

УДК 577.29 57.085.23 547.92

П. А. КИСЕЛЕВ, О. В. ПАНИБРАТ, А. Г. СЫСА, М. В. АНИСОВИЧ,
В. Н. ЖАБИНСКИЙ, академик В. А. ХРИПАЧ

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС КАК ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ ПУТЕЙ АНТИРАКОВОГО ДЕЙСТВИЯ БРАССИНОСТЕРОИДОВ

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

kiselev@iboch.bas-net.by; panisestra@tut.by; aliaksei.sysa@gmail.com; solus@list.ru; vz@iboch.bas-net.by;
khripach@iboch.bas-net.by

В настоящей работе нами впервые охарактеризовано влияние брассиностероидов 24-эпibrassinoliда (24-ЭБ) и 28-гомокастастерона (28-ГКС), а также их стереоизомеров (22S,23S)-24-гомобрассинолида ((22S,23S)-24-ЭБ) и (22S,23S)-28-гомокастастерона ((22S,23S)-28-ГКС) на уровень активных форм кислорода в раковой клеточной линии A549 (аденокарцинома легких), а полученные результаты сопоставлены с данными по их антипролиферативной активности.

Оказываемый эффект зависел от структуры боковой цепи и был более выражен в случае SS-ориентации гидроксильных групп в положении C22 и C23 ((22S,23S)-28-гомокастастерон). Это соединение обладало и большей антипролиферативной активностью, что позволяет говорить о возможной взаимосвязи между индукцией активированных форм кислорода и цитотоксичностью исследованных веществ.

Результаты настоящей работы позволяют допустить, что один из путей влияния брассиностероидов на раковые клетки может заключаться в иницировании окислительного стресса, что приводит к гибели последних по АФК-зависимым механизмам.

Ключевые слова: брассиностероиды, окислительный стресс, внутриклеточный уровень активных форм кислорода, антипролиферативная активность.

P. A. KISELEV, O. V. PANIBRAT, A. G. SYSA, M. V. ANISOVICH, V. N. ZHABINSKII, V. A. KHRIPACH

OXIDATIVE STRESS AS ONE OF THE POSSIBLE WAYS OF ANTICANCER EFFECTS OF BRASSINOSTEROIDS

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

kiselev@iboch.bas-net.by; panisestra@tut.by; aliaksei.sysa@gmail.com; solus@list.ru; vz@iboch.bas-net.by;
khripach@iboch.bas-net.by

In this paper, the effect of brassinosteroids – 24-epibrassinolide and 28-homocastasterone, as well as their stereoisomers – (22S,23S)-24-homobrassinolide and (22S,23S)-28-homocastasterone on the level of reactive oxygen species in cancer cell line A549 (lung adenocarcinoma) has been characterized for the first time, and the results obtained have been compared with the data on their antiproliferative activity.

The effect depended on the structure of the side chain and was more pronounced in the case of the SS-orientation of hydroxyl groups at the C22 and C23 positions ((22S,23S)-28-homocastasterone). This compound also had greater antiproliferative activity, which suggested a possible relationship between the induction of activated oxygen species and cytotoxicity of the substances.

The results of this work allow one to assume that one of the ways of the effect of brassinosteroids on cancer cells may lie in the initiation of oxidative stress, which leads to the death of cancer cells through ROS-dependent mechanisms.

Keywords: brassinosteroids, oxidative stress, intracellular level of reactive oxygen species, antiproliferative activity.

Введение. Несмотря на существенные достижения в области онкологии количество ежегодных смертельных исходов достигает 8 миллионов и имеет тенденцию к росту [1; 2]. Это обуславливает актуальность поиска новых химиотерапевтических средств и установления механизма их действия. К сожалению, абсолютное большинство известных антиопухолевых препаратов обладают выраженными побочными действиями, что ограничивает их применение [3; 4]. В связи с этим обращают на себя внимание стероиды и их производные, в т. ч. природные и синтетиче-

