 14.0  $\mu\text{mol/L}$ ), cyclosporine A (CS; 2.0  $\mu\text{mol/L}$ ), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0 and 8.0  $\mu\text{mol/L}$ ) and its combinations with these drugs on the growth of C6 glioma cells ( $n = 12$ ). Data obtained using the MTT test.

Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of chlorpromazine or cyclosporine A, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of a betulinic acid derivative ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

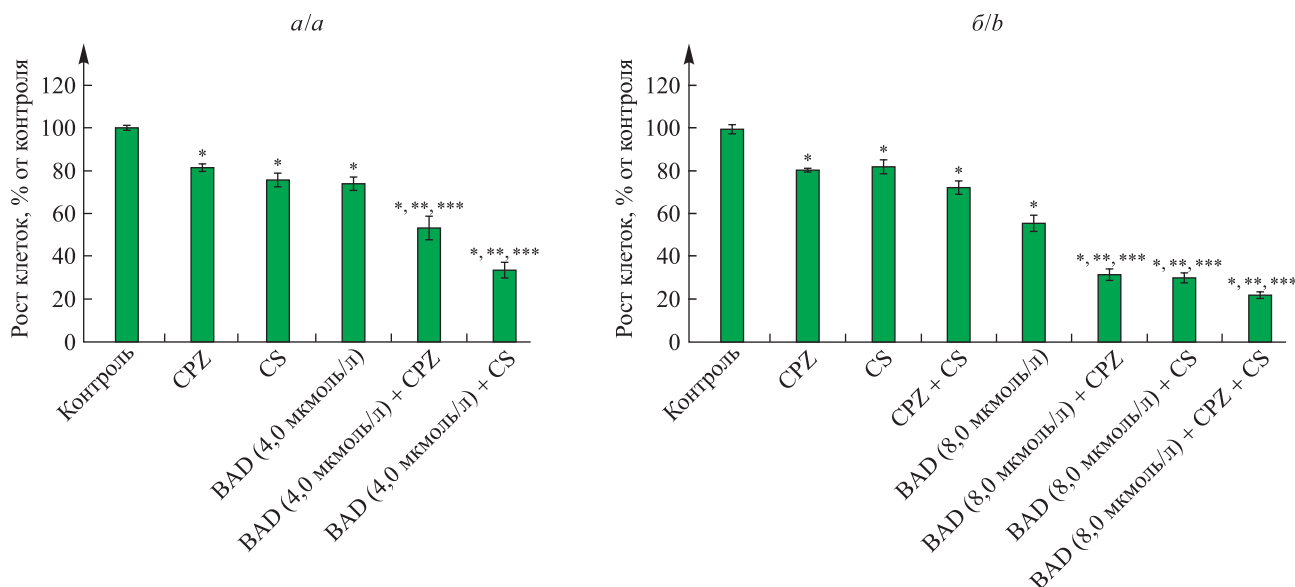


Рис. 6. Влияние хлорпромазина (CPZ; 14,0 мкмоль/л), циклоспорина А (CS; 2,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 мкмоль/л (а) и 8,0 мкмоль/л (б)) и его комбинаций с указанными препаратами на рост клеток HeLa ( $n = 16$  (а),  $n = 4$  (б)). Данные получены с использованием МТТ-теста.

Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию хлорпромазина или циклоспорина А, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию производного бетулиновой кислоты ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)

Fig. 6. The effect of chlorpromazine (CPZ; 14.0  $\mu\text{mol/L}$ ), cyclosporine A (CS; 2.0  $\mu\text{mol/L}$ ), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0  $\mu\text{mol/L}$  (a) and 8.0  $\mu\text{mol/L}$  (b)) and its combinations with these drugs on the growth of HeLa cells ( $n = 16$  (a),  $n = 4$  (b)). Data obtained using the MTT test.

Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of chlorpromazine or cyclosporine A, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of a betulinic acid derivative ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

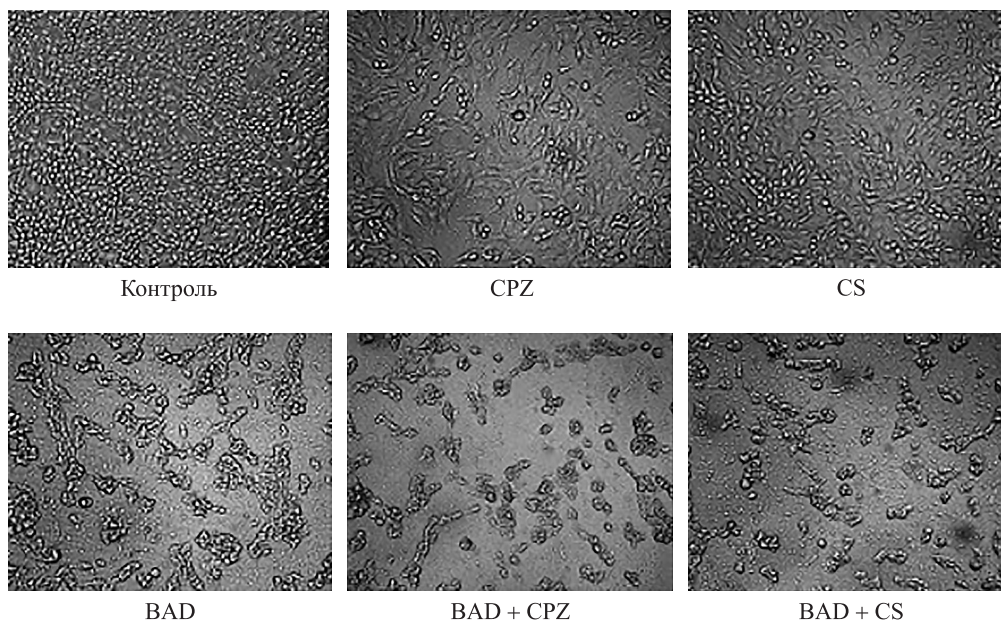


Рис. 7. Влияние хлорпромазина (CPZ; 14,0 мкмоль/л), циклоспорина А (CS; 2,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 мкмоль/л) и его комбинаций с указанными препаратами на рост клеток HeLa. Данные получены с использованием световой микроскопии (увеличение  $\times 20$ )

Fig. 7. The effect of chlorpromazine (CPZ; 14.0  $\mu\text{mol/L}$ ), cyclosporine A (CS; 2.0  $\mu\text{mol/L}$ ), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0  $\mu\text{mol/L}$ ) and its combinations with these drugs on the growth of HeLa cells. Data obtained using light microscopy (magnification  $\times 20$ )

Эффект, сходный с эффектом SKF-96365, хлорпромазина и циклоспорина А, продемонстрировал хелатор ионов кальция EGTA. В частности, EGTA в концентрации 1,0 ммоль/л усилила ингибирующее действие 4,0 мкмоль/л производного бетулиновой кислоты на клетки глиомы С6 в 1,3 раза и вызвала тенденцию к усилению ингибирующего действия 8,0 мкмоль/л производного бетулиновой кислоты на эти клетки (рис. 8).

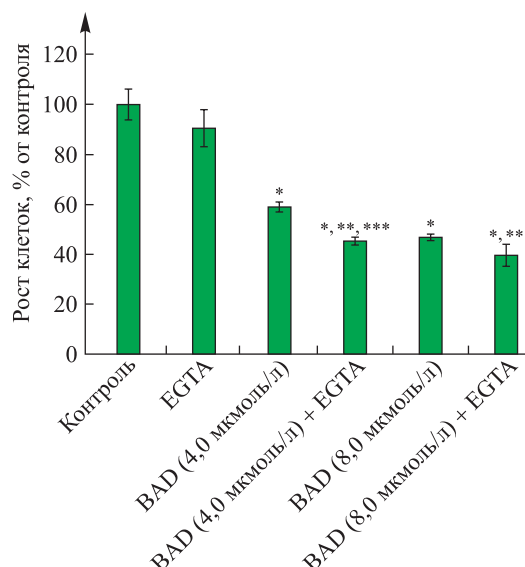


Рис. 8. Влияние EGTA (1,0 ммоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 и 8,0 мкмоль/л) и их комбинации на рост клеток глиомы С6 ( $n = 4$ ). Данные получены с использованием МТТ-теста. Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию EGTA, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию производного бетулиновой кислоты ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)

Fig. 8. The effect of EGTA (1.0 mmol/L), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0 and 8.0  $\mu\text{mol/L}$ ) and their combination on the growth of C6 glioma cells ( $n = 4$ ). Data obtained using the MTT test. Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of EGTA, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of a betulinic acid derivative ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

Установлено, что EGTA в концентрации 0,2 и 1,0 ммоль/л тормозила рост клеток HeLa в 1,2 и 1,4 раза. При использовании EGTA в концентрации 0,2 ммоль/л наблюдалась тенденция к усилению противоопухолевого эффекта 4,0 мкмоль/л производного бетулиновой кислоты, а в случае применения EGTA в концентрации 1,0 ммоль/л выявлено статистически значимое усиление противоопухолевого эффекта 4,0 и 8,0 мкмоль/л производного бетулиновой кислоты в 1,8–1,9 раза (рис. 9).

