

УДК 577.1

ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЭПОКСИАЛАНТОЛАКТОНОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ

Пухов С.А., Неганова М.Е., Аникина Л.В., Шевцова Е.Ф.,
Афанасьева С.В., Клочков С.Г.

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук,
Черноголовка, e-mail: pukhov.sergey@gmail.com

Изучено действие природного сесквитерпенового лактона эпоксиалантолактона и его производных на выживаемость клеточной линии MCF7 и перекисное окисление липидов (ПОЛ), индуцируемое ионами железа. Исходное природное соединение не проявляет антиоксидантной активности в широком диапазоне концентраций, в то время как остальные синтезированные вещества эффективно ингибируют Fe^{3+} -индуцированное ПОЛ. Эпоксиалантолактон и его производные ингибируют рост культуры клеточной линии MCF7 в дозозависимом виде за счет механизмов, связанных не только с продукцией свободных радикалов и влиянием на окислительные повреждения липидов. В большинстве случаев антиоксидантный потенциал этих соединений не препятствует проявлению их цитотоксичности по отношению к клеточной линии MCF7, что показано при предобработке клеток *N*-ацетилцистеином. Показано, что данные соединения могут представлять интерес в качестве потенциальных противоопухолевых агентов с различными мишенями действия.

Ключевые слова: сесквитерпеновые лактоны, аденокарцинома, апоптоз, активные формы кислорода, перекисное окисление липидов

EPOXYALANTOLACTONE AND ITS DERIVATIVES INHIBIT THE GROWTH OF MAMMARY GLAND ADENOCARCINOMAS

Pukhov S.A., Neganova M.E., Anikina L.V., Shevtsova E.F.,
Afanaseva S.V., Klochkov S.G.

Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences,
Chernogolovka, e-mail: pukhov.sergey@gmail.com

In the present study we investigated the influence of natural sesquiterpene lactone epoxyalantolactone and its derivatives on the growth of MCF7 cells and lipid peroxidation induced by iron ions. Original natural compound does not show antioxidant activity in a wide range of concentrations, while synthesized compounds are effectively inhibit Fe^{3+} -induced lipid peroxidation. Epoxyalantolactone and its derivatives inhibit the growth of MCF7 cell line in a dose-dependent manner by mechanisms related not only by the production of free radicals and lipid peroxidation. In most cases the antioxidant capacity of these compounds prevents the appearance of their cytotoxicity to MCF7 cell line, as shown by cell pretreatment with *N*-acetylcysteine. Have been demonstrated that tested compounds received considerable attention as potential agent with various mechanisms of action.

Keywords: sesquiterpene lactones, adenocarcinoma, apoptosis, reactive oxygen species, lipid peroxidation

В последнее время интенсивно исследуются сесквитерпеновые лактоны растений семейства сложноцветных (*Asteraceae*) и механизмы их противоопухолевого действия [7]. Противоопухолевая активность сесквитерпеновых лактонов реализуется в основном через индукцию апоптоза. Немаловажную роль в этом процессе играют влияние лактонов на клеточный редокс-статус, образование активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, окислительные повреждения в клетке и запуск митохондриально-зависимого пути апоптоза [10]. Было показано, что сесквитерпеновые лактоны, выделенные из известного в народной медицине многих стран растения девясила высокий (*Inula helenium* L.), обладают выраженным антипролиферативным действием в отношении ряда культур опухолевых клеток [6]. Изоалантолактон (основной сесквитерпеновый лактон *I. helenium*) индуцирует апоптоз в различных опухолевых клеточ-

ных линиях. Данный эффект обеспечивается за счет регуляции белков семейства Bcl, активации ростовых факторов и каспазы-3, причем все эти процессы тесно связаны с образованием АФК [9]. В настоящем исследовании мы оценили влияние минорного сесквитерпенового лактона *I. helenium* – эпоксиалантолактона – и его производных на рост клеток аденокарциномы молочной железы человека и способность этих соединений индуцировать или предотвращать окислительные повреждения липидов мембран клеток.

