

Действие терпенов пихты сибирской (*Abies sibirica*) на метаболические пути старения клеток человека и образования в них злокачественных опухолей

Анна Кудрявцева^{1,2*}, Георгий Краснов^{1*}, Анастасия Липатова¹, Борис Алексеев², Фания Маганова³, Михаил Шапошников⁴, Мария Федорова¹, Анастасия Снежкина, Алексей Москалев^{1,4,5}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Россия, Москва

²Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Минздрава России, 125284, Россия, Москва

³«Инитиум-Фарм» ЛТД, 142000, Россия, Москва

⁴Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 167982, Россия, Сыктывкар

⁵Московский физико-технический институт, 141700, Москва, Долгопрудный

*Эти авторы внесли равный вклад в работу

Контактная информация: Алексей Москалев, email: amoskalev@ib.komisc.ru

Ключевые слова: пихта сибирская (*Abies sibirica*), экстракт растений, терпеноиды, предотвращение старения, противоопухолевое действие

Статья получена: 12 августа 2016

Принята: 19 октября 2016

Опубликована: 19 ноября 2016

АННОТАЦИЯ

Большое количество терпеноидов проявляет потенциальные геропротекторные и противоопухолевые свойства. В этой работе мы провели полное транскриптомное исследование действия Абисила, субстанции на основе терпенов экстракта хвойных растений (пихты сибирской - *Abies sibirica*), на линии нормальных и раковых клеток. В качестве клеточной модели старения мы использовали фибробласты ранней стадии культивирования и сенесцентные неиммортизированные фибробласты. Выяснилось, что в нормальных фибробластах терпены индуцируют гены, отвечающие за реакцию на стресс, регуляцию апоптоза и регенерацию тканей. После введения экстракта пихты в старых клетках отмечалось восстановление уровня экспрессии некоторых генов, ответственных за продолжительность жизни. В линиях раковых клеток *Caco-2* и *AsPC-1* Абисил индуцировал экспрессию и онкосупрессоров (членов генных семейств *GADD45*, *DUSP* и *DDIT*), и протоонкогенов (*c-Myc*, *c-Jun*, *EGR* и других). Таким образом, исследование демонстрирует возможные антивозрастные и противоопухолевые действия Абисила в линиях старых и раковых клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что определенные экстракты растений обладают геропротекторными свойствами. По результатам исследований на животных, способность продлевать жизнь показали экстракты боярышника [1],

гинкго билоба [2], черники [3], розы дамасской [4], женьшеня [5], клюквы [6], зеленого чая [7], корня кушанки [8], листьев Альпинии церумбет [9], натто [10], родиолы розовой [11], черного риса [12], чеснока [13], яблока [14], чистеца лавандолистного [15], и

других. Противоопухолевые агенты могут выступать в качестве антивозрастных средств [16, 17]. Объектом особого интереса предстают терпеноиды (изопреноиды), самый большой класс органических соединений, который состоит из более, чем 30 000 производных [18-20]. Их синтезируют животные, грибы, микробы, но большинство терпеноидов растительного происхождения [21-23]. Растения производят терпеноиды в виде первичных и вторичных метаболитов. [24]. В качестве предшественника большинства терпеноидов выступает пятиуглеродный углеводород, изопентилдифосфат, биосинтез которого осуществляется мевалонатным путем из ацетила через стадию образования мевалоновой кислоты (Ac-MVA) [25]. Однако некоторые терпеноиды производятся посредством недавно открытого немевалонатного пути (non-MVA) [26, 27]. У терпеноидов разные функции: в растениях они участвуют в основных клеточных процессах, таких как рост и развитие клеток, регуляция стабильности клеточной мембраны, реакция на стресс и специализированный метаболизм [28, 29]. Многие терпеноиды показывают противоопухолевые и геропротекторные действия и являются потенциально пригодными соединениями для изыскания новых лекарственных средств [30-32]. Например, экстракты розы дамасской с высоким содержанием терпеноида, цитронеллола, продемонстрировали увеличение жизни дрозофилы за счет защиты от токсического действия железа и увеличения устойчивости мух к окислительному стрессу [30, 33, 34]. Бетулиновая кислота, тритерпен ряда лупан, получаемая из березы (*Betula spp.*), проявила антибактериальные, антималярийные и противовоспалительные свойства, активность против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и цитотоксичность в отношении раковых клеток [35-37]. Более того, такие терпеноиды, как урсоловая, маслиновая и олеаноловая кислоты показали антивозрастные и противоопухолевые свойства [14, 38-41]. Таким образом, противораковая активность терпеноидов и их геропротекторные свойства представляются перспективными для разных способов их применения в лечебных целях.

Мы сделали полный транскриптомный анализ действия Абисила - комплекса терпенов, синтезируемых пихтой сибирской, (с содержанием борнилацетата 10%) - на клеточные линии Caco-2 аденокарциномы толстой кишки человека и AsPC-1 аденокарциномы поджелудочной железы и неиммортиализованных фибробластов человека 6-го и 13-го пассажей на предмет возможных геропротекторных и противоопухолевых свойств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате воздействия препарата в разных клеточных линиях были выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены, (табл. 1 в Приложении).

Абисил изменил экспрессию генов, участвующих в адаптивном ответе на клеточный стресс (в 2 раза и более, средняя доля ложных отклонений гипотезы (FDR) <0.05), независимо от номера пассажей нормальных фибропластов. Среди измененных генов белок теплового шока 70 (*HSPA1B*, *HSPA1A*), гемоксигеназа-1, металлотионеин 1X и фосфатаза двойной специфичности, тип 2 (*DUSP2*).

DUSP2 дефосфорилирует митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK), которые участвуют в клеточной пролиферации, апоптозе, дифференциации и стресс-ответах [42]. Известно, что такие геропротекторы и горметины, как куркумин, индуцируют фермент гемоксигеназу-1 эндоплазматической сети [43], вовлеченный в адаптивную реакцию фибробластов человека на окислительный и химический стресс [44, 45]. Куркумин использует гем в различных белках и высвобождает двухвалентное железо [46]. В свою очередь металлотионеины (например, MT1X) индуцируются во время клеточной реакции на стресс при детоксикации ионов металла [47].

Также изменяется экспрессия генов, связанных с иммунной реакцией (*BHLHE40* [48] и *IFIT2* [49]), и факторами, относящимися к дифференцировке клеток (*FOSB* [50] и *TRIB1* [51]). Помимо этого, в липидном обмене важную роль играет *TRIB1* [52]. Ген повышенной экспрессии *Egr-3* – транскриптор генов в фибробластах, связанных с реконструкцией тканей и заживлением ран [53].

В фибробластах 6-го и 13-го пассажей Абисил подавил экспрессию проапоптотического гена *BMF* [54] и молекул клеточной адгезии: интегринов *ITGB7*, *ITGAM* [55] и гликопротеинов клеточной стенки *MUC13* [56].