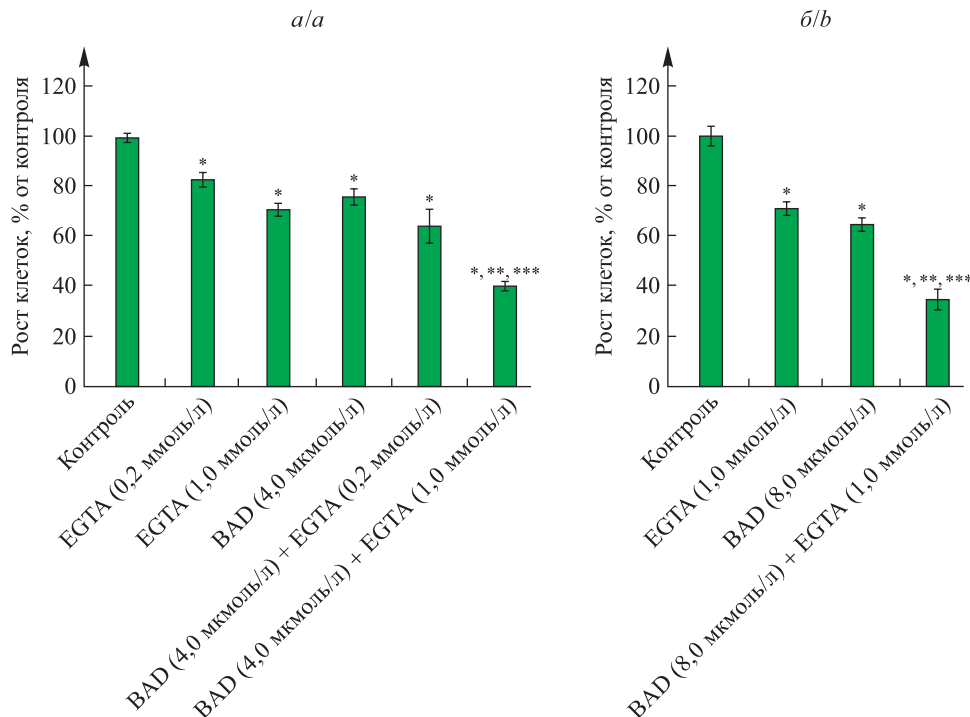


Рис. 9. Влияние EGTA (0,2 ммоль/л (а) и 1,0 ммоль/л (а, б)), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 мкмоль/л (а) и 8,0 мкмоль/л (б)) и их комбинации на рост клеток HeLa ( $n = 12$  (а, б)). Данные получены с использованием МТТ-теста.

Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию EGTA, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию производного бетулиновой кислоты ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)

Fig. 9. The effect of EGTA (0.2 mmol/L (a) and 1.0 mmol/L (a, b)), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0 μmol/L (a) and 8.0 μmol/L (b)) and their combination on the growth of HeLa cells ( $n = 12$  (a, b)). Data obtained using the MTT test.

Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of EGTA, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of a betulinic acid derivative ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

Далее исследовалось, обеспечит ли хелатирование ионов кальция усиление противоопухолевого действия хлорпромазина и циклоспорина А.

Полученные данные показали, что хлорпромазин, EGTA, бетулиновая кислота и ее производное подавляли рост клеток HeLa в 1,2–1,3 раза (рис. 10). Комбинирование бетулиновой кислоты или ее производного с хлорпромазином либо EGTA усиливало ингибирование клеточного роста. Хлорпромазин и EGTA нивелировали противоопухолевое действие друг друга; аналогичный эффект наблюдался и в случае их применения в сочетании с бетулиновой кислотой или ее производным (см. рис. 10).

Исследование совместного использования циклоспорина А и производного бетулиновой кислоты продемонстрировало, что, как и в вышеописанном опыте, циклоспорин А, EGTA и производное бетулиновой кислоты подавляли рост клеток HeLa (рис. 11). Комбинирование производного бетулиновой кислоты с циклоспорином А или EGTA усиливало ингибирующее действие препаратов на клетки HeLa, а сочетание EGTA с циклоспорином А ослабляло противоопухолевый эффект.

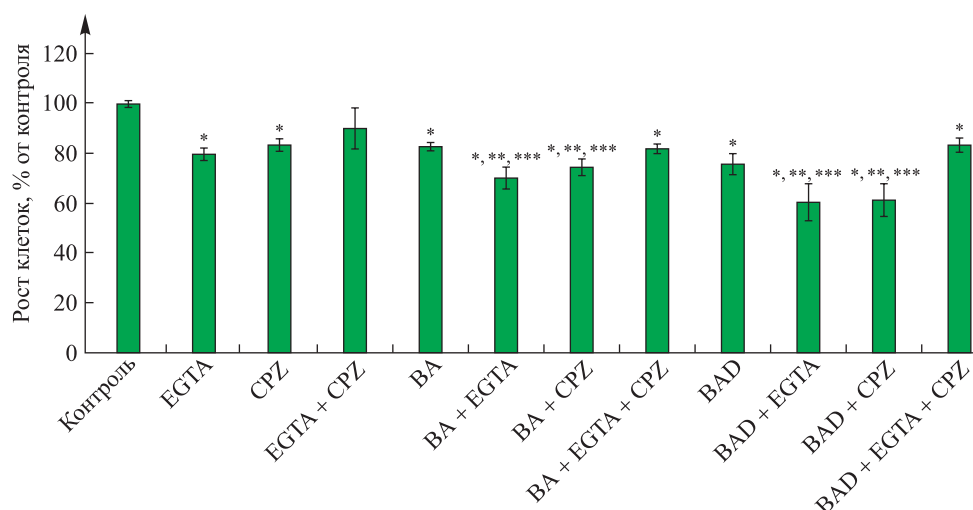


Рис. 10. Влияние EGTA (0,2 ммоль/л), хлорпромазина (CPZ; 14,0 мкмоль/л), бетулиновой кислоты (BA; 40,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 мкмоль/л) и их комбинаций на рост клеток HeLa ( $n = 8$ ). Данные получены с использованием МТТ-теста. Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию хлорпромазина, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию бетулиновой кислоты ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)

*Fig. 10.* The effect of EGTA (0.2 mmol/L), chlorpromazine (CPZ; 14.0  $\mu$ mol/L), betulinic acid (BA; 40.0  $\mu$ mol/L), betulinic acid derivative (BAD; 4.0  $\mu$ mol/L) and their combinations on the growth of HeLa cells ( $n = 8$ ). Data obtained using the MTT test. Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of chlorpromazine, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of betulinic acid ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

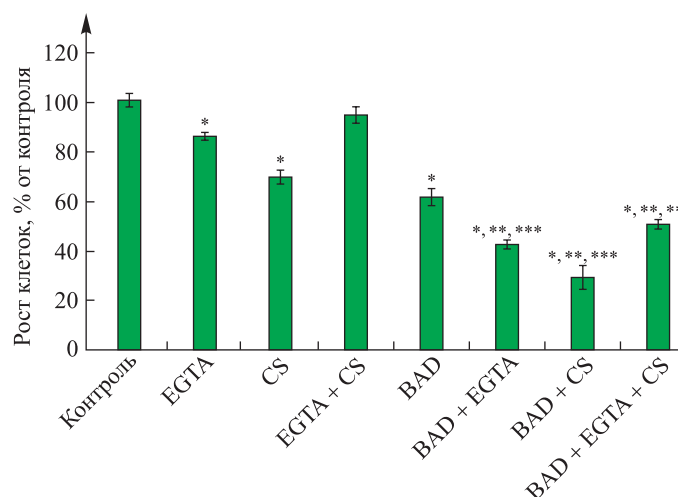


Рис. 11. Влияние EGTA (0,2 ммоль/л), циклоспорина А (CS; 2,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 мкмоль/л) и их комбинаций на рост клеток HeLa ( $n = 6$ ). Данные получены с использованием МТТ-теста. Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию циклоспорина А, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию производного бетулиновой кислоты ( $p < 0.05$ ; тест Манна – Уитни)

**Fig. 11.** The effect of EGTA (0.2 mmol/L), cyclosporine A (CS; 2.0  $\mu$ mol/L), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0  $\mu$ mol/L) and their combinations on the growth of HeLa cells ( $n = 6$ ). Data obtained using the MTT test. Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of cyclosporine A, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of a betulinic acid derivative ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

Так как исследуемые нами препараты влияют на активность кальциевых каналов, далее было изучено их действие на уровень цитозольного кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ), а также возможная связь этого показателя с подавлением клеточного роста.

