

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ АЛКАЛОИДА ТРИПТАНТРИНА, РОЗМАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ДОКСОРУБИЦИНА НА РЕДОКС-СТАТУС ОПУХОЛЕВЫХ И ИММУННЫХ КЛЕТОК

© 2017 г. А.А. Климович*, А.М. Попов* **, О.Н. Кривошапка*,
Ю.П. Штода*, А.В. Цыбульский**

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, пр. 100-лет Владивостоку, 15

**Дальневосточный федеральный университет, 690000, Владивосток, ул. Октябрьская, 27

E-mail: anka_zaraza13@mail.ru

Поступила в редакцию 17.12.15 г.

После доработки 25.10.16 г.

Проведено сравнительное исследование влияния разных по спектру биологической активности и механизму действия природных соединений – хинозалинового алкалоида триптантрина, фенолпропаноида розмариновой кислоты и известного противоопухолевого агента доксорубицина – на динамику изменения редокс-статуса опухолевых и иммунных клеток путем измерения внутриклеточного содержания активных форм кислорода в зависимости от дозы и времени инкубирования. Исследование проведено на культурах опухолевых клеток аденокарциномы Эрлиха и спленоцитов с помощью селективного флуоресцентного индикатора 2',7'-дихлорфлуоресцеина диацетата. Показано, что розмариновая кислота при действии на опухолевые клетки в низкой дозе (1 мкг/мл) обладает ярко выраженной антиоксидантной, а в высокой дозе (10 мкг/мл) – прооксидантной активностью. В культуре спленоцитов под воздействием как низкой, так и высокой дозы розмариновой кислоты наблюдается уменьшение уровня активных форм кислорода. При совместном применении низкой дозы розмариновой кислоты с доксорубицином наблюдается заметное снижение прооксидантного эффекта доксорубицина, проявляющего свойства сильного индуктора активных форм кислорода в опухолевых клетках. Триптантрин также выступает как эффективный индуктор образования активных форм кислорода в отношении как опухолевых, так и иммунных клеток, превосходя доксорубицин по прооксидантной активности. При совместном применении триптантрин усиливает продукцию активных форм кислорода, индуцированную доксорубицином в опухолевых клетках. Однако, в отличие от доксорубицина, действие триптантрина является кратковременным и ослабевает при длительной инкубации. Обсуждается влияние активных форм кислорода на возможные механизмы биологической активности исследуемых веществ при действии их по отдельности и в сочетании друг с другом.

Ключевые слова: триптантрин, розмариновая кислота, доксорубицин, активные формы кислорода, воспаление, противоопухолевая активность.

При нормальных условиях активные формы кислорода (АФК) в оптимальных концентрациях принимают участие в клеточной сигнализации, регулируя целый ряд ключевых внутриклеточных процессов. Вследствие редокс-дисбаланса, возникающего при различных клеточных патологиях, АФК могут оказывать не только цитотоксическое действие, но и опосредовать общие адаптационные реакции клетки на «оксидативный стресс», за счет регуляции клеточ-

ного редокс-зависимого сигналинга [1,2]. При этом среди АФК перекись водорода (H_2O_2) рассматривается в качестве основной сигнальной молекулы, выступающей в роли вторичного посредника во множестве регуляторных процессов, действие которой направлено на модификацию редокс-чувствительных компонентов внутриклеточных сигнальных путей (протеинфосфатаз, протеинкиназ, некоторых транскрипционных факторов). Вмешательство про- и антиоксидантов приводит к изменению редокс-регуляции функционирования этих белков, процессов сигнальной трансдукции, контроля экспрессии генов, что впоследствии оказывает

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ДХФДА – 2',7'-дихлорфлуоресцеин-диацетат.

влияние на клеточную пролиферацию, дифференцировку, состояние клеточного метаболизма и жизнедеятельности клетки в целом [1–3].

Анализ путей фармакологического регулирования антиоксидантных, противовоспалительных и противоопухолевых механизмов защиты организма показывает, что некоторые природные соединения, имеющие существенные различия в химической структуре, проявляют высокое, но часто разнонаправленное действие на внутриклеточные редокс-процессы. К такому роду соединений в разной степени можно отнести: хинозалиновый алкалоид триптантрин (рис. 1а), фенолпропаноид розмариновую кислоту (рис. 1б) и антрациклиновый антибиотик доксорубицин (рис. 1в).

Триптантрин был выделен из ряда растений, дрожжеподобных грибов, морских бактерий, а также найден в составе микробиомы кожи человека и рассматривается как потенциальное универсальное противовоспалительное средство для лечения различных кожных патологий [4]. В настоящее время отлажены схемы органического синтеза этого соединения [5].