Стоит отметить, что среди большинства представленных молекулярных путей, индуцированных Абисилом в нормальных фибробластах, значительная их доля соотносится с продлением жизни (сигнальные пути MAPK, FOXO и NIF-1). (Рис. 1) [57].

Примечательно, что в нормальных фибробластах 13-го пассажа Абисил меняет уровень экспрессии намного большего числа генов, чем в клетках 6-го пассажа. Когда определенный порог экспрессии увеличился в 2 раза и больше (FDR <0.05) в клетках 6-го пассажа Абисил активировал 21 ген и подавил 16 генов, в то время как в клетках 13-го пассажа уровень экспрессии был изменен у 43 и 67 генов соответственно. Такой результат может отражать большую случайность экспрессии в старых клетках, чем в молодых. Некоторые авторы отмечали связанное со старением увеличение межклеточных колебаний при экспрессии генов, так называемое усиление транскрипционного шума [58, 59]. Среди 31 гена с повышенной экспрессией, которые изменили активность только в 13-ом пассаже, преобладают гены, вовлеченные в процесс апоптоза (12 генов) и сигнальный путь MAPK (5 генов). Среди 62 генов с

пониженной экспрессией в фибробластах 13-го пассажа ген *BTG2* больше других, по нашему мнению, связан с процессом старения клеток. Показанная им экспрессия важна с точки зрения отрицательной регуляции клеточной пролиферации [60]. Таким образом, терпены экстракта пихты стимулируют в нормальных фибробластах гены стресс-ответа, регуляции апоптоза и регенерации тканей.

В этом исследовании пассирование фибробласта рассматривалось как одна из моделей старения. Фибробласты 13-го пассажа показывают разные внешние признаки клеточного старения, такие как ингибирование пролиферации в сравнении с 6-ым пассажем (контроль). В общем, при сопоставлении молодых и старых фибробластов было выявлено 5804 дифференциально экспрессирующихся генов.

Нужно отметить следующие черты профиля экспрессии, связанные со старением, в фибробластах: пониженная экспрессия разных молекул клеточной адгезии, экспрессия хемокинов, циклинкиназы, ламин, члены генного семейства *GADD45*, сАМР-зависимые факторы транскрипции (*CREB*) и сверхэкспрессия *PI3K/Akt*. Анализ представленности групп генов (*GSEA*) позволил нам определить ряд биологических процессов с самыми сильными изменениями в экспрессии генов (как часть модели старения): супрессия ангиогенеза, дифференцировка клеток, *MAPK* каскад, хемотаксис, реакция на гипоксию, регенерация тканей и другие процессы, такие как модуляция межклеточной коммуникации, адгезия, миграция и ионный обмен.

Возможный геропротектор может восстановить уровень экспрессии генов в старых клетках и трансформировать их в профили экспрессии генов более молодых клеток [61]. Вероятные механизмы потенциального геропротекторного действия Абисила это:

- *GADD45* – генное семейство, которое ответственно за сдерживание роста опухоли и продление жизни. Уровень экспрессии *GADD45* был понижен в 2 раза в фибробластах 13-го пассажа в сравнении с 6-ым пассажем. В то же самое время лечение введение Абисила вызвало двукратное увеличение уровня экспрессии генов *GADD45B/G* и повышение в полтора раза экспрессии гена *GADD45A*.
- Применение Абисила сопровождается увеличением в 1,5-3 раза экспрессии генов белков теплового шока *HSPA1B*, *HSPA1A*, *DNAJB9* (*Hsp40 B9*), *DNAJB4* (*Hsp40 B4*), *HSPH1*, *DNAJB1* (*Hsp40 B1*), *HSPA9* и других.
- Модуляция клеточного цикла, в частности сигнального пути *MAPK*.

- Модуляция сигнального пути *NF-κB*.
- Модуляция сигнального пути *Toll*-подобного рецептора.
 - Модуляция сигнального пути *TGF-beta*.
Также необходимо обратить внимание на индукцию компенсаторных изменений у следующих генов:
 - Экспрессия супрессивных регуляторов опухоли сигнального каскада *MAPK DUSP5*, *DUSP1* и *DUSP6* (фосфатазы двойной специфичности) уменьшается со старением фибробластов (в 13-ом пассаже по сравнению с 6-ым). Абисил восстанавливает ее до уровня, который превышает предыдущий показатель.
 - Уровень экспрессии протоонкогенов *MYC* (v-мус гомолог вирусного онкогена миелоцитоматоза птиц), *JUN* (*Jun* прото-онкоген), *FOSB* (*FBJ* гомолог *B* вирусного онкогена остеосаркомы мышей), *FOSL1* (*FOS*-родственный антиген 1) уменьшается во время старения фибробластов. Абисил восстанавливает экспрессию до уровня экспрессии молодых клеток.
 - Уровень экспрессии *SOCS3* (супрессора цитокиновых сигналов 3) снижается с возрастом. Абисил восстанавливает экспрессию до уровня ранних пассажей.
 - *CREB5* (сАМР-ответный элемент связывающего белка 5): генная экспрессия понижается с возрастом и восстанавливается до предыдущего уровня после добавления Абисила.
 - *DDIT3* (индуцибельный транскрипт 3 повреждения ДНК): генная экспрессия при старении понижается и восстанавливается до предыдущего уровня после введения Абисила.
 - *KLF2* и *KLF4* (*Kruppel*-подобные факторы 2 и 4): экспрессия генов во время старения снижается и восстанавливается до предыдущего уровня после введения Абисила.
 - *BMF* (поправочный коэффициент *Bcl2*), *TRIB3* (псевдокиназа семейства *Tribble 3*), *BHLHE40* (член генного семейства базисных протеинов спираль-петля-спираль e40), *TLR4* (*Toll*-подобный рецептор 4), *RGS4* (регулятор сигналов G-белка 4), *GDF15* (фактор дифференцировки роста 15), *NGFR* (рецептор нейроростового фактора) и *CTGF* (фактор роста соединительной ткани): генная экспрессия понижается с возрастом и восстанавливается до предыдущего уровня после введения Абисила.

По уровню смертности от онкологических заболеваний в мире рак поджелудочной железы занимает 6-ое место, а рак толстой кишки -3-е [62, 63]. Мы изучили действие Абисила на уровень экспрессии генов в клеточных линиях аденокарциномы толстой кишки (*Caco-2*) и аденокарциномы поджелудочной железы (*AsPC-1*) человека.

