

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ РАЗНЫХ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ НА РЕДОКС-СТАТУС ОПУХОЛЕВЫХ И ИММУННЫХ КЛЕТОК

© 2018 г. А.А. Климович\*, А.М. Попов\* \*\*, О.Н. Стышова\*,  
А.А. Аргюков\*, А.В. Цыбульский\*\*

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

E-mail: anka\_zaraza13@mail.ru

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

Поступила в редакцию 16.10.17 г.

После доработки 16.03.18 г.

Проведен сравнительный анализ способности ряда фармакологически-активных природных соединений, часто рассматриваемых как антиоксиданты, оказывать влияние на редокс-статус опухолевых (аденокарцинома Эрлиха) и иммунных (спленоциты) клеток. В круг изучаемых веществ вошли: флавоноид лютеолин и его сульфатированное производное 7,3'-дисульфат лютеолина из морской травы *Zostera asiatica*, оксикаротиноид астаксантин из микроводоросли *Haematococcus pluvialis* и лекарственный препарат «Гистохром», активным началом которого является гидрокси-1,4-нафтохинон эхинохром А из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*. Оценку редокс-свойств изучаемых соединений проводили *in vitro* путем измерения внутриклеточного содержания активных форм кислорода, используя селективный флуоресцентный индикатор 2',7'-дигидрохлорфлуоресцеин-диацетат. Влияние исследуемых веществ на внутриклеточный уровень активных форм кислорода определяли при низкой (1 мкг/мл) и высокой (10 мкг/мл) дозах, а также при наличии или отсутствии в инкубационной среде сильного индуктора активных форм кислорода, известного противоопухолевого агента доксорубина в дозе 10 мкг/мл. Показано, что наибольшей антиоксидантной активностью в отношении как опухолевых, так и иммунных клеток обладает лютеолин, в меньшей степени дисульфат лютеолина и астаксантин, которые в указанных выше дозах снижают уровень активных форм кислорода, как в присутствии, так и в отсутствие индуктора. Интересно, что в отличие от них, препарат «Гистохром» только в высокой дозе оказывает на опухолевые клетки незначительное антиоксидантное действие и слабое влияние на редокс-статус спленоцитов. В данной работе проанализирована возможная роль активных форм кислорода в биологической активности и механизмах действия исследуемых веществ.

**Ключевые слова:** лютеолин, дисульфат лютеолина, астаксантин, эхинохром А, активные формы кислорода.

**DOI:** 10.1134/S0006302918050149

Окислительно-восстановительные реакции являются неотъемлемой частью большинства клеточных метаболических процессов, в ходе которых в клетке постоянно образуются свободные радикалы, в частности активные формы кислорода (АФК). При нормальных условиях благодаря наличию регуляторных клеточных механизмов в клетках любого организма постоянно поддерживается редокс-баланс. Дисбаланс между производством и утилизацией клет-

кой АФК как в одну, так и в другую сторону инициирует и обостряет в организме различные патологические процессы [1,2]. При этом большинство заболеваний сопровождаются окислительным стрессом, который характеризуется гиперпродукцией АФК, оказывающих токсическое действие на клетки организма [1–4].

Однако и чрезмерное количество антиоксидантов может привести к не менее негативным последствиям. АФК в оптимальных концентрациях участвуют в регуляции процесса клеточного сигналинга. Они способствуют активации многих редокс-зависимых сигнальных путей, действуя посредством редокс-модификаций

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ДСЛ – дисульфат лютеолина, H2DCFDA – 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат.

сульфгидрильных групп в цистеиновых остатках сигнальных молекул [2–6]. Иммунокомпетентные клетки также часто генерируют токсических радикалы и используют их для уничтожения патогенов, поврежденных, иммунологически несовместимых и злокачественных клеток [3,4].