Розмариновая кислота, так же как триптантрин, распространена во многих видах высших растений и способна влиять на широкий спектр медико-биологических активностей, оказывая выраженное коррегирующее действие на развитие различных патологий, связанных с воспалением [6]. Следует отметить, что по антиоксидантному потенциалу триптантрин уступает розмариновой кислоте более чем в 5000 раз [7].

Что касается доксорубина, то в основе ярко выраженного противоопухолевого действия этого антрациклинового антибиотика, помимо прямой генотоксической активности, лежит стимулирующий эффект на образование клетками АФК, которые усиливают не только терапевтическую активность, но и побочное действие данного препарата [8].

Можно предположить, что в биологической активности розмариновой кислоты, триптантрина и доксорубина важную роль играет их способность с разной степенью эффективности изменять редокс-состояние клеточных систем [2–8].

Различные редокс-активные соединения, проявляющие главным образом противовоспалительную и противоопухолевую активности, могут прямо или опосредованно способствовать импульсному снижению или повышению уровня внутриклеточных АФК, что на клеточном уровне вносит существенный вклад в их лечебное действие. По этой причине как антиоксиданты, защищающие клетку от окислительного стресса, так и прооксиданты способны поддерживать нормальный клеточный метаболизм, так как

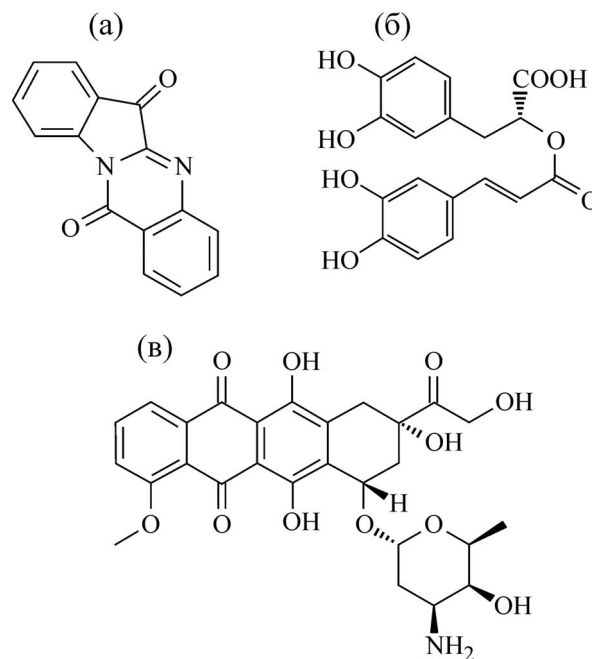


Рис. 1. Химические структуры исследуемых веществ: (а) – триптантрин, (б) – розмариновая кислота, (в) – доксорубицин.

индукция образования клетками оптимального количества АФК через стимуляцию сигнальных путей, запускающих адаптационно-приспособительные ответы антиоксидантной системы защиты клеток, оказывает позитивное влияние на внутриклеточные защитные механизмы. Способность различных соединений и лекарственных препаратов влиять на редокс-статус клеток вносит существенный вклад в их лечебное действие [1,2,7]. Поэтому выяснение роли АФК в биологической активности и молекулярных механизмах действия природных редокс-активных соединений является чрезвычайно актуальной задачей.

По этой причине нам представилось интересным провести сравнительное исследование особенностей действия на редокс-баланс различных клеточных систем (опухолевые и иммунокомпетентные клетки) триптантрина, розмариновой кислоты и доксорубина в зависимости от дозы и времени их экспозиции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали розмариновую кислоту (Sigma, США), доксорубин-Тева (Pharmachemie, Нидерланды), 2',7'-дихлорфлуоресцеин-диацетат (ДХФ-ДА) (Sigma, США), диметилсульфоксид («Химмед», Россия). Триптантрин получен путем органического синтеза на

опытном производстве ТИБОХ ДВО РАН согласно методике, описанной в работе [5].

Влияние трипантрина, розмариновой кислоты и доксорубина на содержание и кинетику внутриклеточных АФК оценивали *in vitro* по уровню флуоресценции внутриклеточного флуоресцентного зонда ДХФ-ДА, используя в качестве тест-систем первичные культуры опухолевых клеток аденокарциномы Эрлиха и спленоцитов, полученных из белых мышей линии CD-1. ДХФ-ДА проявляет селективную чувствительность к H_2O_2 и супероксиданиону O_2^- , окисляясь в их присутствии внутри клетки, приобретает флуоресцентные свойства [9].

Инкубацию клеточных культур проводили в черных 96-луночных планшетах (Greiner, США). Клетки вносили в объеме 0,2 мл на лунку в полной питательной среде № 199.

При изучении влияния трипантрина, розмариновой кислоты и доксорубина на кинетику АФК в опухолевых клетках все препараты использовали в концентрациях 1 и 10 мкг/мл. Инкубацию клеток аденокарциномы Эрлиха в количестве $20 \cdot 10^3$ клеток на лунку с вышеуказанными препаратами проводили в течение 1, 3 и 6 ч в термостате, а в течение 24 ч – в CO_2 -инкубаторе при 37°C .

