

І. В. Бойчук, О. М. Пяковська, О. Р. Мельников,
Д. Л. Колесник, Г. І. Соляник

Експериментальне дослідження протипухлинної активності оксирезвератролу

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
імені Р. Є. Кавецького НАН України, м. Київ

Ключові слова: оксирезвератрол, карцинома легені Льюїс, антиоксидантна активність, активні форми кисню

Низька специфічність фармакологічної дії протипухлинних препаратів та висока їхня токсичність щодо нормальних органів та тканин організму гостро ставить питання щодо розробки нових ефективних протипухлинних засобів, спрямованих, у першу чергу, на пригнічення метастазування, як основної причини загибелі онкологічних хворих.

Відомо, що побічним продуктом нормального кисневого метаболізму в живих клітинах (нормальних та пухлинних) є активні форми кисню (АФК), що зумовлюють значний вплив на виживаність та функціональну активність клітин [1]. Підвищений рівень АФК є характерним для пухлинних клітин за рахунок дисфункції їхніх мітохондрій та неповноцінності васкулярної сітки в пухлинній тканині, що зумовлює формування в пухлинних клітинах оксидативного стресу [2, 3]. Останній сприяє інвазії та метастазуванню пухлинних клітин, оскільки АФК задіяні в перебудові цитоскелету та клітинній рухливості (що є маркерними властивостями метастатично-активних пухлинних клітин) [4, 5].

Дуалістична роль АФК в онкології (антинеопластична та пронеопластична) вказує на те, що тип пухлинних клітин, їхній редокс потенціал, рівень АФК та тривалість впливу на клітини (чи внутрішньоклітинні процеси) можуть бути детермінантами. Базуючись на цих фактах, у світі проводиться достатньо активний пошук агентів з антиоксидантними власти-

востями, здатними стримувати ріст та/або метастазування злоякісних новоутворень [6].

Рослини є традиційним джерелом фармакологічно активних речовин, у тому числі з протипухлинною активністю [7]. Серед засобів рослинного походження велику увагу останнім часом привертають стилібени, які відносяться до поліфенольних сполук [8, 9]. Уважається, що стилібени проявляють антиоксидантну, протизапальну, кардіотропну та протипухлинну активність [10–13].

До найвідоміших у фармакології стилібенів відносяться резвератрол (3,4',5'-тригідроксистилібен) та оксирезвератрол (2,3',4,5'-тетрагідроксистилібен) [14]. На відміну від резвератролу, протипухлинну активність якого широко досліджували, вивчення фармакологічної активності оксирезвератролу (ОХУ) обмежувалося патологіями, не пов'язаними з онкологічним процесом [15–17]. ОХУ характеризується високою розчинністю у воді, високою біодоступністю, меншою цитотоксичністю відносно нормальних тканин та суттєво вищою антиоксидантною активністю порівняно з резвератролом.

Мета дослідження – вивчити протипухлинну та антиметастатичну активність ОХУ відносно високометастатичної карциноми легені Льюїс та встановити можливий зв'язок цієї активності з антиоксидантними властивостями ОХУ.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на 56 мишах-самках лінії C57/BL6 вагою 18,5–21,5 г, віком 2–2,5 міс розводки віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького (ІЕПОР) НАН України. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно з вимогами регіонального Комітету з

етики роботи з піддослідними тваринами та з додержанням правил роботи з лабораторними тваринами.

Як пухлинну модель було використано карциному легені Льюїс (LLC), отриману з Національного банку клітинних ліній та пухлинних штамів ІЕПОР НАН України. Клітини LLC підтримували *in vitro* за стандартних умов у поживному середовищі RPMI 1640 (Sigma, США) з додаванням 10% ЕТС (Sigma, США) 2 мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37 °С за вологих умов, 5% CO₂, 1·10⁶ пухлинних клітин.

Для проведення досліджень мишам лінії С57В1/6 внутрішньом'язово (у праве стегно) перещеплювали 1·10⁶ клітин LLC у 0,1 мл розчину Хенкса. Після перещеплення тварин було поділено на дві групи. Мишам дослідної групи (20 тварин) вводили щоденно перорально 5 разів на тиждень протягом 3 тижнів 0,4 мл водного розчину ОХУ (сумарна доза ОХУ складала 0,2 г/кг ваги тварини, що в 5 разів менше за ЛД₅₀), починаючи з другого дня після перещеплення пухлинних клітин. Миші контрольної групи (36 тварин) отримували за відповідною схемою дистильовану воду. Кількість уведень – 15.