Материалы и методы исследования

Исследуемые соединения

Эпоксиалантолактон выделяли из корней растения девясила высокий (*Inula helenium* L., сем. *Asteraceae*) по стандартной методике, препаративные количества эпоксиалантолактона получали эпоксидированием алантолактона [1]. Производные эпоксиалантолактона **1** и **2** получали реакцией нуклеофильного присоединения аминов по активированной

экзометиленовой связи лактонного цикла (реакция Михаэля) (рис. 1) [2].

Реакция эпоксиалантолактона с аминами (общая методика). Смесь эпоксиалантолактона и соответствующего амина (10%-й избыток) растворяли при перемешивании в метаноле и оставляли при комнатной температуре на ночь. По завершении реакции происходило образование продукта в виде осадка. При использовании в качестве нуклеофилов вторичных аминов были получены аминопроизводные эпоксиалантолактона **1** (15 соединений).

При проведении реакции с рядом первичных аминов, которые содержали дополнительный *p*- или *π*-донорный фрагмент, отделенный от аминогруппы углеводородным мостиком, нами были получены производные нового структурного типа – гидрированные бензо[*g*]фуоро[4,3,2-*cd*]индолонны **2** [3]. Таким способом было получено 10 производных.

Строение всех полученных соединений было установлено с помощью спектральных методов и в ряде случаев подтверждено методом РСА.

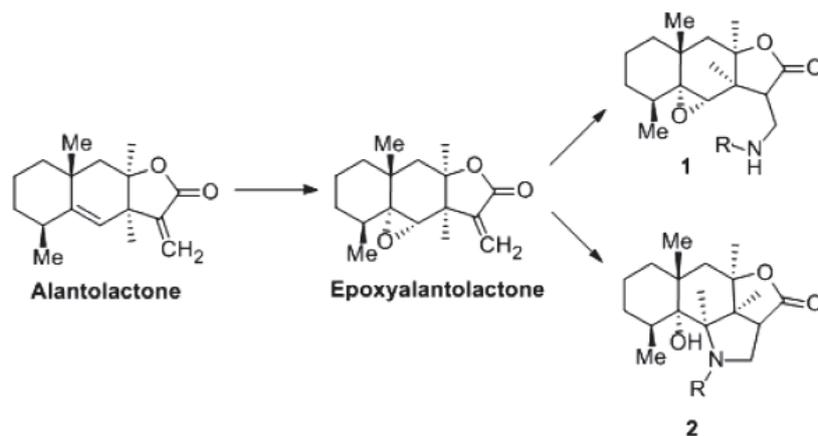


Рис. 1. Получение эпоксиалантолактона и его производных

Культуры клеток

Культуру клеток человека MCF7 (ATCC® HTB-22™) (аденокарцинома молочной железы) выращивали в среде ЕМЕМ (НПП ПанЭко) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone®, Thermo Scientific), 2мМ L-глутамин (НПП ПанЭко) и 1% гентамицина (ОАО Биохимик) в качестве антибиотика и инкубировали при 37°C в атмосфере CO₂ (5%).

Цитотоксичность

Цитотоксичность синтезированных соединений была определена по МТТ-тесту [8]. Клетки MCF7 сеяли в 96-луночный планшет (CELLTREAT™) в количестве 1·10⁴ клеток/200 мкл и культивировали при 37°C в атмосфере CO₂ (5%). После 24 часов инкубации к культурам клеток были добавлены различные концентрации тестируемых соединений (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 и 1,56 мкМ), и далее клетки культивировали в тех же условиях 48 часов. Для каждой концентрации эксперименты были выполнены в трех повторностях. Все вещества растворяли в ДМСО (PANREAC QUÍMICA S.L.U), конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 1% и не была токсична для клеток. В контрольные лунки добавляли растворитель в количестве 1%. После инкубации в каждую лунку было добавлено 20 мкл МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) (5 мг/мл) (Sigma-Aldrich) и планшеты дополнительно инкубировали в течение 2 часов. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора (Victor³, PerkinElmer) определяли оптическую плотность при 530 нм, за вычетом измерен-

ного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.

Определение интенсивности перекисного окисления липидов

Перекисное окисление липидов гомогената мозга крыс определяли по модифицированному ТБК-тесту [4]. В качестве инициатора ПОЛ гомогената мозга крыс выступали ионы трехвалентного железа (FeNH₄(SO₄)₂·12H₂O). Оптическую плотность регистрировали на планшетном анализаторе при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовали гомогенат мозга крыс в отсутствие соединений, но с добавлением равного объема растворителя.