В последующих сериях экспериментов доксорубин использовали в дозе 10 мкг/мл в качестве индуктора АФК в первичных клеточных культурах аденокарциномы Эрлиха и спленоцитов. Плотность клеточной культуры спленоцитов составляла $10 \cdot 10^3$, а аденокарциномы Эрлиха – $20 \cdot 10^3$ клеток на лунку. Трипантрин и розмариновую кислоту использовали как самостоятельно, так и в сочетании с доксорубином в концентрациях 1 и 10 мкг/мл и инкубировали в термостате в течение 3 ч при 37°C .

По окончании инкубации в каждую лунку вносили раствор ДХФ-ДА, растворенного в диметилсульфоксиде. Конечная концентрация красителя в инкубационной среде составляла 10 мкМ. Нагрузку клеточных культур красителем проводили при постоянном встряхивании в закрытом термощейкере ST-3L (ELMI, Латвия) в течение 30 мин при 37°C . Измерение флуоресцентной активности проб проводили на планшетном ридере Fluoroscan Ascent FL (Lab-systems, США) при длине волны экстинкции 485 нм и эмиссии – 538 нм.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 11/0 с определением критерия достоверности Фишера–Стьюдента. Различия между средними считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В последнее время становится очевидным, что роль АФК, в особенности H_2O_2 , в регулировании клеточных процессов шире, чем предполагалось ранее, что главным образом определяется участием H_2O_2 в клеточной сигнализации [1,8]. Поэтому измерение динамики изменения внутриклеточных АФК под действием редокс-активных соединений позволяет расширить наши представления о роли АФК в биологической активности и механизмах действия этих соединений.

Для оценки влияния трипантрина, розмариновой кислоты и доксорубина на параметры АФК опухолевых и иммунокомпетентных клеток был использован флуоресцентный зонд ДХФ-ДА, который легко проникает внутрь клетки и дезацетилируется при участии внутриклеточных эстераз, превращаясь в нефлуоресцирующий ДХФН. Этот индикатор окисляется преимущественно перекисью водорода, образуя интенсивно флуоресцирующий в инфракрасном диапазоне 2',7'-дихлорфлуоресцеин, что позволяет оценить динамику внутриклеточных АФК, главным образом, H_2O_2 [9].

Результаты исследования кинетики изменения уровня АФК показали (рис. 2), что из трех изученных соединений, именно трипантрин и доксорубин оказались самыми сильными индукторами образования АФК. В пробах, обработанных высокой дозой доксорубина (10 мкг/мл), уровень АФК после одночасовой инкубации увеличивался в два раза, а после 3 и 6 ч – в полтора раза по сравнению с контрольными клетками. Характерно, что действие этого антроциклинового антибиотика сохранялось даже после 24 ч инкубации.

Подобный эффект наблюдали и в пробах, обработанных трипантрином. Применение высокой дозы трипантрина (10 мкг/мл) в течение 1, 3 и 6 ч увеличивало уровень АФК примерно в два раза по сравнению с контролем. Прооксидантное действие этого алкалоида после 6 ч инкубации было в полтора раза выше, чем у доксорубина при той же временной экспозиции. Однако после 24 ч действие трипантрина ослаблялось. Следует отметить, что трипантрин в низкой дозе (1 мкг/мл) не оказывает заметного влияния на уровень АФК. Интересно, что дозы трипантрина, вызывающие апоптоз различных линий опухолевых клеток, находятся в области концентраций более высоких, чем 1 мкг/мл. Следовательно, можно предположить, что апототический механизм гибели опухолевых клеток под действием этого хиназолинового алкалоида развивается параллельно с ростом внутриклеточных АФК [10].