Вимірювання розміру пухлини проводили кожну третю добу росту пухлин, починаючи з 10-ї доби після її перещеплення. Для цього за допомогою штангенциркуля проводили визначення діаметра пухлини в кожній тварині, після чого вираховували об'єм пухлини за формулою:

$$V = \frac{\pi (d)^3}{6},$$

де d – діаметр пухлини (мм).

На 5 добу після закінчення терапії (25 доба росту пухлини) тварин декапітували під легким ефірним наркозом, видаляли легені та підраховували кількість метастазів (з урахуванням їхнього розміру) та визначали їхній об'єм за формулою:

$$V_M = \sum_1^N \frac{\pi (d_i)^3}{n_i \cdot 6},$$

де V_M – загальний об'єм метастазів, n_i – кількість метастазів з діаметром d_i.

Підрахунок кількості метастазів та визначення їхнього діаметра проводили з використанням біокулярного мікроскопа та міліметрової шкали.

Для визначення можливих механізмів протипухлинної активності ОХУ досліджували:

- цитотоксичну/цитостатичну дію *in vitro*;
- антиоксидатну активність *in vitro*;
- вплив на функціональний стан електрон-транспортного ланцюзі мітохондрій пухлинних клітин *in vivo*.

У дослідженнях *in vitro* клітини висаджували в лунки 24-лункової планшети з початковою щільністю 1,5·10⁵ клітин/лунку в середовищі, стандартному за вмістом глюкози та глутаміну. Після закінчення терміну передінкубації середовище замінювали на свіже, а саме: 1) стандартне за вмістом глюкози та глутаміну, 2) дефіцитне за вмістом глюкози, 3) дефіцитне за вмістом глутаміну з додаванням ОХУ у діапазоні концентрацій 0,013–0,500 мг/мл. Кількість клітин у суспензії та їхню життєздатність оцінювали рутинним методом за допомогою прямого підрахунку з використанням 0,4% розчину трипанового синього.

Антиоксидантну активність ОХУ досліджували *in vitro* за здатністю інактивувати активні форми кисню (АФК) у клітинах LLC. Рівень внутрішньоклітинних АФК у пухлинних клітинах визначали з використанням 2,7-дихлорофлуоресцеїн діацетату (Sigma, США) на спектрофлуориметрі (світлофільтр збудження 495 нм, світлофільтр емісії 530 нм) згідно з [18].

Вплив ОХУ на функціональний стан електрон-транспортного ланцюга (ЕТЛ) мітохондрій пухлинних клітин *in vivo* визначали спектроскопічним методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР). Об'єктом дослідження були тканини пухлини мишей контрольної групи (на 10, 14, 16, 20 та 25 добу росту пухлини) та дослідної групи (на 20 та 25 добу росту LLC), а також м'язова тканина інтактних мишей. З тканини пухлини і стегового м'яза готували циліндричні зразки каліброваних розмірів (d = 4,0 мм, l =

25–35 мм), заморожували та зберігали при температурі 77 К. Записи спектрів ЕПР зразків проводили за низькотемпературних умов (77 К) на спектрометрі E-109 Varian (США) при швидкості розгортки поля 500 Е/хв, амплітуді модуляції $1,25 \times 10$ Е, потужності НВЧ-випромінювання 10,0 мВт, сталій часу приладу – 1,0 с. За даними спектрів ЕПР оцінювали рівні відновлених залізо-сірчаних центрів ($g = 1,94$) ЕТЛ мітохондрій та нітрозильних комплексів гемового заліза ($g_{\text{сер}} = 2,007$). Для аналізу динаміки змін показників ЕТЛ у пухлинній тканині (за впливу ОХУ та без нього) за нульове значення (на графіках зображені точкою «0») брали відповідні показники м'язової тканини інтактних мишей.

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням дескриптивної статистики, нелінійного регресійного аналізу, t-критерію Стьюдента за допомогою програм Microsoft Excel і Microcal Origin.

Результати та їх обговорення. Результати дослідження протипухлинної дії оксирезвератролу (ОХУ) показали, що даній сполуці притаманна як проти-

пухлинна, так і антиметастатична активність.