Определение восстановительной активности соединений

Восстановительную активность исследуемых веществ устанавливали на основании их активности в реакции переноса электрона с использованием CUPRAC-теста [5]. В качестве вещества-стандарта использовали известный антиоксидант – тролокс. Значение тролокс-эквивалента определяли графически по величине оптической плотности с использованием калибровочного графика – концентрационной зависимости количества восстановленной меди от содержания тролокса.

Предобработка N-ацетилцистеином

Для определения роли окислительного стресса в процессе ингибирования роста клеточной линии аденокарциномы молочной железы при действии эпоксиалантолактона и его производных исследовали их цитотоксичность в присутствии N-ацетилцистеина –

специфичного АФК-акцептора. Для этого в лунки с культивируемыми клетками MCF7 (кроме контроля) добавляли 3 мкл *N*-ацетилцистеина (5 мМ) (Sigma-Aldrich) в ЕМЕМ и инкубировали в течение 4 часов, после этого вносили исследуемые соединения (100 мкМ) и определяли значение IC_{50} согласно процедуре, приведенной выше.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что исходный эпоксиантолактон не проявляет антиоксидантной активности в широком диапазоне концен-

траций, в то время как остальные синтезированные вещества эффективно ингибируют Fe^{3+} -индуцированное ПОЛ (табл. 1).

Для ряда соединений антиоксидантная активность в значительной степени может быть связана с восстановительной активностью, определяемой в CUPRAC-тесте. Это прежде всего относится к производным L05-0003, L05-5488n и L05-5488, более активным, чем тролокс, и производным L05-5272n, L05-5272st, близким по активности к тролоксу, которые оказывают и наиболее сильное ингибирование ПОЛ.

Таблица 1

Антиоксидантная активность соединений

№ п/п	Соединение	Ингибирование ПОЛ, % от контроля	CUPRAC-тест, ТЭ*
1.	Эпоксиантолактон	— **	—
2.	L05-0123	76,28 ± 2,84	—
3.	L05-0003	77,69 ± 0,33	1,14 ± 0,12
4.	L05-5488n	87,39 ± 2,57	1,20 ± 0,06
5.	L05-5488	85,73 ± 1,83	1,20 ± 0,10
6.	L05-0181	82,36 ± 1,29	—
7.	L05-8019	72,95 ± 2,74	—
8.	L05-8031	79,99 ± 3,81	—
9.	L05-0020	—	—
10.	L05-5272n	71,78 ± 3,81	0,65 ± 0,04
11.	L05-5272st	73,57 ± 3,56	0,77 ± 0,07
12.	L05-0165n	77,34 ± 6,09	—
13.	L05-0165v	80,99 ± 3,69	0,30 ± 0,09
14.	L05-3008	64,76 ± 8,28	0,23 ± 0,04
15.	L05-0073	73,42 ± 11,05	0,22 ± 0,06

Примечания:

* тролокс-эквивалент;

** нет влияния.

Практически все исследованные соединения обладают выраженной цитотоксической активностью. Как показали проведенные эксперименты, воздействие эпоксиантолактоном и его производными в течение 48 часов ингибирует рост культуры клеточной линии MCF7 (табл. 2) в дозозависимом виде. Следует отметить, что цитотоксическая активность ряда аддуктов эпоксиантолактона (соединения L05-0003, L05-6640, L05-0218, L05-6605, L05-6747) превышает активность исходного соединения в несколько раз.

Предварительная обработка *N*-ацетилцистеином снижает токсический эффект исследуемых соединений в разной степени (рис. 2) вплоть до практически полного подавления цитотоксического эффекта соединения L05-5272n. В случае изоантолактона в работе [4] было показано, что предварительная обработка

различных опухолевых клеточных линий *N*-ацетилцистеином сохраняет жизнеспособность клеток, указывая, что цитотоксическое действие на клетки осуществляется в основном через генерацию АФК.