Многие исследователи сходятся во мнении [1,2], что влияние АФК на развитие онкологического и воспалительного процесса зависит от уровня эндогенных АФК и стадии заболевания. На ранних стадиях онкологического процесса АФК содействуют трансформации нормальных клеток в опухолевые, способствуя стимуляции онкологического процесса. Это происходит за счет способности АФК провоцировать мутагенез ДНК, а также активировать сигнальные пути, ответственные за пролиферацию, ангиогенез и перестройку внеклеточного матрикса. Профилактическое введение антиоксидантов различной природы чаще всего тормозит индукцию канцерогенеза. Тем не менее опухолевые клетки являются наиболее чувствительными к нарушению редокс-баланса. Поэтому именно высокий уровень АФК оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки и активирует апоптотические сигнальные пути [1,2].

Хорошо известно [7,8], что вследствие применения таких противоопухолевых препаратов, как доксорубин, резко возрастает уровень АФК. Последние играют достаточно важную роль и в противоопухолевой активности доксорубина, действуя как прямые цитотоксические агенты на опухолевые клетки и повышая активность редокс-чувствительных систем внутриклеточной регуляции апоптоза. При этом индуцируемый доксорубином окислительный стресс опосредует его множественные побочные эффекты, среди которых выделяют: кардиотоксичность, нарушение гемопоэза, развитие воспалительных и аллергических реакций. С сильной прооксидантной активностью доксорубин также связывают развитие резистентности опухолевых клеток к этому препарату [7,8].

Таким образом, использование препаратов на основе редокс-активных соединений, способных в целом поддерживать окислительно-восстановительный гомеостаз организма, может стать важным шагом в направлении развития новых подходов в терапии воспалительных и опухолевых и заболеваний.

Наличие ярко выраженных редокс-свойств является характерной особенностью многих вторичных метаболитов морских гидробионтов, в число которых входят флавоноиды, нафтохиноны и оксигенированные каротиноиды. В

частности, у лютеолина и его сульфатированного производного 7,3'-дисульфата лютеолина (ДСЛ), астаксантина и эхинохрома А была выявлена ярко выраженная активность в отношении различных радикалов [1,9–11].

