

К 40-летию Института физиологически активных веществ РАН

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АЛАНТОЛАКТОНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА КЛЕТКАХ

С.Г. Клочков*, С.А. Пухов, М.Е. Неганова, Е.С. Дубровская, Л.В. Аникина, С.В. Афанасьева, А.В. Семаков

Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,
142432, Черноголовка Московской обл., Северный проезд, 1; *эл. почта: klochkov@ipac.ac.ru

Представлены результаты исследований *in vitro* цитотоксической активности природных сесквитерпеновых лактонов – алантолактона и изоалантолактона, содержащихся в растении девясил высокий (*Inula helenium*). Показано, что такие соединения проявляют токсичность по отношению к опухолевым клеточным линиям человека: MS, A549, HCT116, MCF7, RD и K562. Исследовано участие сигнального пути p53 в гибели опухолевых клеток, а также вклад образования активных форм кислорода (АФК) в процесс гибели клеток.

Ключевые слова: алантолактоны; цитотоксичность; опухолевые клеточные линии

DOI: 10.18097/BMCRM00047

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время интенсивно исследуются сесквитерпеновые лактоны растений семейства сложноцветных (*Asteraceae*) и механизмы их противоопухолевого действия. Противоопухолевая активность сесквитерпеновых лактонов реализуется, в основном, через индукцию апоптоза. Важную 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 [1].

Алантолактон (L1) и его изомер по положению двойной связи изоалантолактон (L2) – одни из самых известных сесквитерпеновых лактонов эвдесманового типа (рис. 1). Первые работы по алантолактону появились более 120 лет назад, но его структура была установлена лишь в 1964 году [2]. Наибольшее количество соединений L1 и L2 обнаружено в корнях растения *Inula helenium* – до 5%.

В настоящее время особенно подробно изучают противоопухолевую активность алантолактонов L1 и L2. Так, в обзоре [3] обобщена информация по описанию механизмов действия этих лактонов на апоптотические пути гибели опухолевых клеток: митохондриально- и АФК-зависимые, каспазный путь, а также с участием различных каспазных белков-регуляторов (NF-κB, PI3K-Akt, Nrf2 и др.).

Лактоны L1 и L2 были выделены нами из корней растения девясил высокий (*Inula helenium*) в виде эквимольной смеси, индивидуальные изомеры разделяли с помощью хроматографии на импрегнированном нитратом серебра силикагеле [4].

Активность основных сесквитерпеновых лактонов *I. helenium* мы оценивали по их способности оказывать токсическое действие на различные опухолевые клеточные линии, а также индуцировать или предотвращать окислительные повреждения липидов мембран клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение жизнеспособности опухолевых клеточных линий при воздействии исследуемыми соединениями

В качестве объектов для оценки цитотоксического действия природных алантолактонов использован ряд опухолевых клеточных линий, который составили адгезионные культуры аденокарциномы молочной железы (MCF7) и меланомы кожи (MS), линия аденокарциномы толстого кишечника (HCT116), экспрессирующая белок p53, и её вариант с нокаутом этого белка (HCT116 p53-/-), клетки лёгочной аденокарциномы (A549) и эмбриональная рабдомиосаркома (RD), а также суспензионная культура клеток миелоидного лейкоза (K562). Культуры

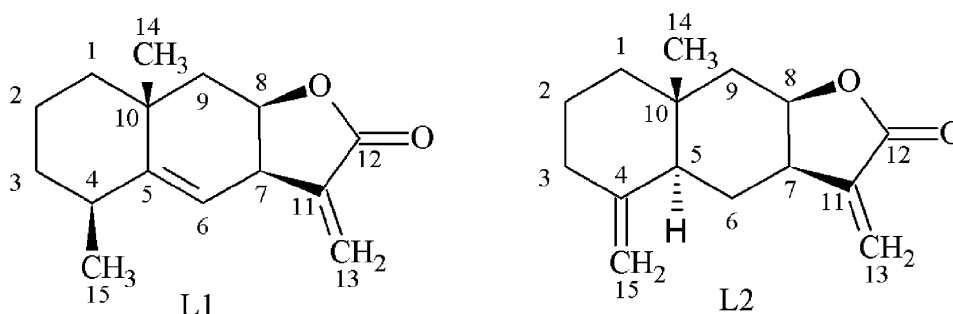


Рисунок 1. Структуры изомерных алантолактонов.