Известно, что в состоянии покоя существует градиент концентраций внутри- и внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , достигающий 10 000 раз, при этом цитозольная концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  поддерживается на уровне  $10^{-7}$  моль/л, тогда как его внеклеточная концентрация составляет около  $10^{-3}$  моль/л [8]. В проведенных экспериментах мы культивировали клетки в среде ДМЕМ, концентрация ионов кальция (в виде хлорида кальция) в которой составляет 0,2 г/л, или 1,8 ммоль/л ([www.sigmaaldrich.com/by/en/product/sigma/d5648](http://www.sigmaaldrich.com/by/en/product/sigma/d5648)). Уровень общего кальция в эмбриональной телячьей сыворотке достигает  $(3,02 \pm 0,31)$  ммоль/л, а уровень ионизированного кальция –  $(1,38 \pm 0,08)$  ммоль/л [39]. Исходя из этого, концентрация ионизированного кальция в культуральной среде, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, составляет около 1,76 ммоль/л, т. е. уровень  $\text{Ca}^{2+}$  сходен с его уровнем во внеклеточной среде организма.

В клетках глиомы С6 через 2 ч культивирования бетулиновая кислота обусловила повышение уровня цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  в 2,8 раза, а производное бетулиновой кислоты не вызвало статистически значимых изменений этого показателя (наблюдалась тенденция к его снижению) (рис. 12, а). УМ-58483, ВСТС и EGTA способствовали снижению уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , хлорпромазин и циклоспорин А не изменили, а SKF-96365, против ожидания, повысил его концентрацию в 1,6 раза (см. рис. 12, а).

Комбинирование бетулиновой кислоты или ее производного с SKF-96365 привело к более выраженному повышению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток, чем при использовании данных препаратов по отдельности. Внесение хлорпромазина и циклоспорина А способствовало ослаблению влияния на уровень  $\text{Ca}^{2+}$  (хотя он оставался выше контрольного уровня) бетулиновой кислоты, но усилению влияния на концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  производного бетулиновой кислоты. В присутствии УМ-58483, ВСТС и EGTA уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках, подвергшихся воздействию бетулиновой кислоты или ее производного, не отличался от контрольного уровня либо был ниже его (см. рис. 12, а).

Через 48 ч культивирования под действием бетулиновой кислоты и ее производного в клетках глиомы С6 не было зарегистрировано статистически значимых изменений уровня  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 12, б). SKF-96365 вызвал тенденцию к повышению этого показателя, а в сочетании с бетулиновой кислотой – статистически значимое увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в 1,8 раза по сравнению с контролем. Циклоспорин А и хлорпромазин повысили уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в 3,0 и 3,4 раза, а в сочетании с бетулиновой кислотой – в 2,7 и 5,6 раза соответственно. ВСТС несколько снизил, а EGTA повысила уровень  $\text{Ca}^{2+}$ . При комбинировании УМ-58483, ВСТС или EGTA с бетулиновой кислотой уровень цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  не отличался от контрольного уровня. Сочетание производного бетулиновой кислоты со всеми исследованными модуляторами кальциевого гомеостаза привело к снижению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в 1,5–1,9 раза по сравнению с таковым при отдельном использовании этих препаратов (см. рис. 12, б).

В клетках HeLa через 2 ч культивирования бетулиновая кислота и ее производное способствовали повышению уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в 1,4 и 1,2 раза соответственно. EGTA, ВСТС и хлорпромазин обеспечили снижение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в 1,2–1,3 раза, УМ-58483 вызвал тенденцию к уменьшению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , не достигшую статистической значимости, а SKF-96365 способствовал повышению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в 1,3 раза (рис. 13, а).

Сочетанное действие бетулиновой кислоты или ее производного с SKF-96365, хлорпромазином, циклоспорином А либо УМ-58483 привело к более выраженному повышению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  (в 1,1–1,9 раза). ВСТС при комбинировании с бетулиновой кислотой вызвал тенденцию к увеличению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , но без статистической значимости. В присутствии 1 ммоль/л EGTA уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках, подвергшихся воздействию бетулиновой кислоты или ее производного, не отличался от контрольного уровня (см. рис. 13, а).

Через 48 ч после внесения бетулиновой кислоты либо ее производного концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках HeLa выросла в 4,3 и 3,8 раза соответственно по сравнению с контролем. Что касается использованных нами модуляторов кальциевого гомеостаза, то их действие оказалось неоднозначным. Так, SKF-96365 способствовал повышению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в 5,0 раза, хлорпромазин – в 6,6 раза, циклоспорин А – в 2,2 раза. В присутствии УМ-58483 и ВСТС статистически значимого изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  не зарегистрировано, EGTA вызвала повышение уровня  $\text{Ca}^{2+}$ . SKF-96365, циклоспорин А и ВСТС не изменили действия бетулиновой кислоты или ее производного на уровень  $\text{Ca}^{2+}$ , тогда как хлорпромазин, УМ-58483 и EGTA снизили их влияние на концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  либо вызывали тенденцию к его снижению в 1,1–1,4 раза (рис. 13, б).

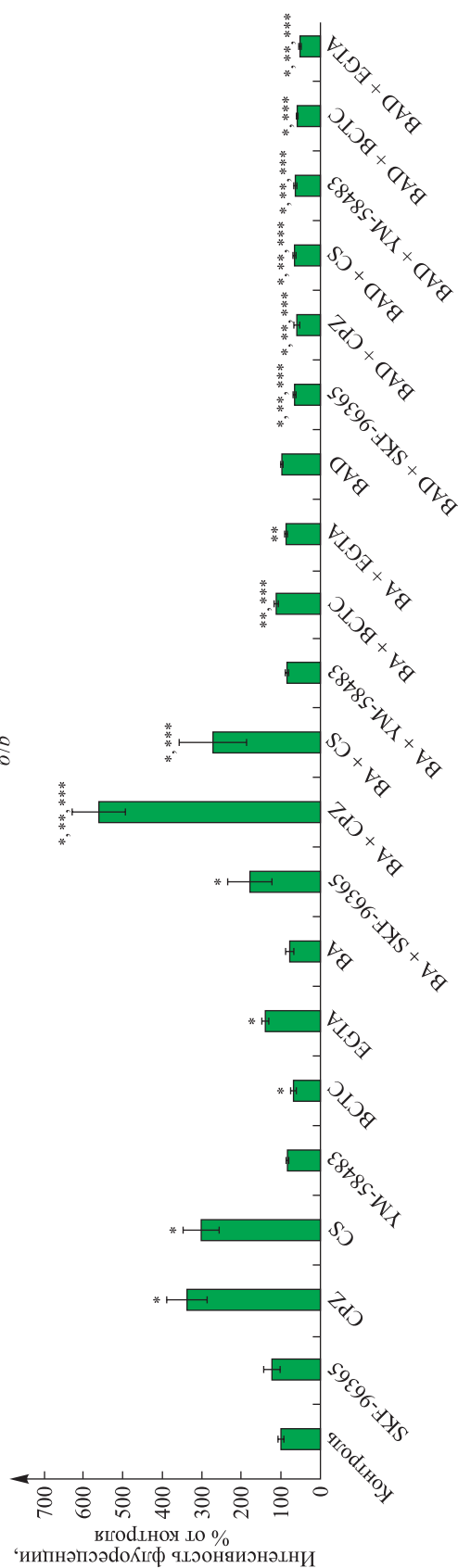
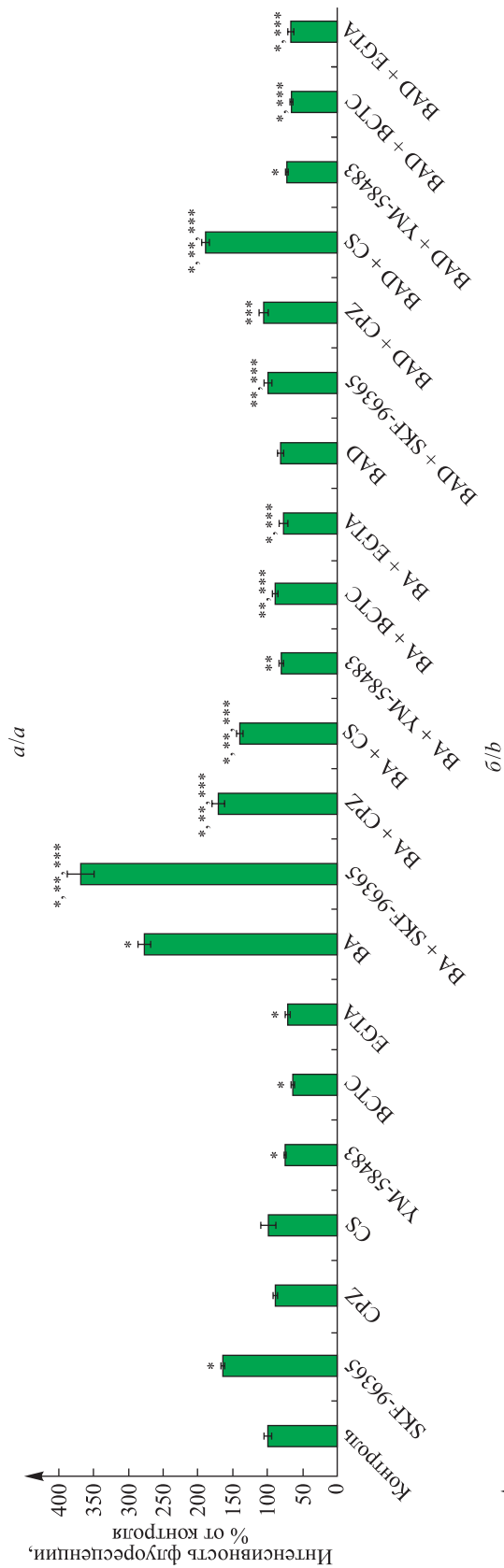