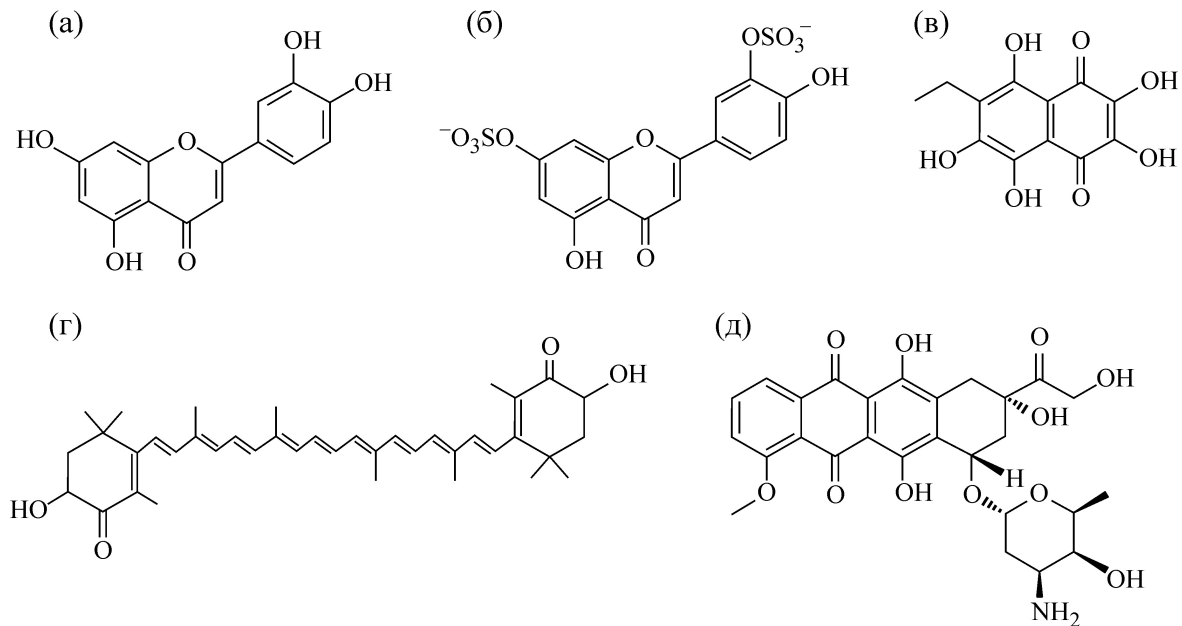
Эти классы метаболитов отличаются множественным (плейотропным) характером биологической активности при различных патологиях, что часто связывают с их окислительно-восстановительной активностью. Наличие редокс-свойств у лютеолина, ДСЛ, астаксантина и эхинохрома А в первую очередь обеспечивает защиту организма от токсического влияния АФК при патологических процессах. Интересно, что способность оказывать влияние на активность таких сигнальных систем, как Nrf2, NF-κB (ядерный фактор каппа В), ERK (экстрацеллюлярная сигнально-регулируемая киназа), JNK (стресс-активируемая протеинкиназа), также обусловлена их редокс-свойствами [11–15]. Вышесказанное позволяет говорить о лютеолине, ДСЛ, астаксантине и эхинохроме А как о лечебно-профилактических средствах, действие которых направлено на борьбу с многочисленными тяжелыми заболеваниями, связанными с воспалением.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ способности ряда фармакологически-активных природных соединений, а именно: флавонона лютеолина и его сульфатированного производного 7,3'-дисульфата лютеолина из морской травы *Zostera asiatica*, окси-каротиноида астаксантина из микроводоросли *Hematococcus pluvialis* и лекарственного препарата «Гистохром», активным началом которого является полигидрокси-1,4-нафтохинон эхинохром А из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, оказывать влияние на редокс-статус опухолевых (аденокарцинома Эрлиха) и иммунных (спленоциты) клеток, а также рассмотрена возможная роль АФК в биологической активности и механизмах действия этих веществ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали: препарат «Гистохром», лютеолин и его сульфатированное производное 7,3'-дисульфат лютеолина, выделенный из морской травы *Zostera asiatica*, окси-каротиноид астаксантин (Sigma, США), «Доксорубин-Тева» (Pharmachemie, Нидерланды), 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетат (H2DCFDA) (Sigma, США), диметилсульфоксид («Химмед», Россия).

Препарат «Гистохром» – лекарственное кардиопротекторное средство, зарегистрированное



**Рис. 1.** Химические структуры исследуемых веществ: лютеолина (а), дисульфат лютеолина (б), эхинохрома А (в), астаксантина (г) и доксорубицина (д).

на территории Российской Федерации, представляет собой растворимую форму полигидрокси-1,4-нафтохинона эхинохрома А, выделенного из тела плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*. Лютеолин и ДСЛ были выделены в лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН согласно процедуре, описанной в работе [16]. Структурные формулы исследуемых веществ представлены на рис. 1.

Анализ внутриклеточного содержания АФК проводили *in vitro* с использованием селективного флуоресцентного индикатора H2DCFDA, который проявляет преимущественную чувствительность к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и O<sub>2</sub><sup>•-</sup> [17].

Влияние вышеперечисленных веществ на уровень внутриклеточных АФК изучали при наличии и отсутствии в пробах с клеточными культурами индуктора генерации АФК. В качестве индуктора использовали известный противоопухолевый антрациклиновый антибиотик доксорубин, обладающий выраженным проокислительным действием [6,7].