клеточных линий были предоставлены Лабораторией генетики опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза “РОНЦ им. Н.Н. Блохина”, а также ИНЦ РАН.

Культуры клеток человека MCF7 выращивали в питательной среде EMEM, MS и K562 в RPMI-1640, HCT116 и HCT116 p53-/- культивировали в DMEM. В соответствующую для клеток среду добавляли эмбриональную телячью сыворотку (10% по объёму), L-глутамин (конечная концентрация составляла 2 мМ), а в качестве антибиотика-антимикотика использовали гентамицин (1% по объёму). Культивирование проводили при 37°C в увлажнённой атмосфере CO₂ (5%).

Для определения жизнеспособности опухолевых линий MCF7, MS и HCT116 (HCT116 p53-/-) по МТТ-тесту [5] клетки сеяли в 96-луночный планшет в количестве 1×10⁴ клеток/200 мкл полной питательной среды и культивировали при 37°C в атмосфере CO₂ (5%). После 12 ч инкубации к культурам клеток были добавлены различные концентрации тестируемых соединений (100.00, 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.12 и 1.56 мкМ), и далее клетки культивировали в тех же условиях 48 ч. Для каждой концентрации эксперимент включал три повторения. Все соединения растворяли в ДМСО, конечное содержание ДМСО в лунке не превышало 1% и не оказывало токсичного действия на клетки. В контрольные лунки был добавлен растворитель в объёме 1%. После инкубации в каждую лунку было добавлено 20 мкл МТТ (5 мг/мл), и планшеты дополнительно инкубировали в течение 2 ч. Далее из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора определяли оптическую плотность при 530 нм, за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.0. За 100% принимали выживаемость клеток, инкубированных без исследуемых соединений (контроль).

Жизнеспособность клеток линии K562 была определена с использованием ресазурина. После инкубации с соединениями в каждую лунку было добавлено 22 мкл ресазурина с конечной концентрацией 50 мкМ. Планшеты инкубировали в течение 2 ч. Флуоресценцию восстановленного красителя определяли с помощью планшетного анализатора (возбуждение при 530 нм, эмиссия при 590 нм).

Оптическую плотность и флуоресценцию клеточного материала определяли с помощью планшетного анализатора Victor³ (“Perkin Elmer”, США).

Для предобработки *N*-ацетилцистеином в лунки с инкубированными клетками добавляли 3 мкл NAC (5 мМ) в соответствующей питательной среде и инкубировали в течение 4 ч, после этого вносили исследуемые соединения и определяли выживаемость клеток с помощью МТТ-теста.

Значения концентраций, вызывающих 50%-ое ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), средние значения, средняя ошибка эксперимента и среднеквадратичные отклонения, а также определение статистически значимой достоверности различий между группами данных рассчитывались с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7. Статистически значимыми считали различия по *t*-критерию Стьюдента при *p*<0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В качестве количественного критерия цитотоксичности тестируемых соединений был использован индекс IC₅₀ (табл. 1).

Алантолактон L1 показал приблизительно равное цитотоксическое действие по отношению к линиям HCT116, MCF7 и RD и оказался менее токсичным к клеткам A549 и MS (концентрационные кривые для некоторых линий приведены на рисунке 2).

Изоалантолактон L2 показал в МТТ-тесте более высокую цитотоксическую активность по сравнению с алантолактоном (концентрационные кривые, рисунок 3).