Застосування ОХУ привело до статистично достовірного пригнічення росту та метастазування LLC (таблиця), об'єм первинної пухлини зменшувався на 37% ($p < 0,05$), а кількість метастазів у легені – на 42% ($p < 0,05$). Найсуттєвіше ОХУ впливав на об'єм метастатичного ураження легені, зменшуючи його на 70% ($p < 0,01$).

Слід зауважити, що резвератрол також проявляє виражену антиметастатичну активність відносно карциноми легені Льюїс. Однак на відміну від ОХУ резвератрол зменшує кількість легеневих метастазів у мишей з LLC на 40% при суттєво більших дозах [19].

Виявлена протипухлинна та антиметастатична активність може бути частково обумовлена цитотоксичною/цитостатичною дією ОХУ. У досліджах *in vitro* ОХУ пригнічував ріст пухлинних клітин LLC концентраційно-залежним чином (рис. 1). Така залежність носила моноекспоненційний характер, а концентрація, яка зумовлює зменшення кількості живих клітин на 50% (IC_{50}), становила $0,0580 \pm 0,0005$ мг/мл.

Таблиця

Протипухлинна та антиметастатична дія ОХУ відносно LLC

Група тварин	Об'єм первинної пухлини, мм ³	Кількість легеневих метастазів	Об'єм метастазів, мм ³
Контрольна	606,7 ± 127,9	38,3 ± 7,8	217,8 ± 42,9
ОХУ	379,3 ± 72,3*	21,8 ± 6,4*	65,1 ± 20,4*

Примітка. *Значуща ($p < 0,05$) відмінність від показника в контролі.

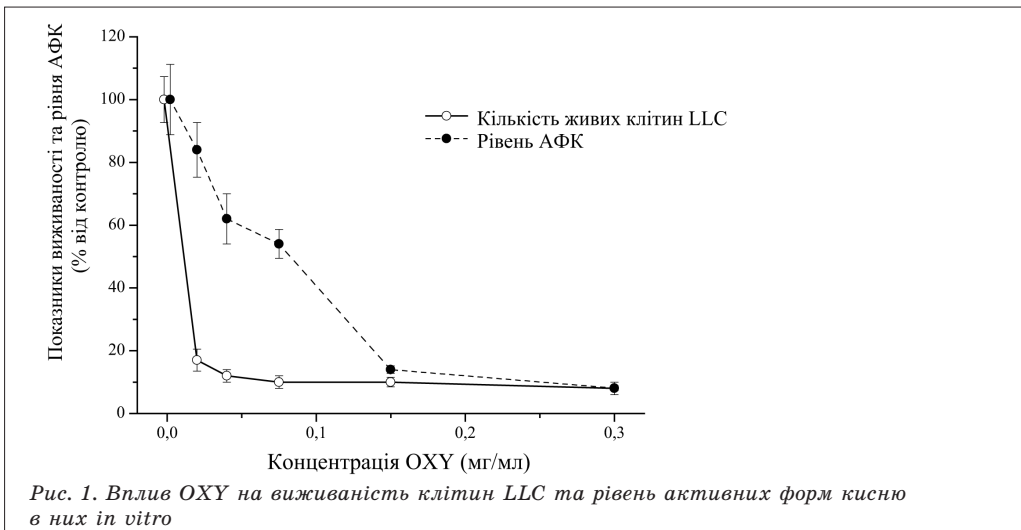


Рис. 1. Вплив ОХУ на виживаність клітин LLC та рівень активних форм кисню в них *in vitro*

Цитотоксична/цитостатична дія ОХУ корелювала з його вираженою антиоксидантною активністю, яка була виявлена в широкому діапазоні його водорозчинних концентрацій та носила концентраційно-залежний характер (рис. 1). При цьому звертає на себе увагу той факт, що ОХУ обумовлював суттєве зниження рівня АФК у клітинах LLC у діапазоні концентрацій, нижчих за IC_{50} .

Висока антиоксидантна активність ОХУ підтверджується й результатами досліджень його впливу на функціональний стан електрон-транспортного ланцюзі (ЕТЛ) мітохондрій пухлинних клітин *in vivo*.

Відомо, що в ссавців дихальний ланцюг мітохондрій містить чотири ферментні комплекси (комплекси I–IV) та два субстрати-посередники: коензим Q і цитохром *c*. $NADH^+$, H^+ та $FADH_2$ – проміжні продукти метаболізму, що забезпечують встановлення протонного електрохімічного градієнта в дихальному ланцюгу мітохондрій, який в кінцевій ланці використовується АТФ-синтазою (комплекс V) для продукції АТФ тільки на енергетичні потреби клітини [20].