Первичную культуру асцитных клеток аденокарциномы Эрлиха получали из асцитной жидкости мышей-носителей опухоли, а спленоциты – из мышинных селезенок. Клетки вносили в объеме 0,2 мл на лунку в полной питательной среде 199. Плотность клеточной культуры спленоцитов составляла 10·10<sup>3</sup>, а аденокарциномы Эрлиха – 20·10<sup>3</sup> клеток на лунку. Исследуемые вещества и препараты добавляли к клеточным культурам в концентрациях 1 и 10 мкг/мл как

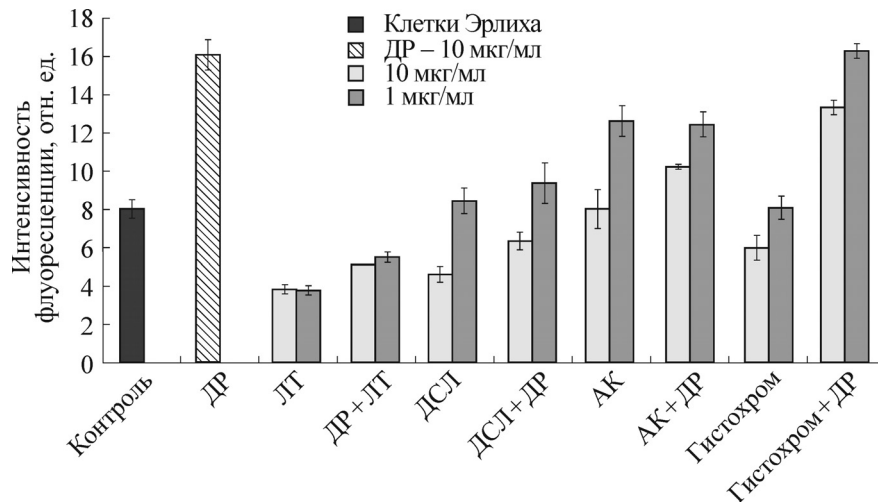
самостоятельно, так и в сочетании с доксорубином, который использовали в дозе 10 мкг/мл, поскольку было показано, что именно в этой дозе данный противоопухолевый антибиотик обладает сильной проокислительной активностью в условиях *in vitro*. Инкубацию клеточных культур проводили в черных 96-луночных планшетах (Greiner, США) в термостате в течение 3 ч при 37°C.

По окончании инкубации в каждую лунку вносили раствор флуоресцентного индикатора H2DCFDA, растворенного в диметилсульфоксиде, в конечной концентрации 10 мкМ. Нагрузку клеточных культур красителем проводили при постоянном встряхивании в закрытом термошейкере ST-3L (ELMI, Латвия) в течение 30 мин при 37°C. Измерение флуоресцентной активности проб проводили на планшетном ридере Fluoroscan Ascent FL (Labsystems, США) при длине волны экстинкции 485 и длине волны 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 эксперименте был использован флуоресцентный зонд H2DCFDA, который путем простой диффузии легко проникает внутрь клетки,



**Рис. 2.** Оценка влияния исследуемых соединений на уровень АФК, отдельно и в сочетании с доксорубицином, в первичных культурах опухолевых клетках, по уровню флуоресценции H2DCFDA после трехчасовой инкубации. Исследуемые соединения использовали в концентрациях 1 и 10 мкг/мл, доксорубицин – 10 мкг/мл. Сокращения: ДР – доксорубицин, ЛТ – лютеолин; ДСЛ – дисульфат лютеолина; АК – астаксантин.

где дезацетируется при участии цитозольных эстераз, превращаясь в H2DCF, который теряет способность проходить через мембраны, что предотвращает его утечку и флуоресценцию вне клеток. Окисление H2DCF внутриклеточными АФК, преимущественно  $H_2O_2$  и  $O_2^{\bullet-}$ , приводит к образованию интенсивно флуоресцирующего в зеленом диапазоне дихлорофлуоресцеина, что позволяет оценить динамику изменения внутриклеточного уровня АФК [17,18].