Для определения селективности алантолактонов к опухолевым клеткам в качестве нормальной линии клеток человека была выбрана псевдонормальная линия эмбрионального почечного эпителия HEK293. Селективность действия у исследованных

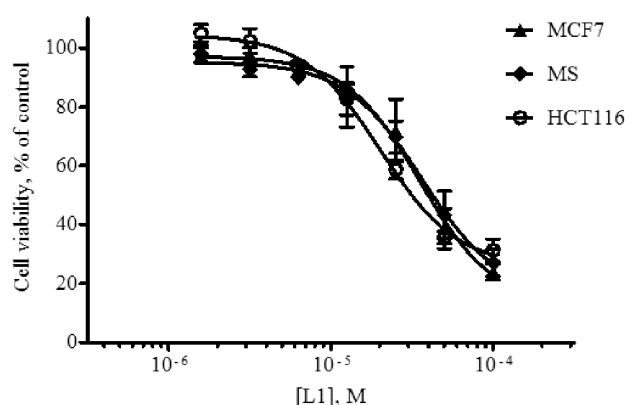


Рисунок 2. Дозозависимые кривые для алантолактона L1 при воздействии на линии опухолевых клеток, полученные в результате МТТ-теста (48 ч экспозиции, *n*=3, планки погрешностей означают ±SD от значения).

Таблица 1. Цитотоксичность алантолактонов в МТТ-тесте

Шифр	IC ₅₀ , мкМ					
	MS	A549	HCT116	MCF7	RD	HEK293
L1	44.38±0.02	32.04±3.24	11.37±0.27	17.51±0.60	10.37±0.79	74.03±0.51
L2	22.7±0.03	36.73±1.43	12.92±0.04	33.01±0.3	5.48±0.20	36.47±0.07

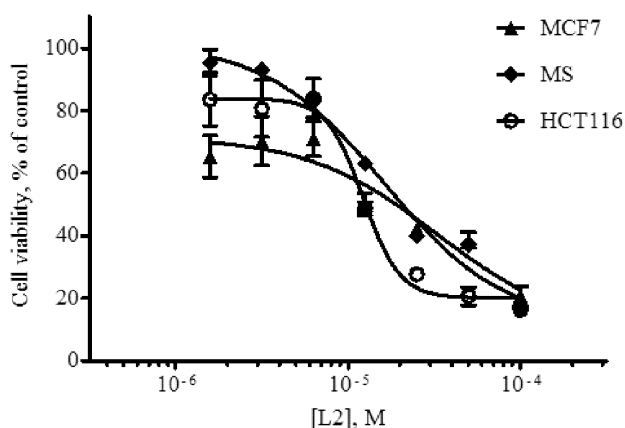


Рисунок 3. Дозозависимые кривые для изоалантолактона **L2** при воздействии на линии клеток, полученные в результате МТТ-теста (48 ч экспозиции, $n=3$, планки погрешностей означают $\pm SD$ от значения).

сесквитерпеновых лактонов выражена незначительно. Так, величина IC_{50} алантолактона по отношению к НЕК293 в 7 раз выше, чем его IC_{50} по отношению к НСТ116, IC_{50} изоалантолактона – в 7 раз выше, чем его IC_{50} по отношению к культуре опухолевых клеток RD.

Для оценки действия лактонов на суспензионные опухолевые клетки был выполнен эксперимент на линии K562 (хронический миелоидный лейкоз). Был использован тест с резазурином – натриевой солью 7-гидрокси-3*H*-феноксазин-3-он-10-оксида – водорастворимым прижизненным красителем. Резазурин может восстанавливаться более широким спектром ферментов в отличие от МТТ. Кроме митохондриальных дегидрогеназ, он восстанавливается также цитохромами и дегидрогеназами цитоплазмы клетки [6].

Полученные данные по определению жизнеспособности клеток лейкоза позволяют предположить общую высокую токсичность этих соединений: значение IC_{50} составляло 9.64 ± 0.05 мкМ для алантолактона и 6.27 ± 0.03 для изоалантолактона.

Исследование участия сигнального пути p53 в гибели опухолевых клеток

Для определения участия эндогенного белка p53 в формировании цитотоксической активности исследуемых соединений использовали клеточную линию аденокарциномы толстого кишечника человека НСТ116 wt p53, экспрессирующую белок p53, и её вариант с нокаутом этого белка (НСТ116 p53^{-/-}). Для оценки цитотоксичности лактонов применяли МТТ-тест, количественной оценкой служил индекс IC_{50} (табл. 2).