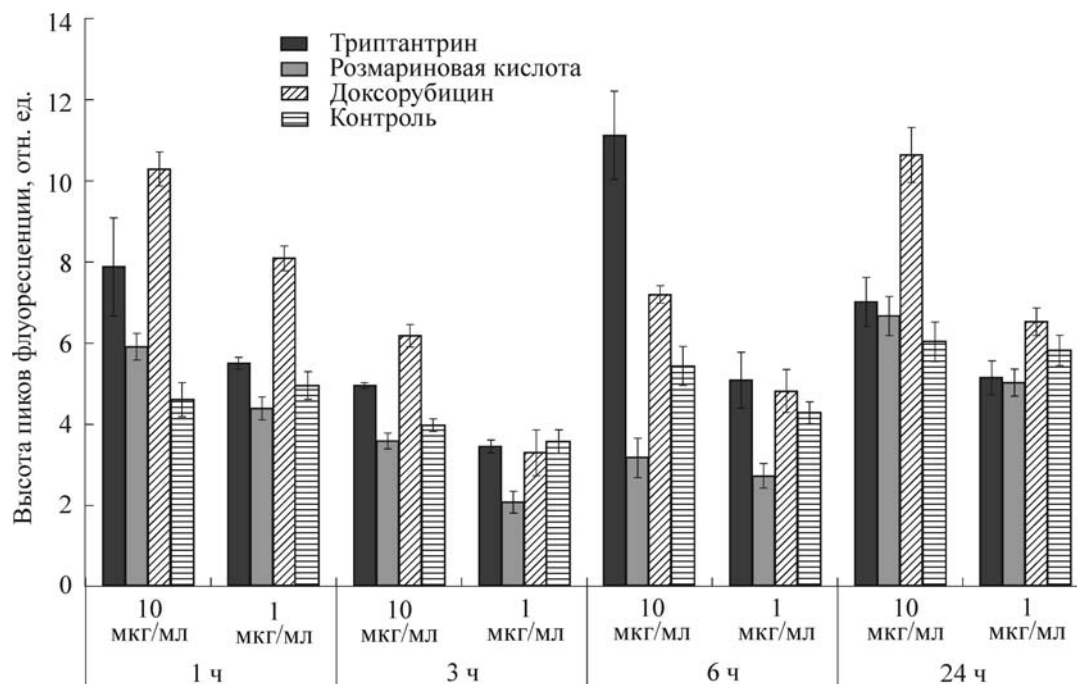


Рис. 2. Влияние триптантрина, розмариновой кислоты и доксорубина на кинетику АФК в клеточной культуре аденокарциномы Эрлиха. Содержание внутриклеточного АФК определяли путем измерения уровня флуоресценции ДХФ-ДА через 1, 3, 6 и 24 ч инкубации клеток с исследуемыми препаратами в дозах 1 и 10 мкг/мл. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции ДХФ-ДА.

Розмариновая кислота, в отличие от триптантрина и доксорубина, проявляет заметную антиоксидантную активность, которая зависит как от используемой дозы, так и от времени инкубирования. Так, розмариновая кислота в дозе 1 мкг/мл, после 3 и 6 ч инкубации, снижает уровень АФК приблизительно в полтора раза по сравнению с контролем, а после 1 и 24 ч инкубации степень различия контрольных и опытных проб уменьшается. Интересно, что в дозе 10 мкг/мл розмариновая кислота практически не оказывает значимого влияния на образование внутриклеточного АФК во всех исследованных временных диапазонах. Следует отметить, что в характере действия розмариновой кислоты на уровень АФК в клеточных культурах нет ничего необычного, поскольку этот фенолпропаноид известен своей прямой высокой антиоксидантной активностью [3,6].

Из литературы известно [8,11], что прооксидантное действие доксорубина связано с наличием хинонового фрагмента в химической структуре его молекулы. Как показано на рис. 3, доксорубин в клетках восстанавливается рядом флавопротеинов – НАДФН-оксидазой, Р-450-редуктазой, НАДФН-дегидрогеназой, ксантиоксидазой – в нестабильные семихиноны, которые быстро реагируют с кислородом, образуя супероксидные радикалы. Последние способны превращаться в H_2O_2 и гидроксильные

радикалы, образование которых резко ускоряется в присутствии ионов Fe^{3+} .

Кроме этого, действие доксорубина способствует повышению активности клеточных мембранных НАДФН-оксидаз (а именно НАДФН-оксидазы 4, которая является основным источником H_2O_2). В результате активации НАДФН-оксидазы 4 наблюдается резкое усиление продукции супероксид-аниона, который в присутствии супероксиддисмутазы быстро переходит в H_2O_2 .

АФК выполняют также важную роль и в защите организма при онкологических процессах, поэтому индуцируемый доксорубином окислительный стресс вносит существенный вклад в его противоопухолевое действие. АФК при этом действуют как прямые цитотоксические агенты, а также являются индукторами апоптоза в клетке, повышая активность редокс-чувствительных систем регуляции апоптотического сигналинга [2,8,12].