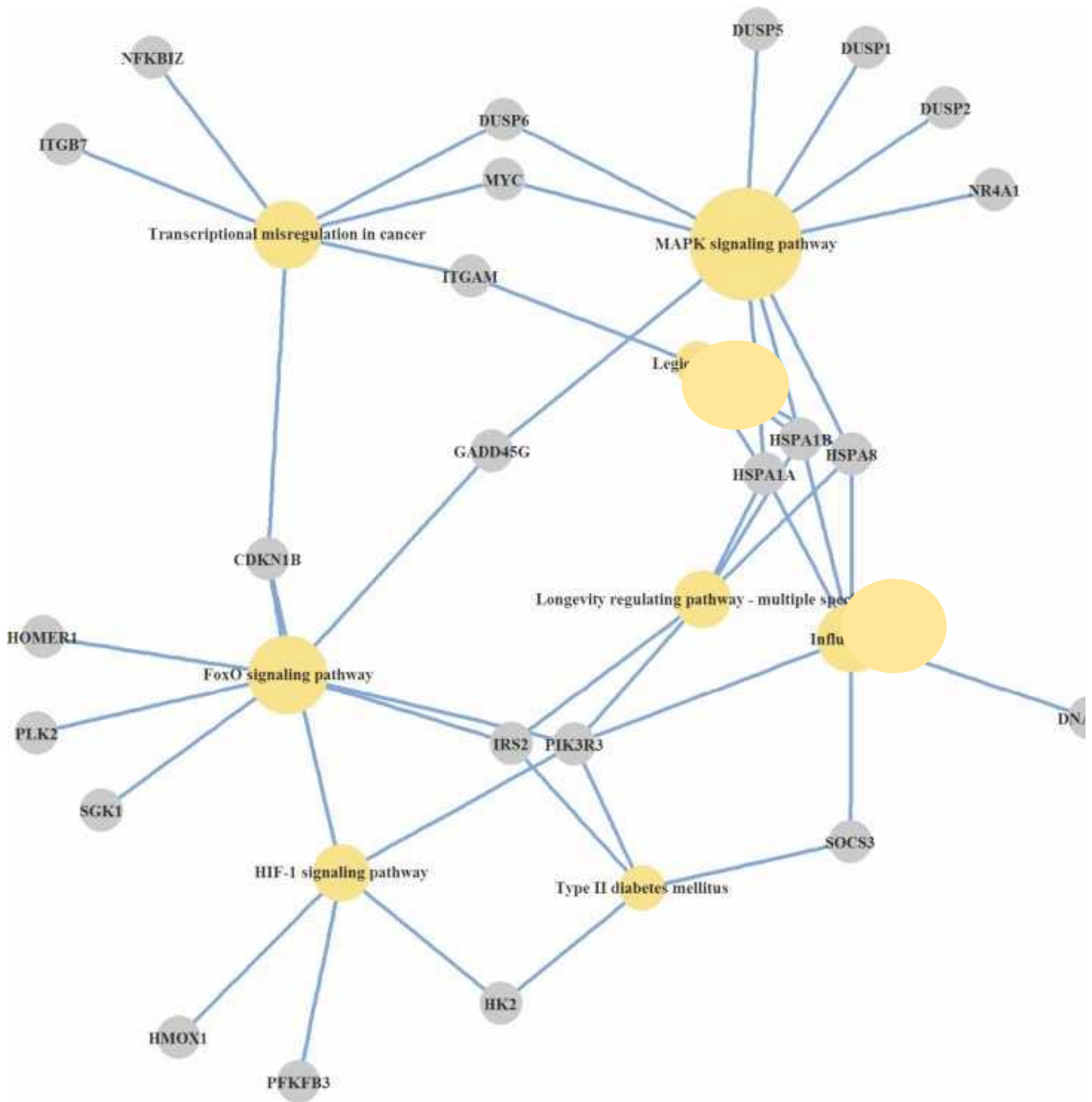


Рис. 1: Метаболические пути из базы KEGG с преобладанием генов, индуцированных Абисилом, в нормальных фибробластах. Представлены дифференциально экспрессирующиеся гены, метаболический путь клеток и процессы на уровне организма, которые с точки зрения статистики значительно преобладают в анализе GSEA.

Процесс генной онтологии	Гены
Апоптотический процесс	<i>EGR3, INHBA, PDK4, JUN, CTGF, DDIT4, GDF15, EGR2, EPHA2, EGR4, CLCF1, MYC, CXCR3, PPP1R15A, VEGFA, RFFL, OSGIN1, EGR1, GADD45B, CYR61, SNAI2, SOCS3, THBS1, FOSL1, SERPINE1, ID1, CEBPB, DDIT3, DUSP6, DSG3, EDAR, BMP2, PLK2, PLK3, ATF3, C8orf4, SPRY2, ANXA1, TNFRSF1A, PMAIP1, TNFSF15, ASNS, SOX9, NUA2, RNF41, PIMI, CTH, SIAH2, TNFRSF10B, GATA6, SQSTM1, IER3, CHAC1, STK40, TCF7L2, GADD45A, SOCS2, RIPK2, BIRC3, RHOB, FOXO3, F3, TNFSF9, PAWR, WNT7B, ARHGEF2, ADM, HIF0, ZC3H12A, HERPUD1, HK2, NCF2, DUSP1, ANKRD1, AEN, BBC3, PLEKHG2, EDN1, CITED2, GADD45G</i>
Межклеточная сигнальная трансдукция	<i>INHBA, CXCL8, ARL14, JUN, CTGF, DDIT4, GDF15, EPHA2, CLCF1, MYC, CXCR3, PPP1R15A, VEGFA, RFFL, RND3, GADD45B, CCL20, DUSP4, CYR61, SNAI2, SOCS3, THBS1, EDN2, ID1, CEBPB, NFATC1, DDIT3, NFKB2, DUSP6, EREG, EDAR, BMP2, ARHGAP32, PLK2, FAM110C, PLK3, DGKD, ATF3, C8orf4, SPRY2, TNFRSF1A, TRIB1, PMAIP1, PLCH1, DUSP8, TNFSF15, SOX9, NUA2, RNF41, CTH, SIAH2, TNFRSF10B, GAB2, SQSTM1, SESN2, IER3, LIF, CHAC1, CYTH1, SPSB1, DVL1, STK40, TCF7L2, GADD45A, SOCS2, RIPK2, BIRC3, CCDC88C, NFATC2, HRH1, SPRY4, RHOB, FOXO3, F3, CSF1, WNT7B, ARHGEF2, ARFRP1, ADM, FOS, HERPUD1, NCF2, DUSP1, ANKRD1, AEN, BBC3, DGKE, RAPGEF5, HBEGF, RAPIGAP2, PLEKHG2, WWC1, EDN1, GPAT3, AVPI1, GADD45G</i>
Клеточная реакция на органическое вещество	<i>EGR3, INHBA, CXCL8, PDK4, JUN, CTGF, DDIT4, GDF15, EGR2, EGR4, CLCF1, MYC, CXCR3, PPP1R15A, VEGFA, RFFL, EGR1, CXCL3, CCL20, DUSP4, CYR61, SNAI2, SOCS3, THBS1, TGIF1, SERPINE1, EDN2, ID1, KLF6, CEBPB, DDIT3, NFKB2, DUSP6, KLF2, EREG, EDAR, BMP2, MT1G, ATF3, CPEB2, SPRY2, ANXA1, TNFRSF1A, TRIB1, TNFSF15, ASNS, SOX9, PIMI, CTH, GATA6, SQSTM1, SYBU, MT1X, OASL, SOCS2, RIPK2, NEDD4L, BIRC3, HRH1, DKK1, CALB1, FAM83G, FOXO3, MT2A, F3, CSF1, NR1D1, PAWR, WNT7B, ARHGEF2, FOS, ZC3H12A, HERPUD1, NCF2, DUSP1, HDAC5, ANKRD1, BBC3, JUND, HBEGF, PLEKHG2, EDN1, CITED2</i>