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что под действием доксорубицина интенсивность образования АФК в опухолевых клетках повышается почти в два раза по сравнению с контролем. При добавлении даже низкой дозы ДСЛ и лютеолина в инкубационную среду с доксорубицином наблюдается заметное подавление образования АФК в опухолевых клетках, но не в одинаковой степени. Следует отметить, что эффективность ингибирования генерации внуклеточных АФК у лютеолина заметно выше, чем у ДСЛ. Так, в присутствии в инкубационной среде доксорубицина лютеолин во всех исследуемых дозах снижает уровень АФК более чем в три раза, а ДСЛ в дозах 10 и 1 мкг/мл – в 2 раза и в 1,5 раза соответственно. При этом в отсутствие индуктора лютеолин во всех дозах, а ДСЛ только в высокой дозе снижают уровень АФК примерно в два раза по сравнению с контролем.

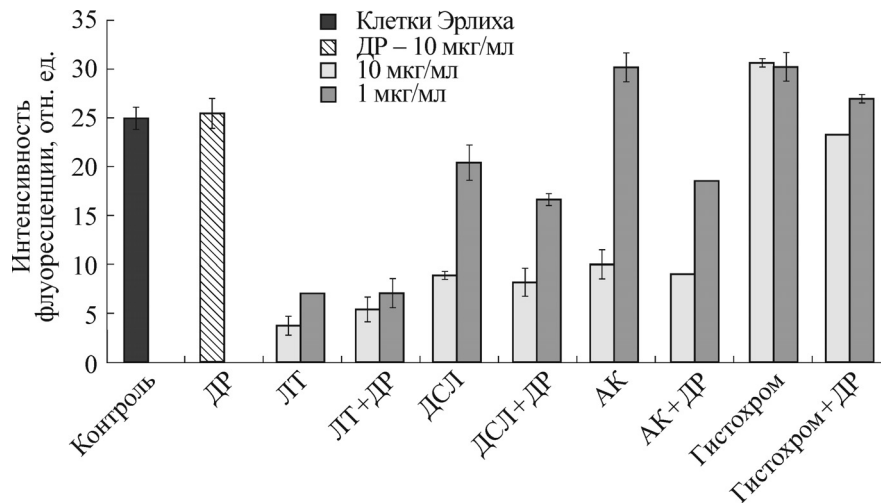
Астаксантин как в низкой, так и в высокой дозе не оказывает заметного влияния на содержание АФК в опухолевых клетках, по сравнению с контролем. При этом высокая и в меньшей степени низкая доза астаксантина в при-

сутствии доксорубицина ингибирует образования АФК, снижая прооксидантную активность этого препарата.

Что касается препарата «Гистохром», то он только в высокой дозе способствует небольшому снижению уровня АФК как относительно контроля, так и в присутствии в инкубационной среде доксорубицина. Важно подчеркнуть, что инкубация клеток в присутствии в среде низкой дозы препарата «Гистохром» не приводит к изменению уровня АФК по сравнению с контролем и в присутствии доксорубицина.

При исследовании влияния исследуемых веществ на редокс-статус спленоцитов был зарегистрирован интересный факт: доксорубицин при тех же условиях не оказывает значимого влияния на редокс-статус иммунных клеток. Зарегистрированная нами особенность действия доксорубицина на иммунокомпетентные клетки, возможно, связана с тем, что несмотря на невысокую селективность, этот антрациклиновый антибиотик более токсичен в отношении быстро делящихся клеток (опухолевые клетки, а также стволовые клетки кроветворной системы, слизистой желудка и кишечника), что, вероятно, обусловлено более высокой скоростью синтеза ДНК и РНК в опухолевых клетках, а также повышенной проницаемостью их клеточных мембран для метаболитов по сравнению с покоящимися, нормальными клетками [19].

Из данных, приведенных на рис. 3, можно видеть, что лютеолин и ДСЛ при добавлении к первичной культуре спленоцитов с разной степенью эффективности оказывают антиоксидантное действие. Из всех исследованных нами



**Рис. 3.** Оценка влияния исследуемых соединений на уровень АФК, отдельно и в сочетании с доксорубицином, в первичных культурах спленоцитов по уровню флуоресценции H2DCFDA после трехчасовой инкубации. Исследуемые соединения использовали в концентрациях 1 и 10 мкг/мл, доксорубицин – 10 мкг/мл. Сокращения: DR – доксорубицин, ЛТ – лютеолин; ДСЛ – дисульфат лютеолина; АК – астаксантин.