ские brassinостероиды [5–10]. Brassinостероиды (БС) относятся к группе растительных гормонов, сходных с таковыми животных и человека как по своей структуре, так и по выполняемым функциям: они регулируют в растениях экспрессию генов, влияют на протекание процессов метаболизма, рост и дифференцировку клеток [5; 9]. В последние годы их рассматривают в качестве потенциальных антиканцерогенных агентов. Предпосылками для этого являются антипролиферативная активность brassinостероидов, показанная на ряде раковых клеточных линий, их способность к ингибированию ангиогенеза и низкая цитотоксичность в отношении нормальных клеток [6–10]. Причем более высокая эффективность обнаружена для синтетических производных brassinостероидов. Считается, что БС участвуют в регуляции клеточного цикла и индуцируют апоптоз по независимому от андрогенового и эстрогенового стероидных рецепторов пути [9]. Однако в целом молекулярный механизм действия стероидов остается во многом неясным. В настоящей работе нами впервые охарактеризовано влияние brassinостероидов 24-эпи-brassinанолида (24-ЭБ) и 28-гомокастастерона (28-ГКС), а также их стереоизомеров (22S,23S)-24-эпи-brassinанолида ((22S,23S)-24-ЭБ) и (22S,23S)-28-гомокастастерона ((22S,23S)-28-ГКС) (структура показана на рис. 1) на уровень активных форм кислорода в раковой клеточной линии A549 (аденокарцинома легких), а полученные результаты сопоставлены с данными по их антипролиферативной активности.

Материалы и методы исследования. *Культивирование клеток.* Клеточную культуру A549 культивировали в среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), 4 mM L-глутамина, антибиотиков пенициллина (100 ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и антимикотика Fungizone® (25 мкг/мл) (Invitrogen, США), при 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Клеточная культура поддерживалась на стадии логарифмического роста путем рутинной пересадки трижды в неделю. Контроль адгезии клеток на подложке, роста и возможной контаминации производили визуально с помощью инвентированного микроскопа АУ-12 (ЛОМО, Россия).

Характеристика антипролиферативной активности. Для определения антипролиферативной активности использовали МТТ-тест [11]. Клетки опухолевой линии A549 (карцинома легкого) помещали на 96-луночный планшет (Sarstedt, Германия) в концентрации $1 \cdot 10^4$ клеток/луночка и инкубировали в среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и антибиотиков пенициллина (100 ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и антимикотика Fungizone® (25 мкг/мл) (Invitrogen, США). Через 24 ч инкубирования, при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂, среду сливали и заменяли ее на среду, содержащую brassinостероиды в концентрациях от 1 до 200 мкМ. Контрольные клетки инкубировали в среде с 1 % DMSO. Через 24 ч инкубации с brassinостероидами в среду добавляли соль 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (Carl Roth, США) в концентрации 5 мг/мл. Через 4 ч экспозиции при 37 °C темно-фиолетовые гранулы формаза растворяли в диметилсульфоксиде. Количество восстановленного продукта измеряли фотометрически при длине волны 570 нм на планшетном анализаторе АИФ-М/340. Проллиферативную активность клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывали по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} / \text{ОП контр. лунок}) \cdot 100 \%$, где ОП – оптическая плотность.

Определение внутриклеточного уровня активных форм кислорода. Для определения уровня внутриклеточных АФК использовали зонд 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (DCF-DA, ИБОХ НАН Беларуси).

Клетки растили в 6-луночных планшетах (Sarstedt, Германия) и при достижении ими 70 % конfluентности проводили 2-часовую инкубацию с brassinостероидами в концентрациях 10, 30, 70, 100 мкМ и DCF-DA в концентрации 10 мкМ, добавленными одновременно, в 5 mM PBS, pH 7,4. Контрольные клетки инкубировали с 10 мкМ DCF-DA и 1 % DMSO. Затем клетки снимали 0,25 %-ным раствором трипсин/EDTA. Уровень АФК определяли с помощью проточной цитометрии на приборе Beckman Coulter Cytomics FC 500 ($\lambda_{\text{ex}} = 495$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 520$ нм).