Рис. 12. Влияние SKF-96365 (20,0 мкмоль/л), хлорпромазина (CPZ; 14,0 мкмоль/л), циклоспорина А (CS; 2,0 мкмоль/л), YM-58483 (1,0 мкмоль/л), BCTC (0,2 мкмоль/л), EGTA (1,0 мкмоль/л), бетулиновой кислоты (BA; 60,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 мкмоль/л) и их комбинаций на уровень  $Ca^{2+}$  в клетках глиомы C6 ( $n = 5$ ) через 2 ч (a) и 48 ч (b) культивирования. Данные получены с использованием проточной цитометрии.

Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию бетулиновой кислоты или ее производного к действию модуляторов кальциевого гомеостаза, знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к контролю, знак \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию бетулиновой кислоты или ее производного к действию модуляторов кальциевого гомеостаза, (p < 0,05; тест Манна – Уитни)

Fig. 12. The effect of SKF-96365 (20.0  $\mu$ mol/L), chlorpromazine (CPZ; 14.0  $\mu$ mol/L), cyclosporine A (CS; 2.0  $\mu$ mol/L), YM-58483 (1.0  $\mu$ mol/L), BCTC (0.2  $\mu$ mol/L), EGTA (1.0 mmol/L), betulinic acid (BA; 60.0  $\mu$ mol/L), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0  $\mu$ mol/L) and their combinations on the  $Ca^{2+}$  level in C6 glioma cells ( $n = 5$ ) after 2 h (a) and 48 h (b) of cultivation. Data obtained using flow cytometry.

Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of calcium homeostasis modulators, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of betulinic acid or its derivative (p < 0.05; Mann – Whitney test)

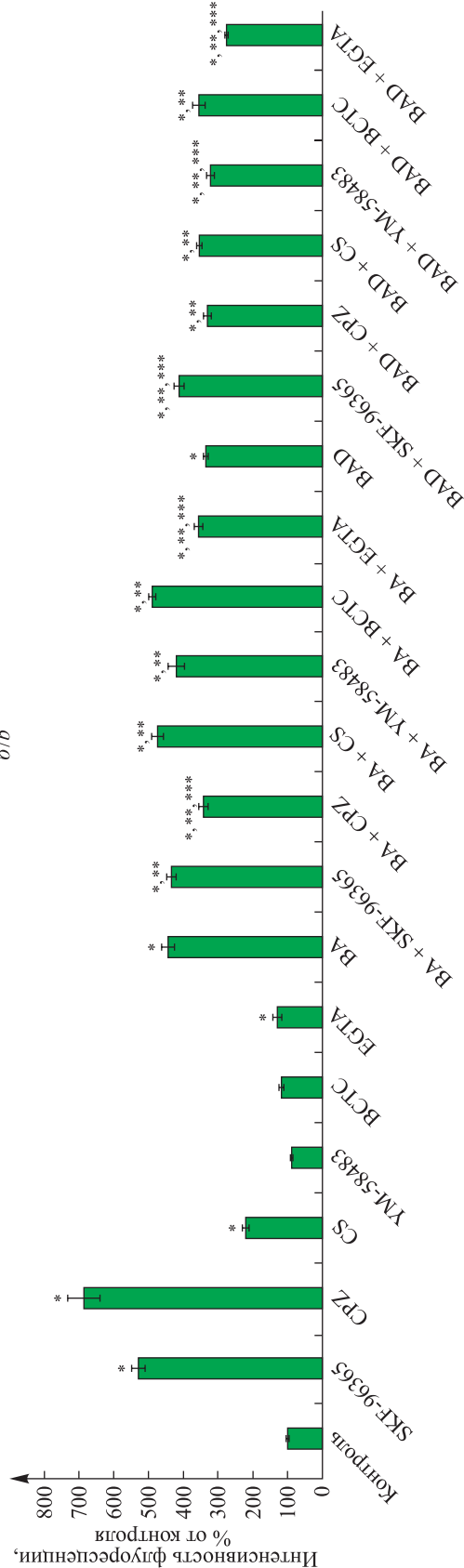
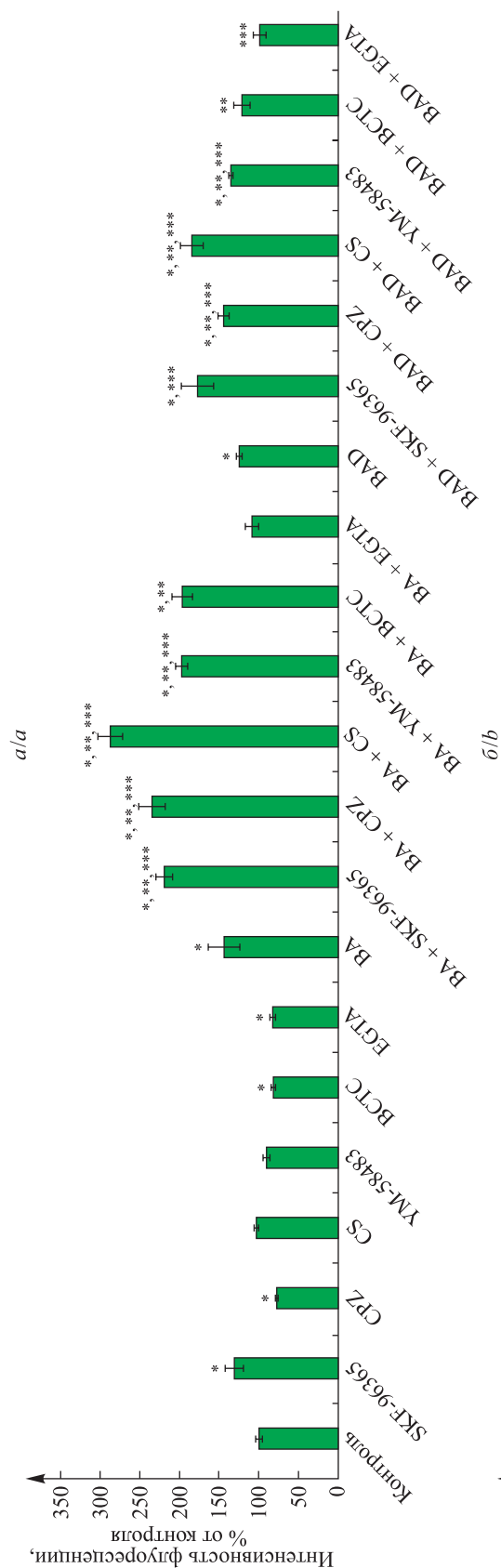


Рис. 13. Влияние SKF-96365 (20,0 мкмоль/л), хлорпромазина (CPZ; 14,0 мкмоль/л), циклоспорина А (CS; 2,0 мкмоль/л), YM-58483 (1,0 мкмоль/л), BCTC (0,2 мкмоль/л), EGTA (1,0 ммоль/л), бетулиновой кислоты (BA; 60,0 мкмоль/л), производного бетулиновой кислоты (BAD; 4,0 мкмоль/л) и их комбинаций на уровень  $Ca^{2+}$  в клетках HeLa ( $n = 5$ ) через 2 ч (а) и 48 ч (б) культивирования. Данные получены с использованием проточной цитометрии.

Знаком \* отмечены достоверные различия по отношению к контролю, знаком \*\* – достоверные различия по отношению к действию бетулиновой кислоты или ее производного ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)  
 Знаком \*\*\* – достоверные различия по отношению к действию бетулиновой кислоты или ее производного ( $p < 0,05$ ; тест Манна – Уитни)  
 Fig. 13. The effect of SKF-96365 (20.0  $\mu$ mol/L), chlorpromazine (CPZ; 14.0  $\mu$ mol/L), cyclosporine A (CS; 2.0  $\mu$ mol/L), YM-58483 (1.0  $\mu$ mol/L), BCTC (0.2  $\mu$ mol/L), EGTA (1.0 mmol/L), betulinic acid (BA; 60.0  $\mu$ mol/L), a betulinic acid derivative (BAD; 4.0  $\mu$ mol/L) and their combinations on the  $Ca^{2+}$  level in HeLa cells ( $n = 5$ ) after 2 h (a) and 48 h (b) of cultivation. Data obtained using flow cytometry.

