

# ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-11-15-19

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО, ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО И АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА КАШТАНА КОНСКОГО С 50 % СОДЕРЖАНИЕМ ЭСЦИНА

Т. А. Федотчева<sup>1, 2</sup>, А. И. Матюшин<sup>1</sup>, А. Н. Усенко<sup>1</sup>,  
О. П. Шейченко<sup>2</sup>, А. Ю. Радимич<sup>2</sup>, В. И. Шейченко<sup>2</sup>,  
Н. И. Федотчева<sup>3</sup>, Н. Л. Шимановский<sup>1</sup>

Проведена сравнительная оценка токсического действия на опухолевые клетки DU145 (рак предстательной железы человека) и фибробласты кожи крыс экстракта каштана конского, содержащего 50 % бета-эсцина с синтетическим химически чистым эсцином (“Sigma”, США). Показано, что экстракт каштана конского в концентрации 0,3 мг/мл подавляет жизнеспособность опухолевых клеток на 16 % больше, чем эсцин в такой же концентрации ( $p < 0,01$ ). Сравнение токсического действия экстракта конского каштана (ЭКК) и эсцина на фибробласты кожи крыс показало, что ЭКК не влияет, а эсцин ингибирует жизнеспособность фибробластов (на 29 %,  $p < 0,01$ , инкубация 24 ч). ЭКК снижает цитотоксичность цисплатина на 50 % при их совместном действии на фибробласты, проявляя цитопротекторные свойства, связанные, возможно, с наличием антиоксидантной активности. Эсцин не обладает антиоксидантной активностью как показано в АБТС-тесте *in vitro* и не оказывает цитопротекторное действие. Эсцин и ЭКК не защищают опухолевые клетки от рентгеновского облучения в дозе 1 Гр, а, наоборот, потенцируют его действие. Выявленное *in vitro* увеличение цитотоксичности облучения в присутствии экстракта каштана конского позволяет высказать предположение о возможности его использования в качестве потенциального противоопухолевого средства.

**Ключевые слова:** сапонины; кумарины; экстракт каштана конского; эсцин; рентгеновское облучение; DU145; рак предстательной железы; фибробласты кожи крыс.

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных задач является разработка способов повышения эффективности и безопасности радио- и химиотерапии опухолей. Последнее может быть достигнуто снижением суммарной дозы за счет комбинации противоопухолевых лекарственных средств с химиосенсибилизаторами — соединениями, способными избирательно повышать чувствительность опухоли к химиотерапевтическим средствам. В качестве химиосенсибилизаторов могут выступать как растительные, так и синтетические соединения. Много современных исследований посвящено изучению способности соединений растительного происхождения и их производных оказывать избирательное проти-

воопухолевое действие без токсического влияния на неизмененные клетки [1, 6, 11, 13].

Одним из таких соединений является эсцин — три-терпеновый гликозид (сапонин), содержащийся в плодах (семенах) конского каштана, применяемый в качестве венопротектора. Экстракт каштана конского входит в состав таких препаратов, как “Анавенол”, “Венитан”, “Эскузан”, “Эссавен-гель”, “Веноплант”, “Веностезин”, “Флавозид”, “Соль аминокислоты l-лизина и эсцина” и др. [7].

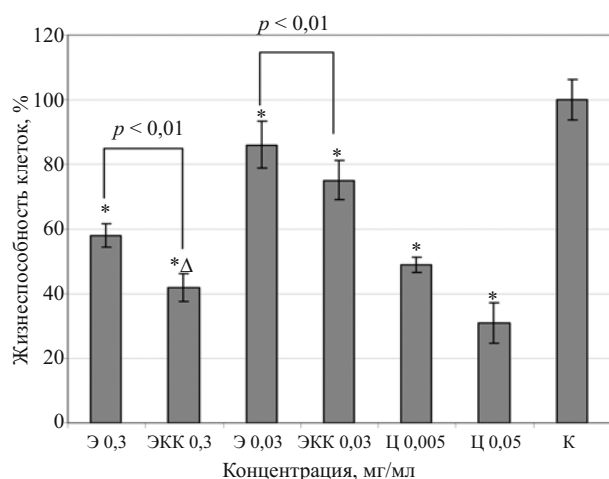
Действующим веществом препаратов каштана конского является эсцин, содержание которого в указанных лекарственных средствах колеблется в пределах 3 – 10 % [7].