Отметим повышенный уровень экспрессии всех 3-х генов (*GADD45A*, *GADD45B* и *GADD45G*), относящихся к семейству GADD45, как в нормальных фибробластах, так и в опухолевых линиях клеток (*AsPC-1* и *Caco-2*). Белки семейства GADD45, являющиеся сенсорами стрессового воздействия, участвуют в нескольких сигнальных клеточных путях, в том числе апоптозе, репарации ДНК и остановке клеточного цикла [64]. Нарушения в генах *GADD45* часто сопровождаются возникновением и прогрессированием злокачественных опухолей, и GADD45 содействует эффекту многочисленных препаратов для химиотерапии [65]. Например, он показал, что чувствительность клеточных линий аденокарциномы простаты к доцетакселу повысилась за счет увеличения экспрессии *GADD45A*, но недостаточный уровень экспрессии *GADD45* может сделать химиотерапию неэффективной. Помимо этого, активность *GADD45* может также оказывать антивозрастное действие [67, 68].

Еще следует отметить сверхэкспрессию генов *DUSP1-2*, *DUSP4-6* и *DUSP8*. Многие гены семейства DUSP отвечают за супрессию каскада сигнальной трансдукции MAPK, так как являются генами-

супрессорами опухолевого роста, обуславливающими эффективность химиотерапии [69-74].

В процессах генной онтологии раковых клеточных линий *Caco-2* и *AsPC-1* было много сверхэкспрессирующихся генов, отвечающих за апоптоз, межклеточную сигнальную трансдукцию и клеточную реакцию на органическое вещество (табл. 1).

Таким образом, анализ дифференциально экспрессирующихся генов выявил ряд клеточных механизмов, модулируемых Абисилом (Рис. 1-3). Среди них: «Сигнальный путь MAPK», «Сигнальный путь p53», «Апоптоз», «Клеточный цикл», «Неправильная регуляция транскрипции при раке», «Сигнальный путь HIF-1», «Сигнальный путь FOXO», «сигнальный путь TGF», «Сигнальный путь TNF», «Метаболизм аминокислот и нуклеотидов», и «Обработка белка в эндоплазматической сети». Также можно выделить ряд процессов на уровне организма: «Путь регуляции продолжительности жизни», «Сахарный диабет II типа» «Инсулиновая резистентность», и «Инфекционные заболевания» (вирус гриппа типа А, легионеллез). Последний процесс из перечисленных предполагает возможный эффект (трудно обсуждать направление этого эффекта заранее)

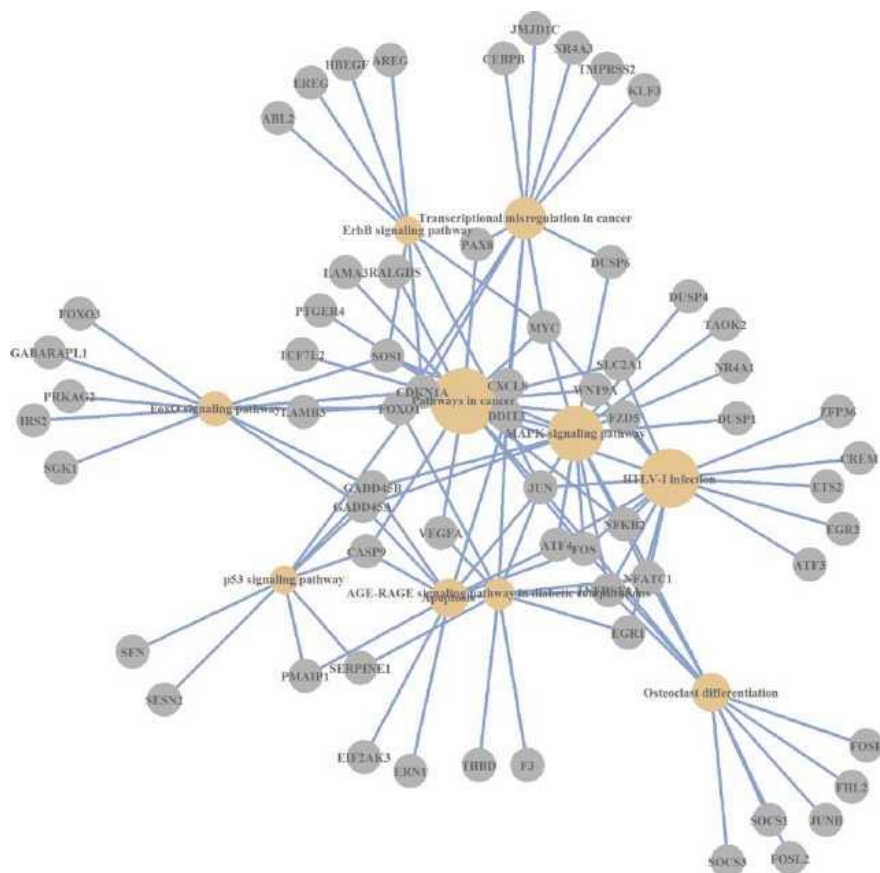


Рис. 2: Метаболические пути базы KEGG, в которых преобладают дифференциально экспрессирующиеся гены (клеточная линия *AsPC-1*).