Таблица 2. Токсичность соединений в отношении опухолевых клеточных линий НСТ116 и НСТ116 p53 (IC_{50} , мкМ)

Шифр	Клеточная линия	
	НСТ116 wt p53	НСТ116 p53 ^{-/-}
L1	38.09 ± 0.03	37.60 ± 0.07
L2	12.92 ± 0.04	23.89 ± 0.04

Токсичность изоалантолактона для линии клеток аденокарциномы толстого кишечника человека НСТ116 wt p53 (экспрессирующей белок p53) превышает токсичность для линии с нокаутом этого белка почти в 2 раза, в то время как для алантолактона цитотоксичность в отношении обеих линий клеток одинакова.

Предобработка N-ацетилцистеином

Для определения роли окислительного стресса в процессе ингибирования роста клеточной линии аденокарциномы молочной железы при действии изоалантолактона исследовали цитотоксичность в присутствии N-ацетилцистеина. Для этого в лунки с инкубированными клетками добавляли 3 мкл N-ацетилцистеина (5 мМ) в соответствующей питательной среде и инкубировали в течение 4 ч, после этого вносили соединение и вычисляли значение IC_{50} . Оказалось, что предварительная обработка N-ацетилцистеином снижает токсический эффект лактона **L1** (табл. 3).

Таблица 3. Выживаемость клеток МСF7, MS и НСТ116 при действии лактонов **L1** и **L2** (100 мкМ) в присутствии N-ацетилцистеина (НАС) и без него по результатам МТТ-теста (48 ч экспозиции, $n=3$)

Шифр	Выживаемость клеток (% от контроля)*	
	Без НАС	С НАС
МСF7		
L1	24.0 ± 2.6	70.3 ± 13.4
MS		
L1	27.0 ± 4.6	64.3 ± 23.2
L2	16.3 ± 0.6	63.3 ± 5.9
НСТ116		
L1	31.3 ± 3.8	53.3 ± 4.2
L2	16.3 ± 1.2	35.7 ± 2.1

Примечание: * - различия статистически достоверны, $p < 0.05$.

Аналогичные результаты наблюдались и в случае оценки токсичности обоих алантолактонов в отношении клеток MS.

В эксперименте с клетками аденокарциномы НСТ116 в присутствии N-ацетилцистеина лактоны **L1** и **L2** показали снижение эффективности действия.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что эффективность большинства современных противоопухолевых препаратов связана с их способностью индуцировать гибель опухолевых клеток по пути апоптоза, в биохимической активации которого участвуют сигнальные пути белка p53 [7]. В связи с этим актуальным является поиск соединений, которые способны индуцировать в опухолевых клетках апоптоз в обход сигнальных путей белка p53. На основании проведенных экспериментов можно сделать вывод, что сигнальный путь p53 в механизме цитотоксичности лактона **L2**

является одним из основополагающих, а его изомер – алантолактон **L1** индуцирует гибель клеток в обход сигнальных путей белка p53.

Важную роль в индукции апоптоза играют активные АФК [8]. Известный ингибитор образования АФК – *N*-ацетилцистеин – был использован для выяснения роли вклада окислительного стресса, вызываемого действием соединений **L1** и **L2**, в механизм гибели опухолевых клеток. Ранее в работе [9] было показано, что предварительная обработка различных опухолевых клеточных линий *N*-ацетилцистеином полностью сохраняет жизнеспособность клеток, указывая, что цитотоксическое действие изоалантолактона на клетки осуществляется в основном через генерацию АФК. По результатам проведенных экспериментов можно предположить, что в основе цитотоксической активности алантолактонов лежат механизмы, связанные не только с продукцией свободных радикалов и влиянием на окислительное повреждение липидов. В большинстве случаев антиоксидантный потенциал этих соединений не препятствует проявлению их цитотоксичности по отношению к клеточной линии НСТ116. Участие АФК-зависимых механизмов в гибели клеток более выражено для линий MCF7 и MS, для которых цитотоксический эффект исследованных соединений в большей степени может быть предотвращён присутствием АФК-акцептора. Для клеток линии НСТ116 такой закономерности не наблюдается.