Сьогодні можна вважати доведеним, що внесок мітохондрій у функцію клітини значно більший за роль у енергетичному метаболізмі. Вони генерують активні форми кисню та азоту, які є одними з ключових учасників регуляції внутрішньоклітинних процесів, що забезпечують виживаність, проліферативний та метастатичний потенціал пухлинних клітин. Особливу роль в такій регуляції відіграють радикали оксиду азоту ($NO\cdot$), що продукується мітохондріальною NO -синтазою (mNOS) [21]. У нормальних клітинах «фізіологічний рівень» $NO\cdot$ регулює процес дихання, модулюючи активність цитохромоксидази (комплекс IV). У пухлинних клітинах концентрація $NO\cdot$ радикалів зазвичай є вищою, ніж «фізіологічний рівень» (за рахунок підвищеного їх синтезу як mNOS, так і індукцйбельною NO -синтазою макрофагів, асоційованих в пухлинний процес), що призводить до нітрузування компонентів ЕТЛ мітохондрій і утворення нітрозильних комплексів гемового заліза (NO -комплекси).

Проведені дослідження показали, що в клітинах LLC уже на 10 добу росту пухлин відмічається утворення NO -комплексів гемового заліза, які повністю відсутні в м'язовій тканині інтактних тварин (рис. 2 А). У процесі росту LLC рівень NO -комплексів зростає до 14-ї доби на 200% ($p < 0,001$), і в подальші строки дослідження він практично не змінювався.

У той самий час рівень залізо-сірчаних центрів у ЕТЛ мітохондрій клітин пухлини, починаючи з 14-ї доби росту, був статистично достовірно нижчим на 53% порівняно з відповідним показником інтактного контролю (рис. 2 Б). Прогресивне накопичення нітрозильних комплексів та зменшення рівня залізо-сірчаних центрів свідчить про інгібуючий вплив $NO\cdot$ радикалів на I та II комплекси ЕТЛ мітохондрій пухлинних клітин, що може обумовлювати порушення синтезу АТФ.

Застосування тваринам ОХУ призводило до суттєвих змін рівня NO -комп-

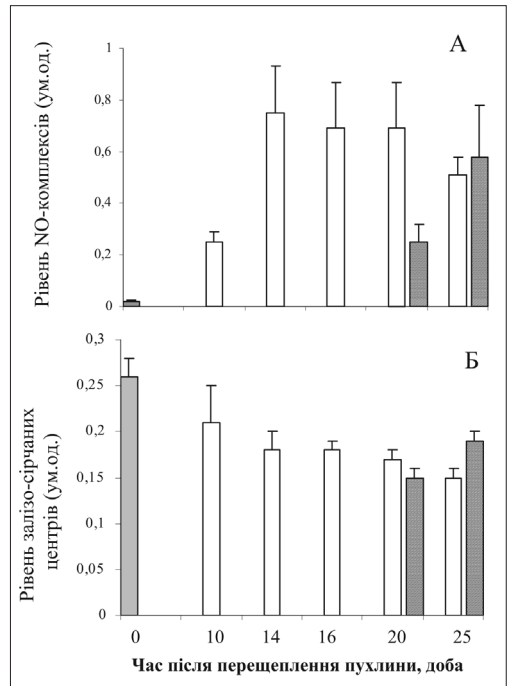


Рис. 2. Рівень NO -комплексів гемового заліза (А) і залізо-сірчаних центрів (Б) у пухлинній тканині на різних етапах росту LLC після терапії ОХУ (заштриховані стовпчики) та без терапії (білі стовпчики). Сірі стовпчики відповідають показникам м'язової тканини інтактних тварин

лексів гемового заліза в ЕТЛ мітохондрій пухлинних клітин. Згідно з отриманими даними, наприкінці терапії (20 доба росту пухлини) уміст NO-комплексів у тканині LLC достовірно знизився на 76 % ($p < 0,01$), що вказує на здатність ОХУ інактивувати NO радикали в пухлинах LLC. Проте тривалість такого ефекту була незначною, і через п'ять діб після закінчення терапії він повністю зникав (рис. 2 А).