Результаты и их обсуждение. В работе использовали brassinостероиды, полученные в соответствии с [12]. Как видно из рис. 1, использованные соединения (1), (2) содержали 6-кето-функцию в кольце В стероидного скелета, а соединения (3), (4) – 6-оксо-7-оксалактонную струк-

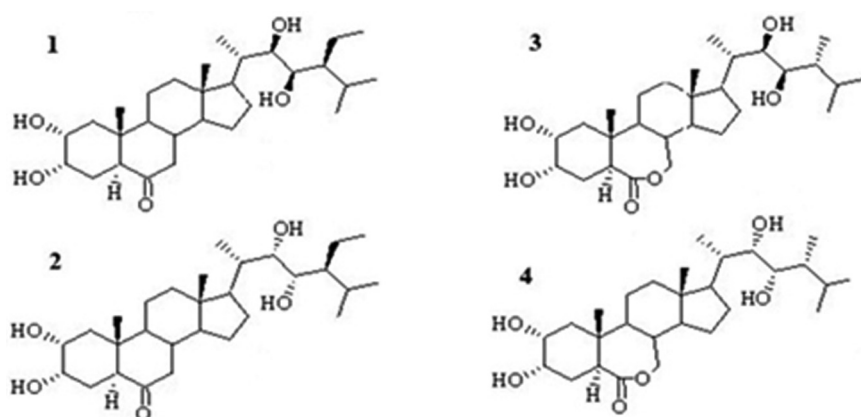


Рис. 1. Структура исследованных соединений: 1 – 28-гомокастастерон, 2 – (22S,23S)-28-гомокастастерон, 3 – 24-эпи-брасинолид, 4 – (22S,23S)-24-эпибрасинолид

туру. Кроме того, брасиностероиды отличались строением боковой цепи. Так, природный 24-эпибрасинолид содержит в положении C24 метильную группу, в то время как у 28-гомокастастерона в этом положении находится этильный заместитель.

Отличительная особенность синтетических производных 24-эпибрасинолида (4) и 28-гомокастастерона (2) заключалась в S-конфигурации C22 и C23 атомов углерода, содержащих гидроксильные группы.

Предварительная оценка антиканцерогенной эффективности, поиск соответствующих веществ и выяснение механизма их действия часто базируются на характеристике их влияния на свойства культур опухолевых клеток. В случае природных и синтетических брасиностероидов надежно документирована их антипролиферативная активность в отношении ряда раковых клеток [6–10]. При этом, исходя из идеологии близости структур и функций стероидных регуляторов в растительных и животных системах, в первую очередь речь идет об андроген- и эстроген-зависимых клеточных линиях. Меньше известно о взаимосвязи между структурой соединений и их влиянием на поведение эстроген-независимых органов и тканей. Отправной точкой настоящей работы стала оценка воздействия природных брасиностероидов и их синтетических аналогов на пролиферацию опухолевой клеточной линии A549 (аденокарцинома легких). Для этого использован ставший уже классическим МТТ-тест (рис. 2). Как видно из рис. 2, исследованные соединения обладают достоверной антипролиферативной активностью в отношении клеточной линии A549.

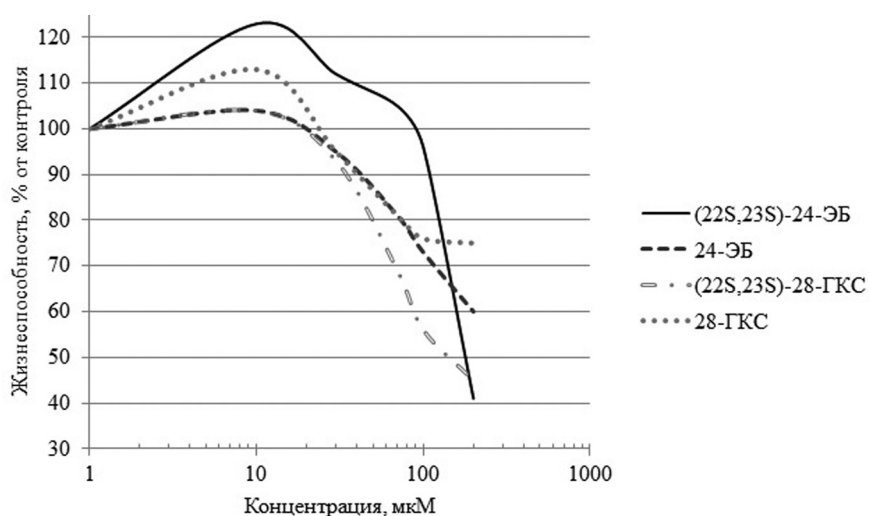


Рис. 2. Зависимость влияния брасиностероидов на пролиферацию раковых клеток (линия A549) от концентрации изученных соединений