Sign \* indicates significant differences compared to the control, sign \*\* – significant differences compared to the effect of calcium homeostasis modulators, sign \*\*\* – significant differences compared to the effect of betulinic acid or its derivative ( $p < 0.05$ ; Mann – Whitney test)

Представленные данные показывают, что бетулиновая кислота и ее производное могут индуцировать повышение уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . В экспериментах с клетками глиомы С6 подобный эффект наблюдался через 2 ч культивирования в присутствии бетулиновой кислоты, но не ее производного, в экспериментах с клетками HeLa – и через 2 ч, и через 48 ч культивирования в присутствии обоих препаратов. Эти результаты свидетельствуют, что повышение уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  под действием бетулиновой кислоты и ее производного не обязательно связано с их антипролиферативной активностью и само по себе не может служить достоверным маркером или необходимым условием реализации данного эффекта.

Анализ влияния SKF-96365 выявил сходство показателей двух исследованных типов клеток: через 2 или 48 ч культивирования указанный препарат индуцировал повышение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  либо тенденцию к его повышению. Сочетание SKF-96365 с бетулиновой кислотой или ее производным обеспечивало гораздо более выраженное подавление роста опухолевых клеток, чем эти препараты по отдельности. В большинстве случаев (но не всегда), помимо указанного эффекта, наблюдался и более высокий уровень  $\text{Ca}^{2+}$ . Можно предположить, что подобное влияние на уровень  $\text{Ca}^{2+}$  объясняется выходом  $\text{Ca}^{2+}$  из депо [31; 32] или переключением NCX на «реверсный» режим работы при действии SKF-96365 [30].

Исходя из полученных результатов, для реализации противоопухолевого эффекта бетулиновой кислоты и ее производного не требуется активация ингибируемых SKF-96365 ионных каналов. Вероятно, указанные тритерпеноиды и SKF-96365 имеют различные молекулярные мишени, так как антипролиферативный эффект комбинаций оказался мощнее суммы эффектов отдельных препаратов. Возможно, чувствительные к SKF-96365 механизмы участвуют в защите опухолевых клеток от действия бетулиновой кислоты и ее производного.

Согласно литературным данным хлорпромазин способен по-разному влиять на концентрацию ионов кальция в клетке. В частности, хлорпромазин может опосредовать снижение уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  через ингибирование кальмодулина и снижение активности зависящей от кальмодулина кальмодулинкиназы II. Последняя фосфорилирует рианодиновые [40] и инозитол-3-фосфатные (InsP3) [41] рецепторы, обеспечивающие выход ионов кальция из клеточных депо в цитозоль. Ряд исследователей полагают, что фосфорилирование данных белков усиливает их чувствительность к активирующим лигандам и способствует выходу кальция из депо, хотя этот механизм регуляции является предметом обсуждения [40]. Кроме того, на клетках мозжечка показано, что хлорпромазин и другие антагонисты кальмодулина могут снижать высвобождение кальция из депо [42] независимо от InsP3.

В то же время комплекс  $\text{Ca}^{2+}$  – кальмодулин рассматривается как эндогенный ингибитор InsP3 и рианодиновых рецепторов (причем кальмодулин прямо связывается с указанными рецепторами) [43–45], поэтому ингибирование кальмодулина может усиливать выход  $\text{Ca}^{2+}$  из депо эндоплазматического ретикула. В экспериментах с клетками глиобластомы человека (GBM-8401) хлорпромазин в концентрации от 10 до 40 мкмоль/л увеличивал внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  (изучалась концентрация через 250–800 с после воздействия) и оказывал цитотоксическое действие, чего не наблюдалось в отношении астроцитов человека. Подобный эффект достигался за счет притока  $\text{Ca}^{2+}$  через депоуправляемый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , а также за счет зависящего от фосфолипазы C высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из эндоплазматического ретикула [46]. В митохондриях мышечных клеток хлорпромазин вызывал временный подъем уровня  $\text{Ca}^{2+}$  [47]. Вместе с тем имеются сведения, что хлорпромазин способен оказывать ингибирующее действие на опухолевые клетки не только путем регуляции кальциевого обмена клетки, но и посредством множества иных механизмов – подавления синтеза ДНК, повышения проницаемости клеточной мембраны, изменения активности онкогенных белков и работы других каналов, помимо кальциевых каналов [37], нарушения функции лизосом [48].

В проведенных нами экспериментах хлорпромазин вызывал снижение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  или тенденцию к его снижению через 2 ч культивирования и повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  через 48 ч культивирования, при этом наблюдалось подавление роста опухолевых клеток. Этот результат в определенной степени согласуется с данными работы [46] и позволяет осторожно предположить, что действие хлорпромазина может зависеть от ингибирования им кальмодулина, активации депоуправляемого входа кальция и высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из эндоплазматического ретикула, хотя механизмы наблюдаемых эффектов еще требуют изучения.

Циклоспорин А в наших опытах способствовал повышению уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в опухолевых клетках через 48 ч культивирования. В данном случае увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при долгосрочном культивировании, вероятно, объясняется тем, что циклоспорин А способен подавлять активность кальциевой АТФазы плазматической мембраны – 1, которая выкачивает кальций из клетки. Подобный подъем уровня  $\text{Ca}^{2+}$  и подавление пролиферации наблюдались при действии циклоспорина А на клетки рака молочной железы (MDA-MB-231) через 24 ч культивирования [49].

Что касается подавления роста опухолевых клеток циклоспорином А, то оно может быть связано со снижением активности кальциневрина. Известно, что повышение циклоспорином А чувствительности

клеток миелоидного лейкоза к леналидомиду [50] и чувствительности клеток рака легкого к кризотинибу [51] обусловлено ингибированием кальциневрина. В то же время циклоспорин А способен подавлять рост клеток рака толстой кишки независимо от кальциневрина, замедляя прогрессирование клеточного цикла и индуцируя некроптоз [52]. Кроме того, отмечено, что циклоспорин А, связываясь с циклофилином D, нарушает взаимодействие последнего с антиапоптотическим белком Bcl2, что ведет к подавлению высвобождения цитохрома С из митохондрий независимо от митохондриальной поры [53]. Проведенные нами эксперименты показывают, что воздействие циклоспорина А связано с повышением уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле и подавлением роста опухолевых клеток. Принимая во внимание представленную в литературе информацию, можно предположить, что влияние циклоспорина А на уровень  $\text{Ca}^{2+}$  зависит от снижения активности кальцевой АТФазы плазматической мембраны, а подавление пролиферации клеток – от ингибирования кальциневрина [49–51] и (или), возможно, кальциневриннезависимых механизмов. Однако имеющиеся литературные данные пока не позволяют четко ответить на вопрос о том, зависит ли антипролиферативный эффект циклоспорина А от уровня  $\text{Ca}^{2+}$ . Вместе с тем полученные нами результаты, а именно подъем уровня  $\text{Ca}^{2+}$  при внесении хлорпромазина и циклоспорина А, равно как и снижение их антипролиферативного действия в присутствии EGTA, могут рассматриваться как свидетельство того, что реализация эффектов этих препаратов зависит от уровня  $\text{Ca}^{2+}$ .

При комбинировании бетулиновой кислоты или ее производного с хлорпромазином либо циклоспорином А наблюдалось усиление их антипролиферативного действия. Следовательно, реализация данного эффекта бетулиновой кислоты и ее производного не связана с активацией кальмодулина и кальциневрина.

Подавление роста клеток в ряде случаев (но не всегда) сопровождалось повышением уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Указанное обстоятельство позволяет предположить, что повышение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  не является непосредственной причиной усиления антипролиферативного эффекта.

УМ-58483 и ВСТС в проведенных нами экспериментах слабо снижали пролиферацию клеток и уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле либо не влияли на них. Вероятно, депоуправляемые каналы, а также каналы TRPM8 и TRPV1 участвуют в обеспечении уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , необходимого для нормального роста опухолевых клеток, однако роль этих каналов не является определяющей. Совместное применение указанных ингибиторов с бетулиновой кислотой или ее производным приводило к более выраженному подавлению роста опухолевых клеток, чем в случае использования препаратов по отдельности, при этом уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках HeLa слабо повышался либо не отличался от такового в присутствии только бетулиновой кислоты или ее производного, а уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках глиомы С6 снижался либо не отличался от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при внесении только бетулиновой кислоты или ее производного. Исходя из этих данных, антипролиферативное действие бетулиновой кислоты и ее производного не связано с активацией каналов TRPM8, TRPV1 и депоуправляемых каналов. Повышение либо снижение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле не является признаком или условием реализации антипролиферативного эффекта.