соединений наиболее выраженным эффектом на редокс статус спленоцитов обладал лютеолин, который в обеих дозах как при самостоятельном добавлении в среду, так и в сочетании с доксорубицином уменьшает содержание АФК примерно в три с половиной раза. ДСЛ, в отличие от лютеолина, оказывает умеренное антиоксидантное действие. В низкой дозе ДСЛ только при совместном введении в инкубационную среду с доксорубицином уменьшает уровень АФК в полтора раза. При этом применение высокой дозы ДСЛ самостоятельно и в сочетании с доксорубицином приводит к снижению концентрации АФК почти в три раза.

Как видно из рис 3, оксигенированный каротиноид астаксантин оказывает достаточно сильное антиоксидантное действие в отношении иммунных клеток. Так, в высокой дозе астаксантин как при самостоятельном добавлении в инкубационную среду, так и в сочетании с доксорубицином, снижает уровень АФК по сравнению с контролем в три раза. В низкой дозе астаксантин при самостоятельном применении практически не оказывает значимого влияния на редокс-статус иммунных клеток, в то время как при введении в инкубационную среду совместно с доксорубицином снижает уровень АФК почти в полтора раза.

Интересно, что обработка клеточной культуры спленоцитов обеими дозами препарата «Гистохром» приводит к заметному повышению содержания АФК по сравнению с контролем. При совместном применении высокой дозы «Гистохрома» в присутствии доксорубицина на-

блюдалось незначительное снижение уровня АФК по сравнению с доксорубицином.

Из данных эксперимента видно, что исследуемые нами соединения с разной степенью эффективности влияют на редокс-статус клеточных культур, что, возможно, обусловлено отличиями в молекулярных механизмах, посредством которых эти соединения оказывают влияние на уровень внутриклеточного АФК.

Принято считать, что проявление антиоксидантного действия являются ключевым свойством флавоноидов и каротиноидов. Основной механизм антирадикального действия данных классов соединений – это, главным образом, прямая радикалперехватывающая активность. Лютеолин, ДСЛ и астаксантин при непосредственном взаимодействии как с неорганическими ( $O_2^{\bullet-}$ , OH), так и с органическими пероксильными радикальными формами выполняют роль доноров протона или электрона с образованием относительно стабильного «антиоксидантного радикала». Радикалутилизующая активность флавоноидов и каротиноидов и стабильность их радикалов определяются особенностями их структуры [9,11,20].

Антиоксидантная активность каротиноидов обусловлена наличием множества чередующихся сопряженных двойных С=С-связей в полиеновой цепи их молекул. При этом эффективность перехвата свободных радикалов у каротиноидов возрастает с увеличением количества этих С=С-связей. У таких оксикаротиноидов, как астаксантин, дополнительно присутствуют кето- и гидроксильные группы в терминальных