Пятичленные гетероциклы алантолактонов структурно родственны шестичленным лактонным циклам камптотецина, топотекана, иринотекана и других известных ингибиторов топоизомеразы I. Сесквитерпеновые лактоны обычно обладают антиоксидантным действием, а также проявляют хелатирующие и антирадикальные свойства [10]. Однако аланто- и изоалантолактоны в высокой концентрации (100 мкМ) обладают прооксидантными свойствами, что обнаружено методом ингибирования перекисного окисления липидов, индуцируемого ионами Fe³⁺. Тем не менее при более низких концентрациях они оказывают защитное действие на клетки. Это показано при индукции окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода (60 мкМ), и при токсическом стрессе под действием высокой дозы глутамата (30 мМ) на культуре клеток нейробластомы человека SK-N-MC.

Наше исследование показало, что эти соединения перспективны для создания на их основе высокоэффективных антинеопластов.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования ИФАВ РАН. Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0018.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhang, S., Won, Y.K., Ong, C.N., Shen, H.M. (2005) Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents.* 5(3), 239–249. DOI: 10.2174/1568011053765976
2. Marshall, J.A., Cohen, N. (1964) The structure of alantolactone. *The Journal of Organic Chemistry.* 29(12), 3727–3729. DOI: 10.1021/jo01035a527
3. Rasul, M., Khan, M., Ali, J., Li, X., Li, A. (2013) Targeting apoptosis pathways in cancer with alantolactone and isoalantolactone. *Scientific World Journal.* 5. Art. ID 248532. DOI: 10.1155/2013/248532
4. Klochkov, S.G., Afanas'eva, S.V., Pushin, A.N. (2006) Acidic isomerization of alantolactone derivatives. *Chemistry of Natural Compounds.* 42(4), 400–406. DOI: 10.1007/s10600-006-0166-7
5. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 65(1–2), 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
6. Rampersad, S.N. (2012) Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors.* 12(9), 12347–12360. DOI: 10.3390/s120912347
7. Amaral, J.D., Xavier, J.M., Steer, C.J., Rodrigues, C.M. (2010) The role of p53 in apoptosis. *Discovery Medicine.* 45(9), 145–152.
8. Cui, L., Bu, W., Song, J., Feng, L., Xu, T., Liu, D., Ding, W., Wang, J., Li, C., Ma, B., Luo, Y., Jiang, Z., Wang, C., Chen, J., Hou, J., Yan, H., Yang, L., Jia, X. (2018) Apoptosis induction by alantolactone in breast cancer MDA-MB-231 cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrion-dependent pathway. *Archives of Pharmacal Research.* 41(3), 299–313. DOI: 10.1007/s12272-017-0990-2
9. Rasul, A., Di, J., Millimouno, F.M., Malhi, M., Tsuji, I., Ali, M., Li, J., Li, X. (2013) Reactive oxygen species mediate isoalantolactone-induced apoptosis in human prostate cancer cells. *Molecules.* 18(8), 9382–9396. DOI: 10.3390/molecules18089382
10. Neganova, M.E., Afanas'eva, S.V., Klochkov, S.G., Shevtsova, E.F. (2012) Mechanisms of antioxidant effect of natural sesquiterpene lactone and alkaloid derivatives. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 152(6), 720–722. DOI: 10.1007/s10517-012-1615-x

Поступила: 15. 06. 2018.
Принята к публикации: 10. 09. 2018.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALANTOLACTONES IN EXPERIMENTS ON CELLS

S.G. Klochkov, S.A. Pukhov, M.E. Neganova, E.S. Dubrovskaya, L.A. Anikina, S.V. Afanasyeva, A.V. Semakov*

Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,
1 Severny proezd, Moscow region, Chernogolovka, 142432 Russia; *e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

The results of in vitro studies demonstrate cytotoxic activity alantolactone and isoalantolactone, presented in the elecampane plant (*Inula helenium*) of the natural sesquiterpene lactones. These compounds show toxicity against human cancer cell lines: MS, A549, HCT116, MCF7, RD and K562. The involvement of the p53 signaling pathway in the death of tumor cells, as well as the contribution of reactive oxygen species (ROS) formation during cell death, was studied.

Key words: alantolactones; cytotoxicity; cancer cell lines

ACKNOWLEDGMENTS

The equipment of Centre of collective usage was used when carrying out study. The work is carried out within the framework of the Government task 0090-2017-0018.