В следующей серии экспериментов мы использовали доксорубин в качестве индуктора АФК в относительно высокой дозе (10 мкг/мл), поскольку было показано, что именно в данной дозе этот противоопухолевый антибиотик обладает сильной прооксидантной активностью в отношении опухолевых клеток. При этом розмариновую кислоту и триптантрин вводили в инкубационную среду как с опухолевыми,

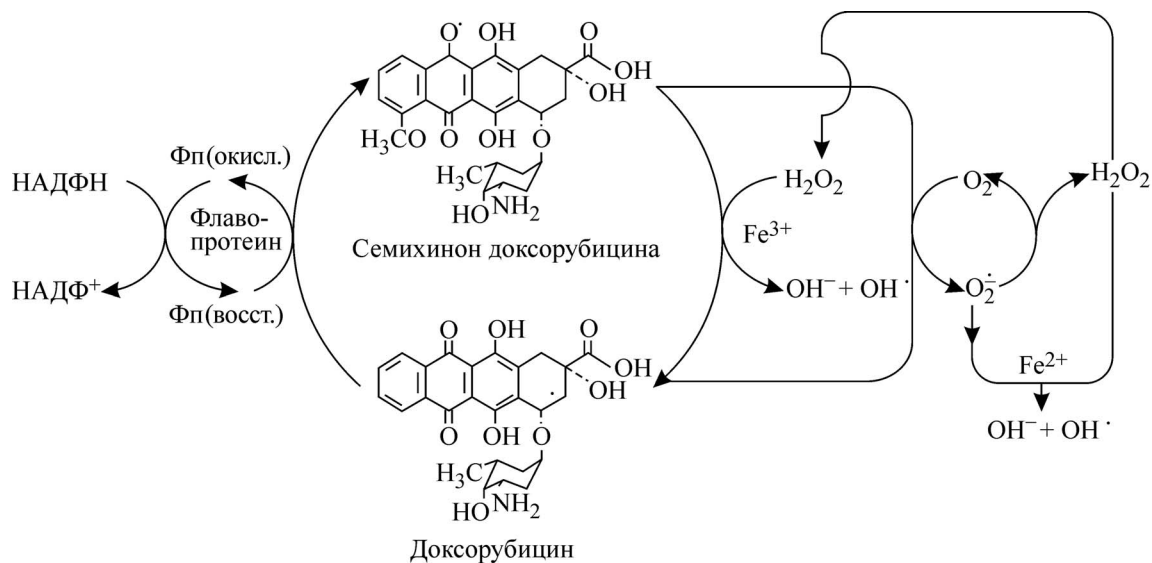


Рис. 3. Схема образования семихиной формы доксорубина и ее участие в образовании АФК.

так и иммунными клетками отдельно и в сочетании с доксорубицином.

Как видно из данных, представленных на рис. 4, под действием доксорубина интенсивность образования АФК в опухолевых клетках повышалась в два раза по сравнению с контролем. Однако интересен тот факт, что при тех же условиях данный препарат не оказывает значимого влияния на редок-статус иммунных клеток. Зарегистрированная нами особенность действия доксорубина на иммунокомпетентные клетки может быть связано с тем, что, несмотря на невысокую селективность антрациклиновых препаратов, они более токсичны в отношении быстро делящихся клеток (стволовые клетки кроветворной системы, клетки слизистой желудка и кишечника, опухолевые клетки), что, вероятно, обусловлено более высокой скоростью синтеза ДНК и РНК в этих клетках, а также повышенной проницаемостью клеточных мембран для метаболитов по сравнению с покоящимися и нормальными клетками [13].

Важным представляется то, что триптантрин оказался более сильным индуктором АФК, чем доксорубин, значительно увеличивая уровень АФК в клеточных культурах иммунных и опухолевых клеток по сравнению с контролем. Особенно хорошо эти различия видны при дозе триптантрина 1 мкг/мл. Характерно, что в сочетании с доксорубицином триптантрин усиливал прооксидантное действие этого противоопухолевого препарата в отношении опухолевых клеток в дозе 10 мкг/мл в два раза, а в дозе 1 мкг/мл – в полтора раза. Следует отметить, что при работе с клеточной культу-

рой спленцитов при совместном введении в инкубационную среду с доксорубицином во всех исследуемых дозах триптантрин не оказывал заметного действия на уровень АФК.

Известно [14], что триптантрин показывает две обратимые волны с катодных и анодных пиков, отличающиеся приблизительно на 60 мВ, что указывает на существование двух одноэлектронных переносов. Меньший отрицательный потенциал ($-0,75$ В) охватывает перенос электронов карбонильного кислорода на более напряженное пятичленное кольцо, в то время как более отрицательный потенциал ($-1,40$ В) охватывает перенос электронов на менее напряженное шестичленное кольцо. На рис. 5 показана способность триптантрина транспортировать электроны благодаря тому, что триптантрин имеет потенциал фотоэлектронных фоторецепторов. При этом молекула триптантрина приобретает свободнорадикальную форму, обладающую высокой реакционной способностью, что позволяет ему принимать непосредственное участие в окислительно-восстановительных процессах. При этом электронно-акцепторная способность карбонильных атомов имеет решающее значение для биологической активности триптантрина.

В связи со сказанным выше можно заключить, что отмеченное нами выраженное прооксидантное действие триптантрина связано, очевидно, с необычными электронно-акцепторными свойствами, зарегистрированными ранее у этого алкалоида.