4. M. Y. Kim, *Oncol Lett.* **13** (3), 1417 (2017).
5. O. Firuzi, R. Miri, M. Tavakkoli and L. Saso, *Current Medicinal Chemistry* **18** (25), 3871 (2011).
6. L. Gambhir, *Drug Discoveries & Therapeutics* **10** (2), 93 (2016).
7. P. Angsutararux, S. Luanpitpong, and S. Issaragrisil, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, 13 (2015).
8. G. C. Pereira, A. M. Silva, C. V. Diogo, et al., *Curr. Pharmaceut. Design* **17** (20), 2113 (2011).
9. А. М. Попов, А. Н. Осипов, Е. А. Корепанова и др., *Биофизика* **61** (6), 1079 (2016).
10. А. М. Попов, А. Н. Осипов, Е. А. Корепанова и др., *Биофизика* **62** (3) 509 (2017).
11. A. M. Popov, O. N Krivoshapko, and A. A. Artyukov, *Russ. J. Biopharmaceut.* **5** (5), 13 (2013).
12. A. V. Tsybulsky, A. M. Popov, and O. N. Krivoshapko, *Russ. J. Biopharmaceut.* **5** (3) 21 (2013).
13. W. Wu, M. B. Lu, and L. J. Yu, *Zeitschrift Naturforschung* **66** (5–6), 283 (2011).
14. А. М. Попов, О. Н. Кривошапко, А. А. Климович и А. А. Артюков, *Биомед. химия* **62** (1), 22 (2016).
15. J. Li, W. Dai, Yu. Xia, et al., *Marine drugs* **13** (10), 6064 (2015).
16. O. N. Krivoshapko, A. M. Popov, A. A. Artyukov, et al., *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. B: Biomed. Chem.* **5** (2) 152 (2011).
17. H. Yao and R. A. Jockusch, *J. Phys. Chem.* **117** (6), 1351 (2013).
18. C. Loetchutinat, S. Kothan, and S. Dechsupa, *J. Rad. Phys. Chem.* **72** (2), 323 (2005).
19. T. Healthcare, *Physicians' Desk Reference Guide to Drug Interactions, Side Effects, and Indications* (Medical Economics, 2002)
20. A. B. Ribeiro, A. Berto, R. C. Chistй, et al., *Pharm. Biol.* **53** (9), 1267 (2015).
21. R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata, et al., *Molecules* **12**, 1496 (2007).
22. A. Y. Jahng, *Pharm. Res.* **36** (5), 517 (2013).
23. A. M. Popov and O. N. Krivoshapko, *J. Biomed. Sci. Engineer.* **6**, 543 (2013).
24. L. Gambhir, *Drug Discoveries & Therapeutics* **10** (2), 93 (2016).
25. A. A. Artyukov, A. M. Popov, A. V. Tsybulsky, et al., *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series B: Biomed. Chem.* **7**, 239 (2013).

## The Comparative Assessment of the Effects of Different Secondary Metabolites from Marine Hydrobionts on Redox-Status of Tumor and Immune Cells

**A.A. Klimovich\*, A.M. Popov\*,\*\*, O.N. Styshova\*, A.A. Artyukov\*, and A.V. Tsybulsky\***

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

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

We carried out a comparative analysis of the capacity of a number pharmacologically active natural compounds, which are commonly classified as antioxidants, to influence the redox status of tumor cells (Ehrlich's adenocarcinoma) and immune cells (splenocytes). The following substances were studied: flavone luteolin and its sulfated derivative 7,3'-luteolin disulfate from sea grass *Zostera asiatica*, oxycarotinoid astaxanthin from microalgae *Haematococcus pluvialis* and the drug "Histo-chrome" with an active substance, hydroxy-1,4-naphthoquinone echinochrome A from the flat sea urchin *Scaphechinus mirabilis*. The redox properties of the studied compounds were evaluated *in vitro* by measuring the intracellular content of reactive oxygen species using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as a selective fluorescent indicator. The effect of the test substances on the intracellular level of reactive oxygen species was determined at low (1 mg/ml) and high (10 mg/ml) doses of substances, as well as in the presence or absence of a strong inducer of reactive oxygen species, a known antitumor agent doxorubicin in a dose of 10 mg/ml. It has been shown that luteolin, and to a lesser degree, luteolin disulfate and astaxanthin, have the highest antioxidant activity both in tumor and immune cells, and in the above doses reduce the level of reactive oxygen species, both in the presence and absence of an inducer. Interestingly, in contrast to these substances, the drug "Histo-chrome" only in a high dose exerts a slight antioxidant effect on tumor cells and has a weak influence on the redox status of splenocytes. In this study, the possible role of reactive oxygen species in biological activity and the mechanisms of the effect of the test substances are analyzed.

*Keywords: luteolin, luteolin disulfate, astaxanthin, echinochrome A, reactive oxygen species*