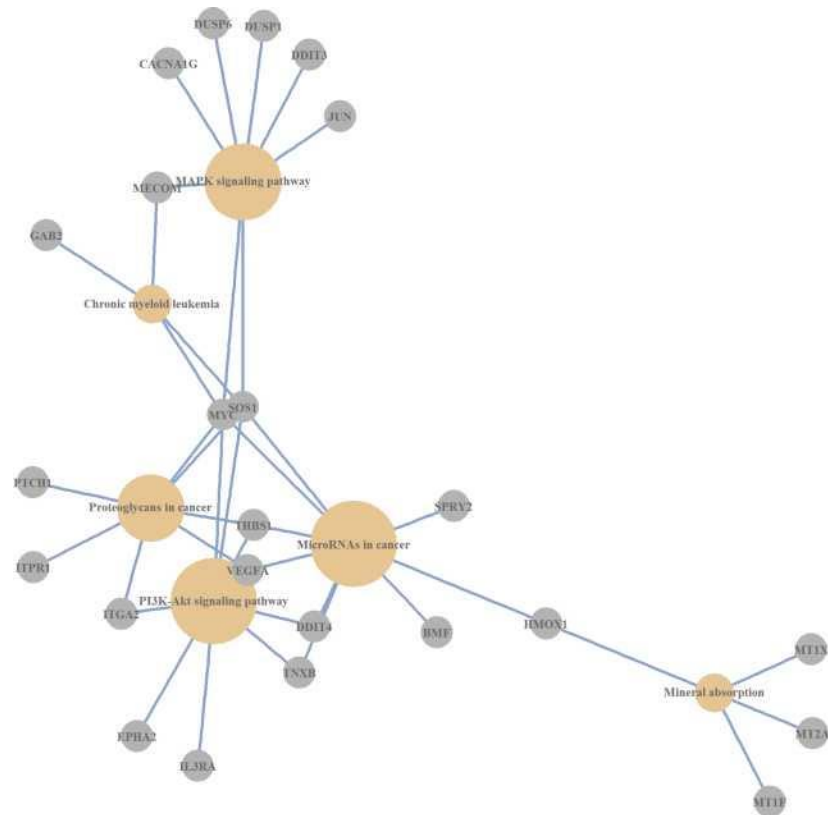


Рис. 3: Метаболические пути базы данных KEGG, в которых преобладают дифференциально экспрессирующиеся гены (клеточная линия *Saso-2*).

Абисила на проникновение и пролиферацию возбудителей инфекции или иммунную реакцию.

В результате введения препарата во все исследуемые клеточные линии изменился уровень экспрессии нескольких тысяч генов. В целом, преобладал эффект увеличения уровня экспрессии генов.

Список таких генов возглавляют сверхэкспрессирующиеся онкосупрессоры (гены семейств GADD45, DUSP и DDIT) и прото-онкогены (гены семейств c-Myc, c-Jun, EGR и другие). Данные показывают, что действие Абисила было связано с модуляцией основных сигнальных путей, отвечающих за контроль клеточного цикла, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз (например, сигнальные пути MAPK, TNF, p53, FOXO и TGF), сигналы клетка-клетка, стресс-ответ, cAMP-зависимый сигнал и рефолдинг белка.

Отдельно заметим увеличение экспрессии всех трех членов семейства генов GADD45, которые могут выступать в качестве онкосупрессоров. Химиотерапевтические препараты, способствующие повышению экспрессии этих генов, - один из факторов, которые определяют эффективность химиотерапии. Другое важное действие - сверхэкспрессия большинства генов семейства DUSP, отвечающих за ингибирование каскада MAPK, который также играет важную роль в ответе на химиотерапию.

Результаты анализа генной онтологии и представленности групп генов позволяют сделать предположение о том, что биологические процессы, обеспечивающие отрицательную регуляцию апоптоза, преобладают над процессами индукции запрограммированной гибели клеток в нормальных фибробластах человека. В клеточных линиях Caco-2 и AsPC-1 ситуация обратная.

Вероятные геропротекторные свойства Абисила могут быть обусловлены индуцированной сверхэкспрессией генов семейства GADD45 и белков шокового тепла HSPA1A/A1B/A9, Hsp40 B1/B4/B9 и HSPH1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Композиция Абисил

Фармацевтическая композиция Абисил® - это комплекс терпеноидов, полученных из капсульного экстракта пихты сибирской семейства Penaceae, обогащенного монотерпеноидами. Химический и количественный состав фармацевтической композиции Абисил был изучен при помощи газо-жидкостной хроматографии с использованием хроматографа LCM-7A (Хроматограф, Россия), детектора теплопроводности, наполненной колонки (длиной 3,0 м, диаметром 5 мм) и неподвижной фазы "Ariezon L" (M&I Materials Limited, Великобритания) на полихrome. Потребление газа-

носителя (гелия) составило 30 мл/мин при температуре колонки 125°C и температуре испарительной камеры 180°C. Основные компоненты определялись относительной продолжительностью удержания и «сторонними» соединениями. Выведенная композиция Абисил - это стандартизированная терпеноидная субстанция, полученная из капсульного экстракта пихты сибирской (*Abies sibirica*). (Табл. 2).

Терпеноидная композиция - это густая жидкость от желто-прозрачного до молочно-белого цвета со специфическим запахом и с определенными физическими константами: кислотным число (70-90 мг), числом омыления (100-130 мг), эфирным числом (10-60 мг) и показателем преломления (1,500-1,520)

Исследование клеточных культур

Клеточная линия аденокарциномы поджелудочной железы человека AsPC-1 (ATCC - CRL-1682) и клеточная линия колоректальной аденокарциномы Caco-2 (ATCC - HTB-37) были предоставлены д-ром Петром Чумаковым (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия). Клетки содержались в минимальной эссенциальной среде, модифицированной по способу Дульбекко (DMEM, Invitrogen, США) с добавлением 10% и 20% эмбриональной бычьей сыворотки (Harlan Sera-Lab, Loughborough, Великобритания) соответственно, 100 ед. пенициллина на 1 мл и 100 мкг стрептомицина на 1 мл (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США). Клетки культивировались при 37°C в 5% углекислой среде и пересеивались каждые 2-3 дня, с применением трипсина для диссоциации клеток (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США).

Первичные фибробласты предоставила лаборатория клеточных культур Института медицинских клеточных технологий (Екатеринбург, Россия). Клетки содержались в среде, описанной выше (с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки). Клетки пассировались, когда культура достигала примерно 80% конfluence. Для сохранения уникальных свойств модели клетки были заморожены в DMEM с 7% диметилсульфоксида (ДМСО) and 30% эмбриональной бычьей сыворотки после 4-го и 10-го пассажей. Изучалось действие в 6-ом и 13-ом пассажах.

Клетки при достижении 70% конfluence в течение 6 часов подвергались воздействию разбавленного раствора Абисила (1.2 мг/мл) в DMEM с 2% эмбриональной телячьей сывороткой. После этого среда культуры заменялась на свежую и через 18 часов жизнеспособность клеток анализировалась при помощи теста MTS (Promega, США).

Все клетки, включая контрольные клеточные линии, высаживали в чашки Петри в 3 повторах. Экстракция РНК для дальнейшего анализа выполнялась сразу после обработки слабым раствором

действующего вещества.

Экстракция РНК и контроль качества

При помощи лабораторного набора RNeasy Mini kit (Qiagen, Германия) суммарная РНК была извлечена из 24 образцов, включающих 4 клеточные линии после обработки (*Saco-2*, *AsPC-1* и первичные фибробласты в 6-ом и 13-ом пассажах) и соответствующие

контрольные клетки (все в 3-х повторях). Качество и количество РНК определялись при помощи биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technologies, США) и флуорометра Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, США) соответственно. Для последующего анализа использовались образцы РНК с числом целостности (RIN) выше 8.0.