Как видно из данных, отраженных на рис. 4, розмариновая кислота в низкой дозе в полтора раза снижала уровень АФК по сравнению с

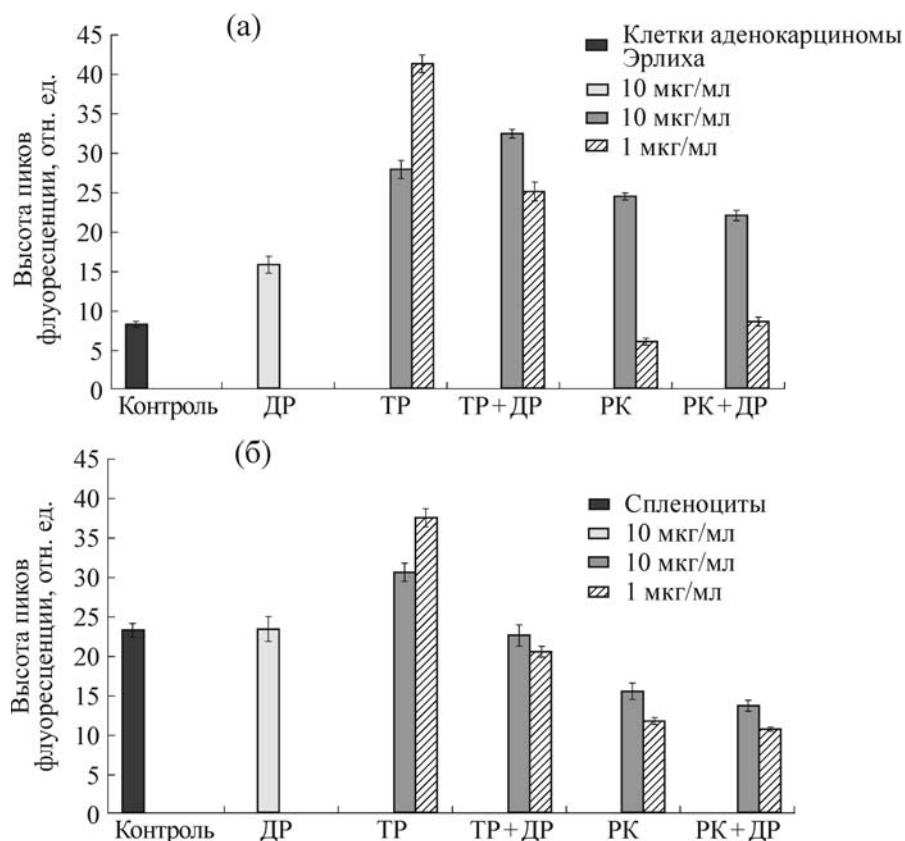


Рис. 4. Оценка влияния триптантрина (ТР), розмариновой кислоты (РК) на уровень АФК, отдельно и в сочетании с доксорубицином (ДР) в первичных культурах опухолевых клетках аденокарциномы Эрлиха (а) и спленоцитов (б) по уровню флуоресценции ДХФ-ДА после 3 ч инкубации. Триптантрин и розмариновую кислоту использовали в дозах 1 и 10 мкг/мл, доксорубицин – в дозе 10 мкг/мл. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции ДХФ-ДА.

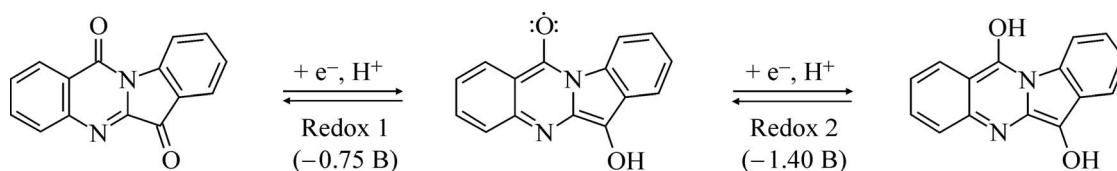


Рис. 5. Электронно-акцепторные свойства триптантрина.

контролем, доводя уровень АФК до нормальных значений. В высокой дозе, напротив, розмариновая кислота выступает как сильный индуктор генерации АФК в опухолевых клетках как при самостоятельном введении, так и в сочетании с доксорубицином, увеличивая в полтора раза содержание АФК по сравнению с контролем. Следует отметить, что низкая доза розмариновой кислоты в сочетании с доксорубицином уменьшает доксорубицин-индуцированное образование АФК опухолевыми клетками примерно в два раза. Интересно то, что при действии самостоятельно и в сочетании с доксорубицином на клеточную культуру спле-

ноцитов розмариновая кислота в дозе 1 мкг/мл подавляла выработку АФК приблизительно в два раза, а в дозе 10 мкг/мл – в полтора раза по сравнению с контролем.