Интересно, что EGTA способствовала снижению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  через 2 ч культивирования и его повышению через 48 ч культивирования. Так как 1 ммоль/л EGTA не хелатирует весь  $\text{Ca}^{2+}$  среды культивирования, можно предположить, что уменьшение концентрации этих ионов в среде могло повлиять на активность кальциевых каналов и насосов и в итоге привести к повышению уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. В большинстве случаев EGTA снижала уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках, культивируемых в присутствии бетулиновой кислоты или ее производного, усиливая при этом наблюдаемый антипролиферативный эффект. Вероятно, повышение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле не обуславливает противоопухолевое действие бетулиновой кислоты, а возможно, даже, напротив, способствует запуску защитных процессов в клетках.

В то же время EGTA ослабляла ингибирующий эффект хлорпромазина, циклоспорина А и их комбинаций с бетулиновой кислотой или ее производным. Указанные результаты согласуются с полученными на клетках глиобластомы человека (GBM-8401) данными о том, что противоопухолевое действие хлорпромазина нивелируется хелатором ионов кальция ВАРТА-АМ [46]. Все вышесказанное позволяет заключить, что антипролиферативный эффект хлорпромазина и циклоспорина А зависит от кальция.

Возможно, EGTA, обладая неспецифическим действием, инактивирует кальцийзависимые (в том числе кальмодулинзависимые) ферменты, которые не только способствуют выживанию клеток, но и участвуют в ингибировании их роста, а также индукции клеточной гибели. Можно предположить, что хелатирование кальция подавляет апоптоз – кальцийзависимый процесс, который, согласно данным литературы, может индуцироваться хлорпромазином [54; 55] и циклоспорином А [56; 57].

Таким образом, в наших экспериментах бетулиновая кислота и ее производное подавляли рост клеток глиомы С6 и HeLa.

SKF-96365 (блокирует депоуправляемый вход кальция, каналы TRPC3, TRPC6 и TRPV2, а также способствует работе NCX в «реверсном» режиме) оказывал самостоятельное ингибирующее действие на опухолевые клетки и значительно усиливал антипролиферативный эффект бетулиновой кислоты и ее производного.

В то же время ВСТС (блокатор каналов TRPM8 и TRPV1) и YM-58483 (ингибитор депоуправляемых каналов) оказывали аналогичное по направленности, но гораздо более слабое действие (если вообще его оказывали).

Исходя из полученных данных, в качестве структур, способствующих росту опухолевых клеток и их устойчивости к действию бетулиновой кислоты и ее производного, могут рассматриваться рецепторы, нечувствительные к ВСТС и YM-58483, но чувствительные к SKF-96365, – TRPC3, TRPC6 и TRPV2, а также NCX. Ранее нами было показано, что рутениевый красный, являющийся блокатором канала TRPV2, усиливает ингибирующее действие бетулиновой кислоты на опухолевые клетки [58]. В совокупности с вышеизложенным это позволяет предполагать возможную протекторную роль канала TRPV2 в опухолевых клетках.

Представленные в настоящей работе и публикации [58] данные об усилении подавления роста опухолевых клеток при сочетании бетулиновой кислоты или ее производного с хлорпромазином и циклоспорином А свидетельствуют в пользу того, что структуры, чувствительные к этим препаратам, в частности, возможно, кальцийсвязывающие белки кальмодулин и кальциневрин, способствуют росту опухолевых клеток.

Противоопухолевое действие бетулиновой кислоты и ее производного не связано с активацией ионных каналов, чувствительных к SKF-96365, ВСТС и YM-58483 (каналы TRPM8 и TRPV1, депоуправляемые каналы), а также белков, чувствительных к хлорпромазину и циклоспорино А (кальмодулин, кальциневрин), и не снижается в присутствии их ингибиторов. Напротив, применение SKF-96365, хлорпромазина либо циклоспорина А в сочетании с бетулиновой кислотой или ее производным обеспечивало более выраженное подавление клеточного роста, чем в случае использования указанных препаратов по отдельности.

Исследование уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  показало, что взаимосвязь этого показателя и пролиферации клеток является неоднозначной и может зависеть от типа клеток, использованных препаратов и длительности культивирования. Подавление клеточного роста под влиянием бетулиновой кислоты, ее производного и их комбинаций с модуляторами активности кальциевых каналов (транспортёров) и кальцийзависимых белков во многих случаях (но не всегда) сопровождалось повышением уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , но при этом более выраженное торможение роста клеток не обязательно совпадало с наиболее высоким уровнем  $\text{Ca}^{2+}$ . В ряде случаев при усилении антипролиферативного действия наблюдалось снижение уровня  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Возможно, указанное обстоятельство объясняется различиями в механизмах действия изучаемых препаратов. Также нельзя исключать вероятность того, что выявленные эффекты обусловлены перераспределением ионов между внутриклеточными депо и (или) изменением локальной концентрации кальция в микродоменах, где сгруппированы ионные каналы и эффекторные белки [59]. Анализ подобных явлений предполагает применение методов, позволяющих оценивать пространственно-временную динамику потоков  $\text{Ca}^{2+}$ , что пока остается за рамками данного исследования.

Полученные нами результаты показывают, что наблюдаемые изменения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  зависят от типа клеток. Такая зависимость может быть следствием различной экспрессии целевых структур использованных препаратов.

Разница в действии бетулиновой кислоты и ее производного, вероятно, связана с различиями в их химической структуре. Эти различия, в свою очередь, могут обуславливать разную скорость развития внутриклеточных реакций, а также различные или, по крайней мере, не полностью идентичные непосредственные молекулярные мишени соединений и, соответственно, различный механизм действия. На текущий момент все указанные вопросы остаются неисследованными и данные, которые позволили бы обосновать высказанные гипотезы, отсутствуют.

Кроме того, вызванные исследуемыми препаратами изменения уровня  $\text{Ca}^{2+}$  зависят от продолжительности воздействия, на что указывают отличия при 2- и 48-часовом культивировании. Вопрос о том, является ли это следствием адаптации клетки к изменению кальциевой регуляции и быстрой активации компенсаторных механизмов, слабой чувствительности клеток к препаратам или же иных процессов, остается открытым и требует проведения более детальных исследований.

## Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало, что бетулиновая кислота и ее производное подавляют рост опухолевых клеток, таких как клетки глиомы C6 и HeLa, слабо влияя на незлокачественные клетки, в частности клетки FL и первичную культуру клеток головного мозга крысы.

Модуляторы активности кальциевых каналов и кальцийсвязывающих белков – SKF-96365, хлорпромазин и циклоспорин А, а также хелатор ионов кальция EGTA в различной степени способствуют торможению роста опухолевых клеток, а при комбинировании с бетулиновой кислотой или ее производным – усилению противоопухолевого эффекта по сравнению с таковым при отдельном использовании

препаратов. Наиболее выраженное подавление роста опухолевых клеток отмечено в случае сочетания SKF-96365 с бетулиновой кислотой или ее производным.

Исходя из вышесказанного, можно предположить, что для реализации противоопухолевого действия бетулиновой кислоты и ее производного не требуется активация ингибируемых SKF-96365, хлорпромазином и циклоспорином А мишеней, включая депоуправляемые каналы, каналы TRP, кальмодулин и кальциневрин. Более того, есть вероятность, что чувствительные к SKF-96365 механизмы, а также кальмодулин- и кальциневринзависимые механизмы способствуют росту опухолевых клеток и их устойчивости к бетулиновой кислоте и ее производному.

Антипролиферативный эффект бетулиновой кислоты, ее производного и их комбинаций с модуляторами кальциевого гомеостаза сопровождается как повышением, так и в ряде случаев снижением уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , вероятно, из-за различий в механизмах действия препаратов, а также сложности, динамичности и клеточно-специфических особенностей кальциевой сигнализации.

Результаты исследования открывают перспективы для разработки направленных на кальциевые каналы и кальцийзависимые белки комбинированных схем противоопухолевой терапии с применением бетулиновой кислоты и ее аналогов.