Таблица 2: Композиция Абисила

Компонент	Массовая доля	
	Ррт (миллионная доля)	%
Циклические монотерпены	396969,3	16,9
3-карен	150186,4	6,4
Бицикло[2,2,1]гепт-2-ен,2,3-диметил	2099,9	0,1
Циклогексан, 4-метилен-1-(метил этил)-	16793,4	0,7
Бицикло[3,1,0]гекс-2-ен, 2-метил-5(1-метилэтил)-	150186,4	6,4
Камфен	77703,2	3,3
Ациклические монотерпены	248366,8	10,6
Оцимен	52542,8	2,2
Сантолина-триен	195824	8,3
Сложные эфиры и тритерпеновые кислоты	533050	22,7
Ортофосфорная кислота, сложный эфир триборнила	380760,6	16,2
О-трифлуороацетил-изопулегол	136912,8	5,8
Метилабиетат	15376,6	0,7
Сесквитерпены	117968	5,0
Лонгифолен-(V4)	61484,9	2,6
Лонгифолен-12	18411,6	0,8
Пачулен	8553,3	0,4
Гамма-Элемен	6164,8	0,3
Трицикло[5,4,0,0(2,8)]унден-9-ен, 2,6,6,9-тетраметил	7912,0	0,3
Бета-Гумулен	14601,0	0,6
Дигидро-(-)-Неокловен-(11)	840,4	0,0
Сесквитерпенолы:	104287,7	4,4
Агароспирол	28098,4	1,2
Кубенол	2428,0	0,1
Тау-Кадинол	2664,4	0,1
Цис-Анцеол	1613,7	0,1
Гумулан-1,6-диен-3-ол	2369,1	0,1
Альфа-Бисаболол	67114,1	2,9
Дитерпены:	18014	0,7
Карен	1439,9	0,1
Трахилобан	3486,9	0,1

1 Н-Нафто[2,1-б]пиран,3-е	13087,2	0,6
Дитерпенолы:	16651,7	0,7
Тунбергол	16651,7	0,7
Ароматические углеводороды:	2988,1	0,1
9,9'-Бифенантрен	2988,1	0,1
Стероиды и гормоны:	46179,6	2,0
9,9'-Бифенантрен	1228,1	0,1
Ресифуогенин	29023,1	1,2
9(11)-Дегидротестостерон	15928,4	0,7
Спирты:	1149,1	0,005
1-Гептатриакотанол	1149,1	0,005
Циклоалканы:	541610,7	23,0
1,3,5,6-Тетраметиладамтан	541610,7	23,0
Дитерпеновые кислоты:	323609,2	15,4
Палостровая кислота	57733,0	2,5
Абиетиновая кислота	247651,0	10,5
Бета-пимаровая кислота	18225,2	2,5

Подготовка библиотеки РНК и секвенирование

Для подготовки библиотеки мРНК с помощью набора TruSeq RNA Sample Preparation Kit v2 Low Sample (LS) protocol (Illumina, США), применяемого в соответствии с инструкциями изготовителя, использовалась суммарная РНК (2 мкг) из каждого образца. Качество и концентрация библиотеки кДНК оценивались до секвенирования при помощи биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technologies) и флуорометра Qubit 2.0 (Invitrogen) соответственно. Для оптимизации плотностей кластера библиотеки были переведены в количественное выражение методом qPCR. Библиотеки кДНК были секвенированы (односторонние риды, 75 пар оснований) на платформе Illumina NextSeq 500 (в ЦКП «Геном» в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН (Москва, Россия)).

Обработка данных секвенирования РНК и анализ дифференциальной экспрессии

При помощи программ FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) и Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) со стандартными параметрами контролировалось качество необработанных односторонних ридов и осуществлялось их нарезание. Отобранные риды отдельно соотносились с GRCh38 в Ensembl (release 80) с применением программного обеспечения TopHat2 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>). Подсчет

ридов выполнялся с использованием HTSeq-count (<http://www-huber.embl.de/HTSeq/doc/overview.html>).

Дифференциально экспрессирующиеся гены были определены при значении p-value < 0.01 с помощью edgeR, lme4, biomaRt, Rgraphviz, topGO, ggplot2, pathview, и пакета аналитических программ clusterProfiler в R.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны Лаборатории клеточных культур Института медицинских клеточных технологий (Екатеринбург, Россия) и д-ру Петра Чумакова (Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, Россия) за предоставленные клеточные культуры. Авторы благодарят «Инитиум-Фарм» ЛТД за поставки Абисила и анализ данных; Национальный медицинский исследовательский радиологический центр и Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН за экспериментальную модель, научные консультации и полезные предложения. Часть работы по этому исследованию (экстракция РНК и ее количественное определение, подготовка библиотеки мРНК и секвенирование нового поколения) была выполнена в ЦКП «Геном» в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН (Москва, Россия) (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-50-00060)

Вклад авторов:

А.К. и А.М. предложили идею проекта и курировали его. А.М., А.К. и Г.К. разработали план исследования и анализировали данные. А.Л., А.С. и М.Ф. проводили эксперименты. Ф.М. предоставила Абисил и анализировала его состав. А.К., Г.К. и А.М. написали статью. М.С. помогал в подготовке и написании статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang Y, Shen T-T, Liu S-W, Zhao J, Chen W, Wang H. Effect of Hawthorn on *Drosophila Melanogaster* Antioxidant-Related Gene Expression. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 13: 353-7. doi: 10.4314/tjpr.v13i3.6.
2. Wu Z, Smith JV, Paramasivam V, Butko P, Khan I, Cypser JR, Luo Y Ginkgo biloba extract EGb 761 increases stress resistance and extends life span of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2002; 48: 725-31. doi: 10.1016/j.exger.2011.12.001.
3. Peng C, Zuo Y, Kwan KM, Liang Y, Ma KY, Chan HY, Huang Y, Yu H, Chen ZY. Blueberry extract prolongs lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol*. 2012; 47: 170-8. doi: 10.1016/j.exger.2011.12.001.
4. Jafari M, Zarban A, Pham S, Wang T. Rosa damascena decreased mortality in adult *Drosophila*. *J Med Food*. 2008; 11: 9-13. doi: 10.1089/jmf.2007.546.
5. Kim MS. Korean Red Ginseng Tonic Extends Lifespan in *D. melanogaster*. *Biomol Ther (Seoul)*. 2013; 21: 241-5. doi: 10.4062/biomolther.2013.024.
6. Wang L, Li YM, Lei L, Liu Y, Wang X, Ma KY, Chen ZY. Cranberry anthocyanin extract prolongs lifespan of fruit flies. *Exp Gerontol*. 2015; 69: 189-95. doi: 10.1016/j.exger.2015.06.021.
7. Lopez T, Schriener SE, Okoro M, Lu D, Chiang BT, Huey J, Jafari M. Green tea polyphenols extend the lifespan of male *drosophila melanogaster* while impairing reproductive fitness. *J Med Food*. 2014; 17: 1314-21. doi: 10.1089/jmf.2013.0190.
8. Zhuang Z, Lv T, Li M, Zhang Y, Xue T, Yang L, Liu H, Zhang W. The lifespan-extending effects of *Nymphaea* hybrid root extract in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Plant Foods Hum Nutr*. 2014; 69: 304-9. doi: 10.1007/s11130-014-0448-3.
9. Upadhyay A, Chompoo J, Taira N, Fukuta M, Tawata S. Significant longevity-extending effects of *Alpinia zerumbet* leaf extract on the life span of *Caenorhabditis elegans*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77: 217-23. doi: 10.1271/bbb.120351.
10. Ibe S, Kumada K, Yoshida K, Otake K. Natto (fermented soybean) extract extends the adult lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2013; 77: 392-4. doi: 10.1271/bbb.120726.
11. Schriener SE, Abrahamyan A, Avanesian A, Bussel I, Maler S, Gazarian M, Holmbeck MA, Jafari M. Decreased mitochondrial superoxide levels and enhanced protection against paraquat in *Drosophila melanogaster* supplemented with *Rhodiola rosea*. *Free Radic Res*. 2009; 43: 836-43. doi: 10.1080/10715760903089724.
12. Zuo Y, Peng C, Liang Y, Ma KY, Yu H, Edwin Chan HY, Chen ZY Black rice extract extends the lifespan of fruit flies. *Food Funct*. 2012; 3: 1271-9. doi: 10.1039/c2fo30135k.
13. Huang CH, Hsu FY, Wu YH, Zhong L, Tseng MY, Kuo CJ, Hsu AL, Liang SS, Chiou SH. Analysis of lifespan-promoting effect of garlic extract by an integrated metabolo-proteomics approach. *J Nutr Biochem*. 2015; 26: 808-17. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.02.010.
14. Vayndorf EM, Lee SS, Liu RH. Whole apple extracts increase lifespan, healthspan and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Funct Foods*. 2013; 5: 1236-43. doi: 10.1016/j.jff.2013.04.006.
15. Altun D, Ayar A, Uysal H, Kara AA, Unal EL. Extended longevity of *Drosophila melanogaster* by water and ethanol extracts of *Stachys lavandulifolia*. *Pharm Biol*. 2010; 48: 1291-6. doi: 10.3109/13880201003789424.
16. Danilov A, Shaposhnikov M, Plyusnina E, Kogan V, Fedichev P, Moskalev A. Selective anticancer agents suppress aging in *Drosophila*. *Oncotarget*. 2013; 4: 150726. doi: 10.18632/oncotarget.1272.
17. Blagosklonny MV. Selective anti-cancer agents as antiaging drugs. *Cancer Biol Ther*. 2013; 14: 1092-7. doi: 10.4161/cbt.27350.
18. Sacchetti JC, Poulter CD. Creating isoprenoid diversity. *Science*. 1997; 277: 1788-9. doi: 10.1126/science.277.5333.1788.
19. Dewick PM. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat Prod Rep*. 2002; 19: 181-222. doi: 10.1039/B002685I.
20. Thoppil RJ, Bishayee A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World J Hepatol*. 2011; 3: 228-49. doi: 10.4254/wjh.v3.i9.228.
21. Yamada Y, Kuzuyama T, Komatsu M, Shin-Ya K, Omura S, Cane DE, Ikeda H. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112: 857-62. doi: 10.1073/pnas.1422108112.
22. Ishida T. Biotransformation of terpenoids by mammals, microorganisms, and plant-cultured cells. *Chem Biodivers*. 2005; 2: 569-90. doi: 10.1002/cbdv.200590038.
23. Schmidt-Dannert C. Biosynthesis of terpenoid natural

- products in fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2015; 148: 19-61. doi: 10.1007/10_2014_283.
24. Hussain MS, Fareed S, Ansari S, Rahman MA, Ahmad IZ, Saeed M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012; 4: 10-20. doi: 10.4103/0975-7406.92725.
 25. McGarvey DJ, Croteau R. Terpenoid metabolism. *Plant Cell.* 1995; 7: 1015-26. doi: 10.1105/tpc.7.7.1015.
 26. Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep.* 1999; 16: 565-74. doi: 10.1039/A709175C.
 27. Dubey VS, Bhalla R, Luthra R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J Biosci.* 2003; 28: 637-46. doi:
 28. Roberts SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol.* 2007; 3: 387-95. doi: 10.1038/nchembio.2007.8.
 29. Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2015; 148: 63-106. doi: 10.1007/10_2014_295.
 30. Dong Y, Guha S, Sun X, Cao M, Wang X, Zou S. Nutraceutical interventions for promoting healthy aging in invertebrate models. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 718491. doi: 10.1155/2012/718491.
 31. Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100: 72-9. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.011.
 32. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. *Bioorg Med Chem.* 2005; 13: 5892-908. doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.066.
 33. Kumar N, Bhandari P, Singh B, Gupta AP, Kaul VK. Reversed phase-HPLC for rapid determination of polyphenols in flowers of rose species. *J Sep Sci.* 2008; 31: 262-7. doi: 10.1002/jssc.200700372.
 34. Schriener SE, Katozi NS, Pham KQ, Gazarian M, Zarban A, Jafari M. Extension of *Drosophila* lifespan by *Rosa damascena* associated with an increased sensitivity to heat. *Biogerontology.* 2012; 13: 105-17. doi: 10.1007/s10522-011-9357-0.
 35. Cichewicz RH, Kouzi SA. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med Res Rev.* 2004; 24: 90-114. doi: 10.1002/med.10053.
 36. Fulda S. Betulinic Acid for cancer treatment and prevention. *Int J Mol Sci.* 2008; 9: 1096-107. doi: 10.3390/ijms9061096.
 37. Yogeewari P, Sriram D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 657-66. doi:
 38. Lin CC, Huang CY, Mong MC, Chan CY, Yin MC. Antiangiogenic potential of three triterpenic acids in human liver cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2011; 59: 755-62. doi: 10.1021/jf103904b.
 39. Lozano-Mena G, Sanchez-Gonzalez M, Juan ME, Planas JM. Maslinic acid, a natural phytoalexin-type triterpene from olives-a promising nutraceutical? *Molecules.* 2014; 19: 11538-59. doi: 10.3390/molecules190811538.
 40. Xiang L, Chi T, Tang Q, Yang X, Ou M, Chen X, Yu X, Chen J, Ho RJ, Shao J, Jia L. A pentacyclic triterpene natural product, ursolic acid and its prodrug US597 inhibit targets within cell adhesion pathway and prevent cancer metastasis. *Oncotarget.* 2015; 6: 9295-312. doi: 10.18632/oncotarget.3261.
 41. Zhang J, Lu L, Zhou L. Oleanolic acid activates daf-16 to increase lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 468: 843-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.042.
 42. Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem J.* 2009; 418: 475-89. doi: 10.1042/BJ20082234.
 43. Lima CF, Pereira-Wilson C, Rattan SI. Curcumin induces heme oxygenase-1 in normal human skin fibroblasts through redox signaling: relevance for anti-aging intervention. *Mol Nutr Food Res.* 2011; 55: 430-42. doi: 10.1002/mnfr.201000221.
 44. Bansal S, Biswas G, Avadhani NG. Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in macrophages, kidney fibroblasts and in chronic alcohol hepatotoxicity. *Redox Biol.* 2014; 2: 273-83. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.004.
 45. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 2607-10. doi:
 46. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/ carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev.* 2006; 86: 583-650. doi: 10.1152/physrev.00011.2005.
 47. Schulkens IA, Castricum KC, Weijers EM, Koolwijk P, Griffioen AW, Thijssen VL. Expression, regulation and function of human metallothioneins in endothelial cells. *J Vasc Res.* 2014; 51: 231-8. doi: 10.1159/000365550.
 48. Kanda M, Yamanaka H, Kojo S, Usui Y, Honda H, Sotomaru Y, Harada M, Taniguchi M, Suzuki N, Atsumi T, Wada H, Baghdadi M, Seino K. Transcriptional regulator Bhlhe40 works as a cofactor of T-bet in the regulation of IFN-gamma production in iNKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113: E3394-402. doi: 10.1073/pnas.1604178113.
 49. Fensterl V, Wetzel JL, Sen GC. Interferon-induced protein Ifit2 protects mice from infection of the peripheral nervous system by vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 2014; 88: 10303-11. doi: 10.1128/JVI.01341-14.
 50. Mehic D, Bakiri L, Ghannadan M, Wagner EF, Tschachler E. Fos and jun proteins are specifically expressed during differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2005; 124: 212-20. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23558.x.
 51. Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature.* 2013; 495: 524-8. doi:

- 10.1038/nature11930.
52. Iwamoto S, Boonvisut S, Makishima S, Ishizuka Y, Watanabe K, Nakayama K. The role of TRIB1 in lipid metabolism; from genetics to pathways. *Biochem Soc Trans.* 2015; 43: 1063-8. doi: 10.1042/BST20150094.
 53. Fang F, Shangquan AJ, Kelly K, Wei J, Gruner K, Ye B, Wang W, Bhattacharyya S, Hinchcliff ME, Tourtellotte WG, Varga J. Early growth response 3 (Egr-3) is induced by transforming growth factor-beta and regulates fibrogenic responses. *Am J Pathol.* 2013; 183: 1197-208. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.016.
 54. Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science.* 2001; 293: 1829-32. doi: 10.1126/science.1062257.
 55. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010; 339: 269-80. doi: 10.1007/s00441-009-0834-6.
 56. Williams SJ, Wreschner DH, Tran M, Eyre HJ, Sutherland GR, McGuckin MA. Muc13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 18327-36. doi: 10.1074/jbc.M008850200.
 57. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Pokrovsky AV, Melnikova NV, Kaprin AD, Moskalev AA, Snezhkina AV. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.9821.
 58. Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA, Denny AD, Busuttill RA, Dolle ME, Calder RB, Chisholm GB, Pollock BH, Klein CA, Vijg J. Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature.* 2006; 441: 1011-4. doi: 10.1038/nature04844.
 59. Busuttill R, Bahar R, Vijg J. Genome dynamics and transcriptional deregulation in aging. *Neuroscience.* 2007; 145: 1341-7. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.09.060.
 60. Tirone F. The gene PC3(TIS21/BTG2), prototype member of the PC3/BTG/TOB family: regulator in control of cell growth, differentiation, and DNA repair? *J Cell Physiol.* 2001; 187: 155-65. doi: 10.1002/jcp.1062.
 61. Zhavoronkov A, Buzdin AA, Garazha AV, Borisov NM, Moskalev AA. Signaling pathway cloud regulation for in silico screening and ranking of the potential geroprotective drugs. *Front Genet.* 2014; 5: 49. doi: 10.3389/fgene.2014.00049.
 62. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 2015; 65: 87-108. doi: 10.3322/caac.21262.
 63. Kudryavtseva AV, Lipatova AV, Zaretsky AR, Moskalev AA, Fedorova MS, Rasskazova AS, Shibukhova GA, Snezhkina AV, Kaprin AD, Alekseev BY, Dmitriev AA, Krasnov GS. Important molecular genetic markers of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.9796.
 64. Moskalev A, Plyusnina E, Shaposhnikov M, Shilova L, Kazachenok A, Zhavoronkov A. The role of *D-GADD45* in oxidative, thermal and genotoxic stress resistance. *Cell Cycle.* 2012; 11: 4222-41. doi: 10.4161/cc.22545.
 65. Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB, Zerbini LF. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med.* 2012; 12: 634-51. doi: 10.2174/156652412800619978.
 66. Ramachandran K, Gopisetty G, Gordian E, Navarro L, Hader C, Reis IM, Schulz WA, Singal R. Methylation-mediated repression of GADD45alpha in prostate cancer and its role as a potential therapeutic target. *Cancer Res.* 2009; 69: 1527-35. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3609.
 67. Moskalev AA, Smit-McBride Z, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Tacutu R, Fraifeld VE. Gadd45 proteins: relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Research Reviews.* 2012; 11: 51-66. doi: 10.1016/j.arr.2011.09.003.
 68. Plyusnina EN, Shaposhnikov MV, Moskalev AA. Increase of *Drosophila melanogaster* lifespan due to *D-GADD45* overexpression in the nervous system. *Biogerontology.* 2011; 12: 211-26. doi: 10.1007/s10522-010-9311-6.
 69. Lawan A, Al-Harhi S, Cadalbert L, McCluskey AG, Shweash M, Grassia G, Grant A, Boyd M, Currie S, Plevin R. Deletion of the dual specific phosphatase-4 (DUSP-4) gene reveals an essential non-redundant role for MAP kinase phosphatase-2 (MKP-2) in proliferation and cell survival. *J Biol Chem.* 2011; 286: 12933-43. doi: 10.1074/jbc.M110.181370.
 70. Domercq M, Alberdi E, Sanchez-Gomez MV, Ariz U, Perez-Samartin A, Matute C. Dual-specific phosphatase-6 (Dusp6) and ERK mediate AMPA receptor-induced oligodendrocyte death. *J Biol Chem.* 2011; 286: 11825-36. doi: 10.1074/jbc.M110.153049.
 71. Haag T, Richter AM, Schneider MB, Jimenez AP, Dammann RH. The dual specificity phosphatase 2 gene is hypermethylated in human cancer and regulated by epigenetic mechanisms. *BMC Cancer.* 2016; 16: 49. doi: 10.1186/s12885-016-2087-6.
 72. Karakashev SV, Reginato MJ. Hypoxia/HIF1alpha induces lapatinib resistance in ERBB2-positive breast cancer cells via regulation of DUSP2. *Oncotarget.* 2015; 6: 1967-80. doi: 10.18632/oncotarget.2806.
 73. Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene.* 2003; 22: 5586-91. doi: 10.1038/sj.onc.1206845.
 74. Ma J, Yu X, Guo L, Lu SH. DUSP6, a tumor suppressor, is involved in differentiation and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2013; 6: 1624-30. doi: 10.3892/ol.2013.1605.