Звертає увагу той факт, що суттєве зниження рівня NO-комплексів після терапії ОХУ (обумовлене, скоріше за все, його антиоксидантною активністю) не супроводжується підвищенням рівня залізо-сірчаних центрів (рис. 2 Б). Більше того, спостерігається тенденція до зниження рівня цих центрів і, як наслідок, погіршення функціонування ЕТЛ мітохондрій у пухлинній тканині, що може вносити свій вклад у протипухлинну активність ОХУ. Не виключено, що суттєве зменшення рівня NO радикалів після введення ОХУ порушує їхню регуляторну функцію відносно процесу клітинної проліферації. Крім того, зменшення рівня активних форм кисню та азоту знижує міграційний та метастатичний потенціал пухлинних клітин.

Таким чином, було показано, що пероральне курсове введення ОХУ у достатньо низьких дозах обумовлює його протипухлинну та антиметастатичну дію відносно карциноми легені Льюїс. Висока антиоксидантна активність ОХУ вносить свій вклад у реалізацію протипухлинної дії.

Висновки

1. Показано, що щоденне пероральне введення ОХУ протягом трьох тижнів у сумарній дозі 0,2 г/кг ваги тварини обумовлює його протипухлинну та антиметастатичну дію відносно карциноми легені Льюїс.
2. Дослідженнями *in vitro* виявлено цитотоксичну/цитостатичну дію ОХУ відносно клітин LLC, яка носила концентраційно-залежний характер та корелювала з його високою антиоксидантною активністю.
3. Відмічено, що рівень нітрозильних комплексів гемового заліза в тканині LLC наприкінці терапії ОХУ знизився на 76% ($p < 0,01$), що є проявом його антиоксидантної активності до реактивних форм кисню та азоту.

1. Hamanaka R. B. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling / Hamanaka R. B., Chandel N. S. // *Cur Opin Cell Biol.* – 2009. – V. 21. – P. 894–899.
2. Fiaschi T. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison / Fiaschi T., Chiarugi P. // *Int J. Cell Biol.* – 2012. – V. 2012. – P. 1–8.
3. Visconti R. New insights on oxidative stress in cancer / Visconti R., Grieco D. // *Curr Opin Drug Discov Devel.* – 2009. – V. 12. – P. 240–245.
4. Rautalahti M. Antioxidants and carcinogenesis / Rautalahti M., Huttunen J. // *Ann Med.* – 1994. – V. 26. – P. 435–441.
5. Pani G. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress / Pani G., Galeotti T., Chiarugi P. // *Cancer Metastasis Rev.* – 2010. – V. 29, № 2. – P. 351–78.
6. Ortega A. L. Oxidative and Nitrosative Stress in the Metastatic Microenvironment / A. L. Ortega, S. Mena and J. M. Estrela // *Cancers.* – 2010. – V. 2. – P. 274–304.
7. Kimura Y. New anticancer agents: *in vitro* and *in vivo* evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants / Kimura Y. // *In Vivo.* – 2005. – V. 19. – P. 37–60.
8. Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic / K. A. Roupe, C. M. Remsberg, J. A. Yanez [et al.] // *Current Clinical Pharmacology.* – 2006. – V. 1. – P. 81101.
9. Synthesis of novel trans-stilbene derivatives and evaluation of their potent antioxidant and neuroprotective effects / J. C. Jung, E. Lim, Y. Lee [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2009. – V. 4. – P. 3166–3174.
10. Radical-scavenging activity and mechanism of resveratrol-oriented analogues: influence of the solvent, radical, and substitution / Y. J. Shang, Y. P. Qian, X. D. Liu, et al. // *J. Org. Chem.* – 2009. – V. 74. – P. 5025–5031.
11. *In vitro* inhibition of Sphaeropsis sapinea by natural stilbenes / C. C. Celimene, D. R. Smith, R. A. Young [et al.] // *Phytochemistry.* – 2001. – V. 56. – P. 161–165.
12. Aburjai T. A. Anti-platelet stilbenes from aerial parts of Rheum palaestinum / Aburjai T. A. // *Phytochemistry.* – 2000. – V. 55. – P. 407–410.
13. Kimura Y. Antitumor activities of synthetic and natural stilbenes through antiangiogenic action / Kimura Y., Sumiyoshi M., Baba K. // *Cancer Sci.* – 2008. – V. 99. – P. 2083–2096.

14. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells / P. Lorenz, S. Roychowdhury, M. Engelmann [et al.] // Nitric Oxide.– 2003.– V. 9.– P. 64–76.
15. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia / S. A. Andrabi, M. G. Spina, P. Lorenz [et al.] // Brain Res.– 2004.– V. 1017.– P. 98–107.
16. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice / T. Chuanasa, J. Phromjai, V. Lipipun [et al.] // Antiviral Res.– 2008.– V. 80.– P. 62–70.
17. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells / Lorenz P., Roychowdhury S., Engelmann M. [et al.] // Nitric Oxide.– 2003.– V. 9, № 2.– P. 64–76.
18. Wang H. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader / Wang H., Joseph J. A. // Free Radic. Biol. Med.– 1999.– V. 27, № 5–6.– P. 612–616.
19. Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model / S. Busquets, E. Ametller, G. Fuster [et al.] // Cancer Lett.– 2007.– V. 245.– P. 144–148.
20. Gogvadze V. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? / Gogvadze V., Orrenius S. and Zhivotovsky B. // Trends Cell Biol.– 2008.– V. 18, № 4.– P. 165–173.
21. Ghafourifar P. Nitric oxide synthase activity in mitochondria / Ghafourifar P., Richter C. // FEBS Lett.– 1997.– V. 418.– P. 291–296.

И. В. Бойчук, О. Н. Пясковская, О. Р. Мельников, Д. Л. Колесник, Г. И. Соляник
Экспериментальное исследование противоопухолевой активности оксирезвератрола

Поиск новых эффективных противоопухолевых агентов является актуальной задачей современной онкологии. Цель исследования – изучить противоопухолевую активность оксирезвератрола (ОХУ) в отношении карциномы легкого Льюис (LLC) у мышей и установить возможную связь этой активности с его антиоксидантными свойствами. Было показано, что ежедневное пероральное введение ОХУ в течение трех недель в суммарной дозе 0,2 г/кг обуславливает противоопухолевый и антиметастатический эффект, проявляющийся в снижении объема первичной опухоли, количества и объема легочных метастазов на 37%, 42%, 70% соответственно. Цитотоксическое действие ОХУ и высокая антиоксидантная активность вносят вклад в противоопухолевую эффективность.

Ключевые слова: оксирезвератрол, карцинома легкого Льюис, антиоксидантная активность, активные формы кислорода

I. V. Boichuk, O. N. Pyaskovskaya, O. R. Melnikov, D. L. Kolesnik, G. I. Solyanik
Anticancer activity of oxyresveratrol: experimental study

Despite tremendous efforts that have been made in the search for novel drugs, cancer continues to be one of the major cause of human death. Hence, the development of new therapeutic strategies remains a high priority. Natural compounds represent an important source of biologically active substances with therapeutic values. At present great attention is attracted to naturally occurring hydroxystilbenes for their pleiotropic health beneficial effects including anti-oxidant, anti-inflammatory, cardioprotective and anticancer activities. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene; OXY) despite its high bioavailability and good solubility in aqueous solutions is yet little investigated. The objective of the study was to investigate anticancer activity of OXY against Lewis lung carcinoma (LLC) and to analyze the association of this activity with radical scavenger properties of OXY. It was shown that OXY inhibited LLC cell growth *in vitro* in concentration-dependent manner ($IC_{50} = 0,058 \pm 0.0005$ мг/мл). Cytotoxic/cytostatic activity of OXY correlated with its marked scavenging-antioxidant properties which was displayed in a wide range of water-soluble concentrations. Moreover OXY in concentrations considerably lower than IC_{50} caused five-fold reduction of ROS level in LLC cells. Daily per os administration of OXY into LLC bearing mice during three weeks in sufficiently low dose resulted in reducing tumor volume, number and volume of lung metastases on 37%, 42%, 70%, respectively ($p < 0,05$). Revealed antitumor activity was accompanied by both an essential decrease of the level of nitric oxide (NO) heme-iron complexes on 76% ($p < 0,01$) and downtrend of iron-sulfur clusters in electron transport chain of LLC cell mitochondria. The obtained data suggest the involvement of OXY cytotoxicity and high antioxidant activity in suppression of LLC growth and metastasis.

Key words: oxyresveratrol, Lewis lung carcinoma, antioxidant activity, reactive oxygen species (ROS)

Надійшла: 12.09.2013 р.

Контактна особа: Соляник Галина Іванівна, доктор фізико-математичних наук, відділ фармакокорекції онкогенезу, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України, буд. 45, вул. Васильківська, м. Київ, 03022.
Тел.: +38 0 44 257 94 16. Електронна пошта: gis@onconet.kiev.ua