Таким образом, можно предположить, что в основе цитотоксической активности производных эпоксиантолактона лежат механизмы, связанные не только с продукцией свободных радикалов и влиянием на окислительные повреждения липидов. В большинстве случаев антиоксидантный потенциал этих соединений не препятствует проявлению их цитотоксичности по отношению к клеточной линии MCF7. В то же время для соединений L05-5272n и L05-5702 (структурный тип 1) участие АФК-зависимых механизмов в гибели клеток MCF7 более выражено и цитотоксический эффект этих соединений в большей степени может быть предотвращен добавлением *N*-ацетилцистеина.

Таблица 2

Цитотоксичность соединений в отношении культуры опухолевых клеток MCF7

№ п/п	Соединение	IC ₅₀ , мкМ
1.	Эпоксиалантолактон	47,79 ± 1,65
2.	L05-0020	> 250,00
3.	L05-0073	176,76 ± 11,59
4.	L05-0165v	154,69 ± 11,45
5.	L05-0165n	169,89 ± 2,77
6.	L05-0181	184,65 ± 35,82
7.	L05-5272st	137,38 ± 0,24
8.	L05-5272n	64,46 ± 4,90
9.	L05-5488	138,85 ± 6,61
10.	L05-5488n	210,18 ± 3,61
11.	L05-8019	> 250,00
12.	L05-8031	176,76 ± 13,92
13.	L05-3008	119,40 ± 0,09
14.	L05-0123	243,62 ± 8,34
15.	L05-0003	23,73 ± 3,34
16.	L05-0619	77,06 ± 11,29
17.	L05-6616	151,48 ± 12,56
18.	L05-6640	18,37 ± 0,60
19.	L05-0218	23,55 ± 0,74
20.	L05-5702	40,47 ± 2,83
21.	L05-1073	91,73 ± 2,12
22.	L05-6605	19,30 ± 0,01
23.	L05-0140	40,47 ± 0,98
24.	L05-6747	11,21 ± 0,55
25.	L05-5418	24,31 ± 1,39

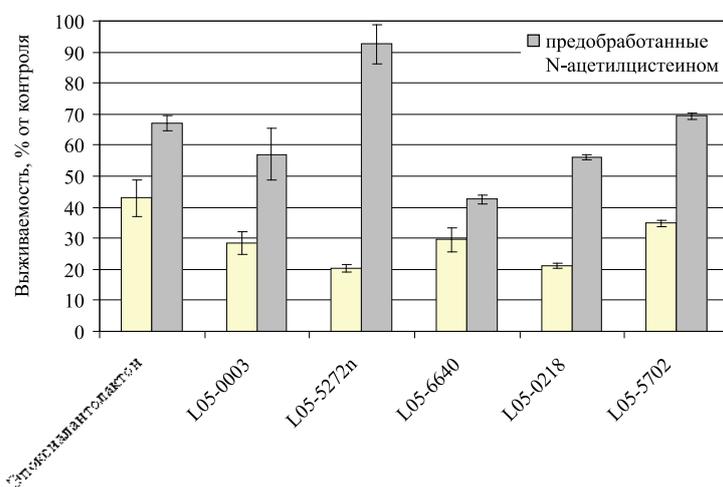


Рис. 2. Выживаемость клеток MCF7, предобработанных N-ацетилцистеином, под действием исследуемых соединений

Исследование действия эпоксиалантолактона и его производных на трансмембранный потенциал митохондрий, высвобождение проапоптотических факторов из митохондрий и влияние на клеточный цикл поможет уточнить предполагаемый механизм действия

полученных соединений. Вместе с тем наличие активных соединений с разными механизмами действия среди синтезированной серии аддуктов позволяет рассматривать их как основу для разработки агентов с высоким противоопухолевым потенциалом.

Работа выполнена при поддержке Программы Президиума Российской академии наук «Фундаментальные науки – медицине».