Из рис. 2 следует, что в целом соединения с SS-ориентацией гидроксильных групп в положении C22 и C23 ((22S,23S)-28-гомокастастерон и (22S,23S)-24-эпибрассинолид) являются более активными в подавлении клеточной пролиферации, чем соединения с RR-ориентацией гидроксильных групп в указанном положении боковой цепи. Диапазон IC_{50} для SS-стереоизомеров brassinosterоидов составил 130–200 мкМ. Наряду с (22S,23S)-28-гомокастастероном антипролиферативная активность при высоких концентрациях наблюдается в случае (22S,23S)-24-эпибрассинолида. Другой важной особенностью brassinosterоидов является тот факт, что соединения с 6-кетофункцией проявляют более выраженное цитостатическое влияние, чем соединения с 6-оксо-7-оксафункцией.

Полученные результаты хорошо согласуются с появившимися в последние 2–3 года данными о том, что 28-гомокастастерон влияет на жизнеспособность опухолевых клеток лейкемии (линия СЕМ, IC_{50} составляет 13 мкМ) и миеломы (линия RPMI 8226) [5; 6; 9].

На следующем этапе работы методом проточной флуоресцентной цитометрии был определен внутриклеточный уровень активных форм кислорода в отсутствие и в присутствии исследуемых brassinosterоидов. Для этой цели в качестве зонда использован 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат, который после попадания в клетку гидролизруется эстеразами и окисляется АФК до флуоресцирующего продукта – 2',7'-дихлорфлуоресцеина, параметры свечения которого отражают уровень внутриклеточных активных форм кислорода [13].

На рис. 3 представлена зависимость среднего значения флуоресценции DCF от концентрации brassinosterоидов. Для всех исследованных соединений, кроме 24-эпибрассинолида, максимально эффективная концентрация составила 30 мкМ, дальнейшее увеличение концентрации стероидов приводило либо к стабилизации эффекта (28-гомокастастерон), либо к его снижению ((22S,23S)-28-гомокастастерон и (22S,23S)-24-эпибрассинолид).

Отметим, что максимальная эффективность, как и в случае с подавлением клеточной пролиферации, найдена для (22S,23S)-28-гомокастастерона, для которого при его 30-микромольной концентрации зарегистрировано по сравнению с контролем почти 6-кратное увеличение интенсивности свечения.

Выяснение роли активных форм кислорода в функционировании живых организмов имеет вековую историю. Сегодня не вызывает удивления способность АФК как к отрицательному, так и положительному влиянию на процессы жизнедеятельности. Конкретный эффект определяется многими факторами, включая состав и количество АФК, тип и состояние клетки, продолжительность воздействия и т. д. [14; 15].

В настоящей работе нами впервые показана возможность генерирования АФК в раковой клеточной линии А549 под действием brassinosterоидов и их стереоизомеров. Оказываемый эффект зависел от структуры боковой цепи и был более выражен в случае SS-ориентации гидроксильных групп в положении C22 и C23 ((22S,23S)-28-гомокастастерон). Это соединение обладало и большей анти-