Полученные результаты хорошо согласуются с отмеченными ранее антиоксидантными свойствами розмариновой кислоты, которые регистрируются в низких дозах. Способность этого фенолпропаноида оказывать антиоксидантное действие, очевидно, обусловлена его проникновением через липидный бислой мембраны с последующим взаимодействием с внутриклеточными гидроксильным и пероксильными радикалами, путем прямого захвата внутрикле-

точных АФК. Присутствие ОН-групп в структуре розмариновой кислоты дает ей возможность отдавать электрон (или атом водорода), что приводит к образованию радикальных фенолов – феноксилов, которые, как известно, достаточно стабильны и в дальнейшем продолжении цепной реакции не участвуют, прерывая, таким образом, распространение радикального окислительного процесса [12–14].

Хорошо известно, что эффективность многих противовоспалительных веществ, включая биофлавоноиды и другие полифенольные ароматические соединения, в число которых входит и розмариновая кислота, тесно связана с антиоксидантной активностью из-за свойственного этим веществам выраженного нейтрализующего действия на внутриклеточные АФК, что позволяет им корректировать функциональную активность биохимических путей, регулирующих воспалительные процессы [3,15–17].

Многими исследователями отмечено, что АФК накапливаются при воспалительных процессах, оказывая прямое цитотоксическое действие как на чужеродные, так и на собственные клетки организма, а также обладают способностью усиливать активность иммунокомпетентных клеток, например фагоцитов. Кроме того, АФК принимают непосредственное участие в активации транскрипционных факторов, например, NF- κ B, который ответственен за индукцию про- и противовоспалительных медиаторов, цитокинов и других регуляторных молекул, модулирующих различные иммунные и воспалительные реакции [1,2].

Тем не менее высокая противовоспалительная активность вещества не всегда находится в прямой зависимости от степени выраженности его антиоксидантных свойств. Результаты экспериментов, представленные в данной работе, подтверждают полученные нами ранее данные об отсутствии у триптантрина антиоксидантной активности. Однако недавно было показано, что при развитии различных воспалительных патологических процессов в организме экспериментальных животных триптантрин эффективно ингибирует синтез различных цитокинов [4]. Цитокины выполняют важную роль лигандов толл-подобных рецепторов, и при их взаимодействии происходит резкое изменение функциональной активности клеток. Предполагается [7,18], что одна из основных молекулярных мишеней триптантрина – это сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции, факторы транскрипции, принимающие непосредственное участие в передаче сигнала от толл-подобных рецепторов в ядро клетки.

Повышение концентрации АФК, индуцированное триптантрином, может способствовать

запуску адапционно-приспособительных внутриклеточных процессов, направленных на «обезвреживание» избыточного уровня АФК. Этим, вероятно, можно объяснить относительно кратковременное прооксидантное действие триптантрина. Хорошо известно, что индуцируемый прооксидантами редокс-стресс повышает активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты клетки, а также изменяет активность транскрипционного фактора Nrf2. Этот фактор является ключевым регулятором сигнального пути, усиливающего экспрессию генов, продукты которых участвуют в защите клеток, главным образом, от негативного действия окислительного стресса и ксенобиотиков [2,19–23].

Таким образом, можно предположить, что отмеченная для триптантрина способность проявлять высокую противовоспалительную и другие биологические активности во многом связаны со стимуляцией в клетках адапционно-приспособительных механизмов в ответ на его прооксидантное действие, а также со специфическим блокированием работы толл-подобных рецепторов, сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции в клетках, принимающих участие в активации и развитии воспалительных процессов. Напротив, розмариновая кислота в низких дозах проявляет выраженную, прямую антиоксидантную активность, которая, возможно, лежит в основе различных биологических эффектов, отмеченных для этого соединения. Ярко выраженная радикалперехватывающая активность розмариновой кислоты может быть использована в качестве дополнительного средства коррекции патологических состояний на фоне усиленного свободно-радикального окисления. Подтверждается тот факт, что продукция АФК, индуцированная доксорубицином в опухолевых клетках, является важным дополнением к основному генотоксическому механизму его противоопухолевого действия. Однако не стоит забывать, что окислительный стресс, вызываемый доксорубицином, опосредует множественные побочные эффекты этого препарата, а также способствует запуску адапционных клеточных механизмов, что часто коррелирует с лекарственной устойчивостью опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам. Поэтому совместное применение доксорубицина с розмариновой кислотой или другими полифенольными соединениями может снизить нежелательные побочные эффекты доксорубицина при проведении противоопухолевой терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. D. Dunn, L. A. Alvarezb, X. Zhanga, and T. Soldatia, J. Redox Biol. 6, 472 (2015).

2. Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов и М. Д. Новичкова, *Успехи биол. химии* **54**, 299 (2014).
3. А. М. Попов, О. Н. Кривошапко, А. Н. Осипов и Е. А. Корепапова, *Вопросы питания*, № **3**, 25 (2014).
4. А. М. Попов, О. Н. Кривошапко, А. В. Цыбульский и др., *Биофармацевтич. журн.* **7** (3), 24 (2015).
5. Т. В. Московкина, М. В. Денисенко, А. И. Калиновский и В. А. Стоник, *Журн. орган. химии* **49** (12), 1760 (2013).
6. А. М. Попов, А. Н. Осипов, Е. А. Корепапова, et al., *Biophysics* **58** (5), 607 (2013).
7. А. М. Попов, А. Н. Осипов, Е. А. Корепапова, et al., *Biophysics* **60** (4), 574 (2015).
8. Ю. В. Саенко и А. М. Шутов, *Эксперим. клин. фарм.* **70** (3), 29 (2007).
9. C. Loetchutinat, S. Kothan, S. Dechsupa, et al., *J. Rad. Phys. Chem.* **72** (2), 323 (2005).
10. J. Antony, M. Saikia, V. Vinod, et al., *J. Sci. Reports* **5**, (2015)
11. Z. Wang, J. Wang, R. Xie., et al., *Int. J. Mol. Sci.* **16** (5), 11087 (2015).
12. Y. Zhao, D. McLaughlin, E. Robinson, et al., *Amer. Assoc. Cancer Res.* **70**, 9287 (2010).
13. T. Healthcare, *Physicians' Desk Reference Guide to Drug Interactions, Side Effects, and Indications* (Medical Economics, 2002).
14. A. Y. Jahng, *Pharm. Res.* **36** (5), 517 (2013).
15. А. М. Попов, О. Н. Кривошапко и А. А. Артюхов, *Биофармацевтич. журн.* **4** (4), 27 (2012)
16. Ю. С. Тараховский., Ю. А. Ким, Б. С. Абдрашилов и Е. Н. Музафаров, *Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина* (Synchrobook, Пушино, 2013).
17. O. N. Krivoshapko, A. M. Popov, A. A. Artyukov, and E. Y. Kostetsky, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* **5** (2), 152 (2011).
18. A. S. Pathania, S. Kumar, S. K. Guru, et al., *PLoS* **9** (11), (2014).
19. G. M. Shankar, J. Antony, R. J. Anto, *Enzymes* **37**, 43 (2015).
20. S. Y. Moon, J. H. Lee, H. Y. Choi, et al., *Biol. Pharm. Bull.* **37** (10), 1633 (2014)
21. T. W. Kensler and N. Wakabayashi, *Carcinogenesis* **31** (1), 90 (2010)
22. А. О. Желтухин и П. М. Чумаков, *Успехи биол. химии* **50**, 447 (2010).

A Comparative Assessment of Action of the Alkaloid Tryptanthrin, Rosmarinic Acid and Doxorubicin on Redox-Status of Tumor and Immune Cells

A.A. Klimovich*, A.M. Popov* **, O.N. Krivoshapko*,
Y.P. Shtoda*, and A.V. Tsybulsky**

*Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
prosp. 100-let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

**Far Eastern Federal University, ul. Oktjabrskaya 27, Vladivostok, 690000 Russia

A comparative study of the effect of natural compounds with different biological activity spectra and the mechanism of action: quinazoline alkaloid tryptanthrin, phenol propanoid rosmarinic acid and the known anticancer agent doxorubicin on the dynamics of a change of redox-status of tumor and immune cells by measuring the intracellular level of reactive oxygen species depending on a dose and time of incubation was carried out. This study was performed on Ehrlich adenocarcinoma tumor cells and splenocytes after loading with the oxidant sensing fluorescent probe 2',7'-dichlorofluorescein diacetate. It was shown that when rosmarinic acid influences tumor cells it has a pronounced antioxidant activity at low dose (1 µg/ml) while high dose of rosmarinic acid (10 µg/ml) exhibits the prooxidant activity. Interestingly, in cell culture of splenocytes rosmarinic acid reduced the level of reactive oxygen species at low and high doses. The combined application of doxorubicin with a low dose rosmarinic acid has reduced the prooxidant effect of doxorubicin, which is a potent inducer of reactive oxygen species in tumor cells. Tryptanthrin is also a potent inducer of reactive oxygen species with regards to tumor and immune cells and it is more potent prooxidant than doxorubicin. Also, tryptanthrin enhanced a doxorubicin-induced formation of reactive oxygen species by tumor cells in the combined use of doxorubicin with tryptanthrin. However, the prooxidant effect of tryptanthrin is short-term which is decreased after prolonged incubation. The effect of active oxygen species on potent mechanisms of biological activity of the separate and combined substances under study is discussed.

Keywords: tryptanthrin, rosmarinic acid, doxorubicin, reactive oxygen species, inflammation, antitumor activity