Список литературы

1. Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Пушин А.Н. Изомеризация производных алантолактона под действием кислот / Хим. прир. соед. – 2006. Т. 42, № 4. – С. 325–330.
2. Клочков С.Г., Афанасьева С.В., Булычев Ю.Н., Неганова М.Е., Шевцова Е.Ф. Синтез и биологическая активность конъюгатов изоалантолактона с триптамими / Изв. акад. наук. Сер. хим. – 2012. – № 2. – С. 407–412.
3. Клочков С.Г., Ананьев И.В., Пухов С.А., Афанасьева С.В. Стереохимия аза-реакции Михаэля с участием природных алантолактонов / Хим. гет. соед. – 2012. – № 5. – С. 750–756.
4. Неганова М.Е., Блик В.А., Клочков С.Г., Чепурнова Н.Е., Шевцова Е.Ф. Исследование антиоксидантных свойств нового триптаминового производного секуринина и его влияние на судорожную активность мозга при экспериментальной эпилепсии / Нейрохимия. – 2011. – Т. 28, № 3. – С. 236–243.
5. Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenol and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method // J. Agric. Food Chem. – 2004. – № 52. – P. 7970–7981.
6. Konishi T., Shimada Y., Nagao T., Okabe H., Konoshima T. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium* // Biol. Pharm. Bull. – 2002. – Vol. 25, № 10. – P. 1370–1372.
7. Merfort I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer // Curr. Drug Targets. – 2011. – Vol. 12, № 11. – P. 1560–1573.
8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Meth. – 1983. – № 65. – P. 55–63.
9. Rasul A., Di J., Millimouno F.M., Malhi M., Tsuji I., Ali M., Li J., Li X.. Reactive oxygen species mediate isoalantolactone-induced apoptosis in human prostate cancer cells // Molecules. – 2013. – Vol. 5, № 18(8). – P. 9382–9396.
10. Zhang S., Won Y.K., Ong C.N., Shen H.M. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms // Curr. Med. Chem. Anticancer Agents. – 2005. – Vol. 5, № 3. – P. 239–249.

References

1. Klochkov S.G., Afanas'eva S.V., Pushin A.N. Acidic isomerization of alantolactone derivatives / Chem. of Nat. Comp. 2006. Vol. 42, no. 4. pp. 400–406.
2. Klochkov S.G., Afanas'eva S.V., Bulychev Yu.N., Neganova M.E., Shevtsova E.F. Synthesis and biological activity of

isoalantolactone tryptamine conjugates / Rus. Chem. Bull., Int. Ed. 2012. Vol. 61, no. 2. pp. 409–415.

3. Klochkov S.G., Anan'ev I.V., Pukhov S.A., Afanas'eva S.V. Stereochemistry of the aza-Michael reaction with natural alantolactones / Chem. of Het. Comp. 2012. Vol. 48, no. 5. pp. 698–703.

4. Neganova M.E., Klochkov S.G., Shevtsova E.F., Blik V.A., Chepurnova N.E. Investigation of the antioxidant characteristics of a new tryptamine derivative of securinine and its influence on seizure activity in the brain in experimental epilepsy / Neurochem. J. 2011. Vol. 5, no. 3. pp. 208–214.

5. Apak R., Guclu K., Ozyurek M., Karademir S.E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenol and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. J. Agric. Food Chem. 2004. no. 52. pp. 7970–7981.

6. Konishi T., Shimada Y., Nagao T., Okabe H., Konoshima T. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. Biol. Pharm. Bull. 2002. Vol. 25, no. 10. pp. 1370–1372.

7. Merfort I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. Curr. Drug Targets. 2011. Vol. 12, no. 11. pp. 1560–1573.

8. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Meth. 1983. no. 65. pp. 55–63.

9. Rasul A., Di J., Millimouno F.M., Malhi M., Tsuji I., Ali M., Li J., Li X.. Reactive oxygen species mediate isoalantolactone-induced apoptosis in human prostate cancer cells. Molecules. 2013. Vol. 5, no. 18(8). pp. 9382–9396.

10. Zhang S., Won Y.K., Ong C.N., Shen H.M. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. Curr. Med. Chem. Anticancer Agents. 2005. Vol. 5, no. 3. pp. 239–249.

Рецензенты:

Григорьев В.В., д.б.н., заведующий лабораторией нейрорецепции, ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, ведомственная принадлежность Федеральное агентство научных организаций (ФАНО), г. Черноголовка;

Кинзирский А.С., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией фармакологии, ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук, ведомственная принадлежность Федеральное агентство научных организаций (ФАНО), г. Черноголовка.

Работа поступила в редакцию 26.08.2014.