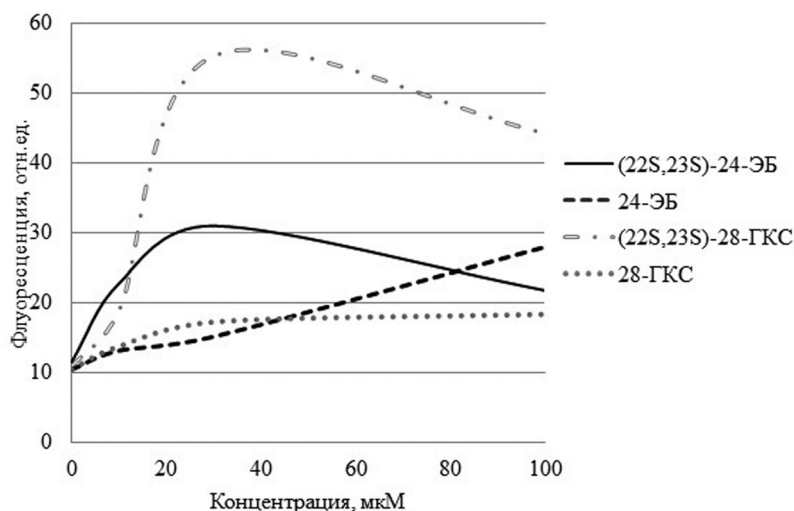


Рис. 3. Зависимость средней интенсивности флуоресценции DCF в клетках от концентрации brassinosterоидов

пролиферативной активностью, что позволяет говорить о возможной взаимосвязи между индукцией активированных форм кислорода и цитотоксичностью исследованных веществ.

Наконец отметим, что к настоящему времени накоплен значительный опыт, позволяющий рассматривать brassinостероиды в качестве потенциальных антиопухолевых средств с низкой цитотоксичностью в отношении нормальных клеток. Однако ситуация серьезно осложнена наличием у brassinостероидов широкого спектра еще до конца не ясных путей их воздействия на клеточные события животных и человека.

Результаты настоящей работы позволяют допустить, что один из путей влияния brassinостероидов на раковые клетки может заключаться в иницировании окислительного стресса, что приводит к гибели последних по АФК-зависимым механизмам.

Список использованной литературы

1. WHO Cancer: Factsheet N. 297, February 2012.
2. Siegel, R. Cancer statistics / R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal // *Cancer J. Clin.* – 2012. – Vol. 62(1). – P. 10–29.
3. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy / J. J. Monsuez [et al.] // *Int. J. Cardiol.* 2010. Vol. 144. P. 3–15.
4. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer / P. Mroz [et al.] // *Cancers.* – 2011. – Vol. 3. – P. 2516–2539.
5. *Khripach, V. A. Brassinosteroids. A new class of plant hormones / V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, A. de Groot. – San Diego: Academic Press, 1999.*
6. *Zhabinskii, N. Steroid plant hormones: Effects outside plant kingdom / N. Zhabinskii, N. Khripach, V. Khripach // Steroids. – 2015. – Vol. 97. – P. 87–97.*
7. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids / J. Malikova [et al.] // *Phytochemistry.* – 2008. – Vol. 69. – P. 418–426.
8. Toxicity of (22R,23R)-22,23-dihydroxystigmastane derivatives to cultured cancer cells / A. Misharina [et al.] // *Steroids.* – 2010. – Vol. 75. – P. 287–294.
9. Anticancer Activities of Brassinosteroids / L. Hoffmannová [et al.] // *Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health.* – 2012. – P. 84–93.
10. Взаимосвязь структура-функция при оценке антипролиферативной активности brassinостероидов в отношении раковых клеток молочной железы MCF-7 / A. G. Sysa [et al.] // *Vestnik Found Fund Res.* – 2011. – Vol. 5. – P. 56–63.
11. *Van Meerloo, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay / J. Van Meerloo, G. J. Kaspers, J. Cloos // Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 731. – P. 237–245.
12. Новый синтез (22S,23S)-гомобразинолида / А. А. Ахрем [и др.] // *Докл. Академии наук СССР.* – 1985. – Т. 283. – С. 130–133.
13. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced cytochrome P450s alter the formation of reactive oxygen species in liver cells / S. Knerr [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2006. – Vol. 50. – P. 378–384.
14. *Eruslanov, E. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry / E. Eruslanov, S. Kusmartsev // Methods Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 594. – P. 57–72.
15. Reactive Oxygen Species in Vascular Formation and Development / Y. Zhou [et al.] // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2013. – Vol. 2. – P. 10–25.

Поступило в редакцию 14.12.2015