### Библиографические ссылки

1. Jin SW, Choi CY, Hwang YP, Kim HG, Kim SJ, Chung YC, et al. Betulinic acid increases eNOS phosphorylation and NO synthesis via the calcium-signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(4):785–791. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05416.
2. Calderon-Rivera A, Gomez K, Loya-López S, Wijeratne EMK, Stratton H, Tang C, et al. Betulinic acid analogs inhibit N- and T-type voltage-gated calcium channels to attenuate nerve-injury associated neuropathic and formalin models of pain. *Neurobiology of Pain*. 2023;13:100116. DOI: 10.1016/j.ynpai.2023.100116.
3. Quan HY, Kim DY, Kim SJ, Jo HK, Kim GW, Chung SH. Betulinic acid alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting SREBP1 activity via the AMPK-mTOR-SREBP signaling pathway. *Biochemical Pharmacology*. 2013;85(9):1330–1340. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.02.007.
4. Bellampalli SS, Ji Y, Moutal A, Cai S, Wijeratne EMK, Gandini MA, et al. Betulinic acid, derived from the desert lavender *Hyp-*tis emoryi**, attenuates paclitaxel-, HIV-, and nerve injury-associated peripheral sensory neuropathy via block of N- and T-type calcium channels. *Pain*. 2019;160(1):117–135. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001385.
5. Liu X, Feng C, Yan L, Cao J, Zhu X, Li M, et al. Calcium channels as pharmacological targets for cancer therapy. *Clinical and Experimental Medicine*. 2025;25:94. DOI: 10.1007/s10238-025-01632-z.
6. Gielecińska A, Kciuk M, Kontek R. The impact of calcium overload on cellular processes: exploring calcicoptosis and its therapeutic potential in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(24):13727. DOI: 10.3390/ijms252413727.
7. Berchtold MW, Villalobo A.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin signaling in organismal aging and cellular senescence: impact on human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Basis of Disease*. 2025;1871(2):167583. DOI: 10.1016/j.bbadis.2024.167583.
8. Sobue K. Calmodulin: a highly conserved and ubiquitous  $\text{Ca}^{2+}$  sensor. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*. 2024;100(7):368–386. DOI: 10.2183/pjab.100.025.
9. Ulengin-Talkish I, Cyert MS. A cellular atlas of calcineurin signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research*. 2023;1870(1):119366. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2022.119366.
10. Khlebnikova TS, Piven' YuA, Lakhvich FA, Frolova TS, Sorokina IV, Tolstikova TG. Synthesis and cytotoxicity of conjugates of betulinic acid and F-containing 2-acylcycloalkane-1,3-diones. *Chemistry of Natural Compounds*. 2018;54(6):1100–1105. DOI: 10.1007/s10600-018-2565-y.
11. Ivanova AE, Gorbacheva LR, Strukova SM, Pinelis VG, Reiser G. Activated protein C and thrombin participate in the regulation of astrocyte functions. *Biochemistry (Moscow), Supplement. Series A, Membrane and Cell Biology*. 2014;8(1):50–59. DOI: 10.1134/S1990747813050048.
12. Ramachandran RP, Spiegel C, Keren Y, Danieli T, Melamed-Book N, Pal RR, et al. Mitochondrial targeting of the enteropathogenic *Escherichia coli* Map triggers calcium mobilization, ADAM10-MAP kinase signaling, and host cell apoptosis. *mBio*. 2020;11(5):e01397-20. DOI: 10.1128/mBio.01397-20.
13. Taverner WK, Jacobus EJ, Christianson J, Champion B, Paton AW, Paton JC, et al. Calcium influx caused by ER stress inducers enhances oncolytic adenovirus enadenotucirev replication and killing through PKC $\alpha$  activation. *Molecular Therapy Oncolytics*. 2019;15:117–130. DOI: 10.1016/j.omto.2019.09.003.
14. Saura J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *Journal of Neuroinflammation*. 2007;4:26. DOI: 10.1186/1742-2094-4-26.
15. Kim SY, Hwangbo H, Kim MY, Ji SY, Kim DH, Lee H, et al. Betulinic acid restricts human bladder cancer cell proliferation *in vitro* by inducing caspase-dependent cell death and cell cycle arrest, and decreasing metastatic potential. *Molecules*. 2021;26(5):1381. DOI: 10.3390/molecules26051381.
16. Jiang W, Li X, Dong S, Zhou W. Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: application and research progress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;142:111990. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111990.
17. Zhang H, Zhou M, Ye C, Qin J, Lu X, Wang C, et al. Betulinic acid inhibits the proliferation of human laryngeal carcinoma cells through reactive oxygen species-mediate mitochondrial apoptotic pathway. *Toxicology in Vitro*. 2024;95:105756. DOI: 10.1016/j.tiv.2023.105756.
18. Jantarantotai N, Choi HB, McLarnon JG. ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. *BMC Cancer*. 2009;9:442. DOI: 10.1186/1471-2407-9-442.

19. Zhu M, Lv B, Ge W, Cui Z, Zhao K, Feng Y, et al. Suppression of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry regulated by silencing Orai1 inhibits C6 glioma cell motility via decreasing Pyk2 activity and promoting focal adhesion. *Cell Cycle*. 2020;19(24):3468–3479. DOI: 10.1080/15384101.2020.1843814.
20. Bittremieux M, Mikoshiba K, Bultynck G. Data on cytotoxicity in HeLa and SU-DHL-4 cells exposed to DPB162-AE compound. *Data Brief*. 2017;12:91–96. DOI: 10.1016/j.dib.2017.03.034.
21. Li S, Xue J, Sun Z, Liu T, Zhang L, Wang L, et al. CaMKII potentiates store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry through enhancing STIM1 aggregation and interaction with Orai1. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;46(3):1042–1054. DOI: 10.1159/000488835.
22. Sanchez-Collado J, Lopez JJ, Jardin I, Berna-Erro A, Camello PJ, Cantonero C, et al. Orai1 $\alpha$ , but not Orai1 $\beta$ , co-localizes with TRPC1 and is required for its plasma membrane location and activation in HeLa cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022;79(1):33. DOI: 10.1007/s00018-021-04098-w.
23. Chen T, Zhu J, Zhang C, Huo K, Fei Z, Jiang X. Protective effects of SKF-96365, a non-specific inhibitor of SOCE, against  $\text{MPP}^{+}$ -induced cytotoxicity in PC12 cells: potential role of Homer1. *PLOS One*. 2013;8(1):e55601. DOI: 10.1371/journal.pone.0055601.
24. Shan D, Marchase RB, Chatham JC. Overexpression of TRPC3 increases apoptosis but not necrosis in response to ischemia-reperfusion in adult mouse cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2008;294(3):C833–C841. DOI: 10.1152/ajpcell.00313.2007.
25. Ramanathan G, Mannhalter C. Increased expression of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) in differentiating human megakaryocytes. *Cell Biology International*. 2016;40(2):223–231. DOI: 10.1002/cbin.10558.
26. Ishii T, Uchida K, Hata S, Hatta M, Kita T, Miyake Y, et al. TRPV2 channel inhibitors attenuate fibroblast differentiation and contraction mediated by keratinocyte-derived TGF- $\beta$ 1 in an *in vitro* wound healing model of rats. *Journal of Dermatological Science*. 2018;90(3):332–342. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2018.03.003.
27. Andres D, Keyser B, Benton B, Melber A, Olivera D, Holmes W, et al. Transient receptor potential (TRP) channels as a therapeutic target for intervention of respiratory effects and lethality from phosgene. *Toxicology Letters*. 2016;244:21–27. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.11.004.
28. Schwarz G, Droogmans G, Nilius B. Multiple effects of SK&F 96365 on ionic currents and intracellular calcium in human endothelial cells. *Cell Calcium*. 1994;15(1):45–54. DOI: 10.1016/0143-4160(94)90103-1.
29. Gagnon KB, Delpire E. Sodium transporters in human health and disease. *Frontiers in Physiology*. 2020;11:588664. DOI: 10.3389/fphys.2020.588664.
30. Song M, Chen D, Yu SP. The TRPC channel blocker SKF-96365 inhibits glioblastoma cell growth by enhancing reverse mode of the  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger and increasing intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *British Journal of Pharmacology*. 2014;171(14):3432–3447. DOI: 10.1111/bph.12691.
31. Jan CR, Ho CM, Wu SN, Tseng CJ. Multiple effects of 1-[ $\beta$ -(3-(4-methoxyphenyl)propoxy)-4-methoxyphenethyl]-1H-imidazole hydrochloride (SKF-96365) on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in MDCK cells: depletion of thapsigargin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  store followed by capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry, activation of a direct  $\text{Ca}^{2+}$  entry, and inhibition of thapsigargin-induced capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1999;359(2):92–101. DOI: 10.1007/pl00005336.
32. Iouzalet L, Lantoine F, Pernollet M-G, Millanvoeye-van Brussel E, Devynck M-A, David-Dufilho M. SK&F 96365 inhibits intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and raises cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration without production of nitric oxide and von Willebrand factor. *Cell Calcium*. 1996;20(6):501–508. DOI: 10.1016/s0143-4160(96)90092-5.
33. Weil A, Moore SE, Waite NJ, Randall A, Gunthorpe MJ. Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors TRPV1 and TRPM8. *Molecular Pharmacology*. 2005;68(2):518–527. DOI: 10.1124/mol.105.012146.
34. Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, et al. Potent inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(13):12427–12437. DOI: 10.1074/jbc.M309297200.
35. Chen L, Song M, Yao C. Calcineurin in development and disease. *Genes & Diseases*. 2022;9(4):915–927. DOI: 10.1016/j.gendis.2021.03.002.
36. Creamer TP. Calcineurin. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18:137. DOI: 10.1186/s12964-020-00636-4.
37. Kamgar-Dayhoff P, Brelidze TI. Multifaceted effect of chlorpromazine in cancer: implications for cancer treatment. *Oncotarget*. 2021;12(14):1406–1426. DOI: 10.18632/oncotarget.28010.
38. Flores C, Fouquet G, Moura IC, Maciel TT, Hermine O. Lessons to learn from low-dose cyclosporine A: a new approach for unexpected clinical applications. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:588. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00588.
39. Agnes F, Sartorelli P, Bisso MC, Dominoni S. Ionized calcium in calf serum: relation to total serum calcium, albumin, total protein and pH. *Journal of Veterinary Medicine. Series A*. 1993;40(8):605–608. DOI: 10.1111/j.1439-0442.1993.tb00673.x.
40. Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM.  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  leak in heart failure. *Circulation Research*. 2005;97(12):1314–1322. DOI: 10.1161/01.RES.0000194329.41863.89.
41. Foskett JK, White C, Cheung K-H, Mak DOD. Inositol trisphosphate receptor  $\text{Ca}^{2+}$  release channels. *Physiological Reviews*. 2007;87(2):593–658. DOI: 10.1152/physrev.00035.2006.
42. Khan SZ, Dyer JL, Michelangeli F. Inhibition of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channel by calmodulin antagonists. *Cellular Signalling*. 2001;13(1):57–63. DOI: 10.1016/s0898-6568(00)00140-6.
43. Nadif Kasri N, Bultynck G, Sienaert I, Callewaert G, Erneux C, Missiaen L, et al. The role of calmodulin for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Proteins and Proteomics*. 2002;1600(1–2):19–31. DOI: 10.1016/s1570-9639(02)00440-5.
44. Hirota J, Michikawa T, Natsume T, Furuichi T, Mikoshiba K. Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release through the purified and reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *FEBS Letters*. 1999;456(2):322–326. DOI: 10.1016/s0014-5793(99)00973-4.
45. Taylor CW, Laude AJ.  $\text{IP}_3$  receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ . *Cell Calcium*. 2002;32(5–6):321–334. DOI: 10.1016/s0143416002001859.
46. Chu C-S, Lin Y-S, Liang W-Z. The impact of the antipsychotic medication chlorpromazine on cytotoxicity through  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway in glial cell models. *Neurotoxicity Research*. 2022;40(3):791–802. DOI: 10.1007/s12640-022-00507-5.

47. Schmitt N, Lucas-Heron B, Ollivier B. Changes in mitochondrial calmitine and calcium in rat denervated skeletal muscle after injection of a myotoxic drug, chlorpromazine. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative Pharmacology*. 1993;104(3):389–393. DOI: 10.1016/0742-8413(93)90006-7.
48. Jacob JR, Palanichamy K, Chakravarti A. Antipsychotics possess anti-glioblastoma activity by disrupting lysosomal function and inhibiting oncogenic signaling by stabilizing PTEN. *Cell Death & Disease*. 2024;15:414. DOI: 10.1038/s41419-024-06779-3.
49. Caner A, Onal MG, Bitgen N, Sezer G. The effect of cyclosporine A on proteins controlling intracellular calcium concentration in breast cancer cells. *The Journal of Membrane Biology*. 2022;255(1):33–39. DOI: 10.1007/s00232-021-00201-1.
50. He X, Dou A, Feng S, Roman-Rivera A, Hawkins C, Lawley L, et al. Cyclosporine enhances the sensitivity to lenalidomide in MDS/AML *in vitro*. *Experimental Hematology*. 2020;86:21–27.e2. DOI: 10.1016/j.exphem.2020.05.001.
51. Liu Z, Jiang L, Li Y, Xie B, Xie J, Wang Z, et al. Cyclosporine A sensitizes lung cancer cells to crizotinib through inhibition of the  $Ca^{2+}$ /calcineurin/Erk pathway. *EBioMedicine*. 2019;42:326–339. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.03.019.
52. Werneck MBF, Hottz E, Bozza PT, Viola JPB. Cyclosporin A inhibits colon cancer cell growth independently of the calcineurin pathway. *Cell Cycle*. 2012;11(21):3997–4008. DOI: 10.4161/cc.22222.
53. Eliseev RA, Malecki J, Lester T, Zhang Y, Humphrey J, Gunter TE. Cyclophilin D interacts with Bcl2 and exerts an anti-apoptotic effect. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(15):9692–9699. DOI: 10.1074/jbc.M808750200.
54. Jhou A-J, Chang H-C, Hung C-C, Lin H-C, Lee Y-C, Liu W, et al. Chlorpromazine, an antipsychotic agent, induces G2/M phase arrest and apoptosis via regulation of the PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy pathways in human oral cancer. *Biochemical Pharmacology*. 2021;184:114403. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114403.
55. Fujiwara R, Taniguchi Y, Rai S, Iwata Y, Fujii A, Fujimoto K, et al. Chlorpromazine cooperatively induces apoptosis with tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutated lung cancer cell lines and restores the sensitivity to gefitinib in T790M-harboring resistant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022;626:156–166. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.08.010.
56. Kim HS, Choi S-I, Jeung E-B, Yoo Y-M. Cyclosporine A induces apoptotic and autophagic cell death in rat pituitary GH3 cells. *PLOS One*. 2014;9(10):e108981. DOI: 10.1371/journal.pone.0108981.
57. Siddiqui SS, Hodeify R, Mathew S, Alsawaf S, Alghfeli A, Matar R, et al. Differential dose-response effect of cyclosporine A in regulating apoptosis and autophagy markers in MCF-7 cells. *Inflammopharmacology*. 2023;31(4):2049–2060. DOI: 10.1007/s10787-023-01247-4.
58. Терпинская ТИ, Янченко ТЛ, Рубинская МА, Полукошко ЕФ. Влияние бетулиновой кислоты и модуляторов кальциевого обмена на рост опухолевых клеток. *Биохимия и молекулярная биология*. 2024;3(1):136–142.
59. Crul T, Maléth J. Endoplasmic reticulum – plasma membrane contact sites as an organizing principle for compartmentalized calcium and cAMP signaling. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4703. DOI: 10.3390/ijms22094703.

Получена 11.08.2025 / исправлена 18.11.2025 / принята 24.11.2025.  
Received 11.08.2025 / revised 18.11.2025 / accepted 24.11.2025.

#### Авторы:

**Татьяна Ильинична Терпинская** – кандидат биологических наук, доцент; ведущий научный сотрудник Центра медицинской микробиологии и антибиотикорезистентности.

**Татьяна Леонидовна Янченко** – научный сотрудник Центра медицинской микробиологии и антибиотикорезистентности.

**Карина Викторовна Маркевич** – младший научный сотрудник Центра медицинской микробиологии и антибиотикорезистентности.

**Мария Александровна Рубинская** – младший научный сотрудник Центра медицинской микробиологии и антибиотикорезистентности.

**Елена Федоровна Полукошко** – старший научный сотрудник Центра медицинской микробиологии и антибиотикорезистентности.

**Юрий Андреевич Пивень** – кандидат химических наук; заведующий лабораторией химии простагландинов.

#### Authors:

**Tatiana I. Terpinskaya**, PhD (biology), docent; leading researcher at the Centre for Medical Microbiology and Antibiotic Resistance.

[terpinskayat@mail.ru](mailto:terpinskayat@mail.ru)

<https://orcid.org/0000-0002-4536-3580>

**Tatsiana L. Yanchanka**, researcher at the Centre for Medical Microbiology and Antibiotic Resistance.

[tanyaya190@gmail.com](mailto:tanyaya190@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0002-9577-1013>

**Karina V. Markevich**, junior researcher at the Centre for Medical Microbiology and Antibiotic Resistance.

[karinamorozova\\_karina@mail.ru](mailto:karinamorozova_karina@mail.ru)

<https://orcid.org/0009-0004-7965-9357>

**Maryia A. Rubinskaya**, junior researcher at the Centre for Medical Microbiology and Antibiotic Resistance.

[masharubinskayaone@gmail.com](mailto:masharubinskayaone@gmail.com)

<https://orcid.org/0009-0008-8267-3036>

**Alena F. Palukoshka**, senior researcher at the Centre for Medical Microbiology and Antibiotic Resistance.

[efpoluko@list.ru](mailto:efpoluko@list.ru)

<https://orcid.org/0000-0003-2460-5242>

**Yuri A. Piven**, PhD (chemistry); head of the laboratory of prostaglandin chemistry.

[piven.ya@gmail.com](mailto:piven.ya@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0003-3640-0981>