Для эсцина характерны не только венотонизирующее, противоотечное действие, он обладает также антипролиферативными, антиоксидантными и цитопротекторными свойствами [10]. Эсцин тормозит метастазирование опухоли за счет снижения экспрессии лизилоксидазы-подобного фермента 2, необходимого для формирования поперечных связей при посттрансляционной модификации коллагена и эластина [16]. Цитопротекторные и антиоксидантные свойства эсцина

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО “РНИМУ имени Н. И. Пирогова” Минздрава РФ, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1.

<sup>2</sup> ФГБНУ “Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений”, Россия, 117216, Москва, ул. Грина, д. 7.

<sup>3</sup> “Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН”, Россия, 142290, г. Пущино, Московская обл., ул. Институтская, д. 3.



**Рис. 1.** Жизнеспособность опухолевых клеток DU145 после инкубации (24 ч) в присутствии эсцина, экстракта каштана конского и цисплатина ( $M \pm m$ ).

Здесь и на рис. 2, 3: Э — эсцин; ЭКК — экстракт каштана конского; Ц — цисплатин; К — контроль.

\* Достоверное отличие от контроля ( $p < 0,01$ );

<sup>Δ</sup> достоверное отличие цитотоксического действия ЭКК от Э в аналогичной концентрации ( $p < 0,01$ ).

обусловлены защитой клеток от активных форм кислорода —  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  — за счет активации генов, регулирующих синтез эндогенных антиоксидантов (Antioxidant Responsive Element (ARE)) [16].

В ФГБНУ “Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений” разработан новый способ получения сухого экстракта каштана конского (ЭКК), в котором содержание тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин составляет не менее 50 %, что гораздо выше, чем в существующих препаратах, содержащих эсцин [3].

Проведена сравнительная оценка экстракта каштана конского, содержащего бета-эсцин, с синтетическим химически чистым бета-эсцином (“Sigma”, США) по выраженности цитотоксического действия и способности усиливать эффект противоопухолевого препарата цисплатина. Для оценки возможной цитопротективной активности оценивали действие ЭКК в сравнении с эсцином на опухолевые клетки при рентгеновском облучении.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточная культура DU145 (рак предстательной железы человека) и культура фибробластов кожи крыс (ФКК) получены из биобанка ФГБНУ ВИЛАР (<https://pm.cytogen.ru>). Культивирование клеток осуществляли в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса ЛБ-В (Россия). Клетки инкубировали при 37 °C и содержании 5 %  $CO_2$  в инкубаторе Thermo 321Rel2. При культивировании клеток использовали стандартную среду DMEM с глутамином (Dulbecco’s Modified Eagle medium, ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % термоинактивированной эмбриональной те-

лячьей сыворотки (“Sigma”, США), антибиотиков гентамицина сульфата и стрептомицина сульфата (ООО “БиоХимФарм”, Россия). Жизнеспособность клеток определяли, используя 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил-тетразолий бромистый (МТТ) [4]. Клетки культивировали во флаконах объемом 25 см<sup>3</sup>, после получения монослоя проводили трипсинизацию и вносили по 200 мкл клеточной суспензии в лунки плоскодонного планшета “COSTAR” и добавляли исследуемые вещества — экстракт каштана конского (ФГБНУ ВИЛАР, содержание эсцина 48–52 %), эсцин (субстанция “Sigma”, США) или цисплатина (“Тева”, Израиль) в триплетах на 24 ч. Вещества растворяли в физиологическом растворе (“Панекко”, Россия). Цисплатин применяли в концентрации 0,005 мг/мл, равной его  $IC_{50}$  для клеток DU145 [9].

Конечные концентрации исследуемых соединений составляли 0,005 и 0,05 мг/мл (цисплатин); 0,03 и 0,3 мг/мл (эсцин); 0,03 и 0,3 мг/мл в пересчете на эсцин (ЭКК). После инкубации в течение 24 ч в культуральную среду на 3 ч вносили МТТ до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Общий объем лунки составлял 200 мкл, по 2 тыс. клеток на лунку. Затем жидкость из лунок удаляли пипетированием и вносили по 150 мкл диметилсульфоксида на 30 мин. МТТ восстанавливается за счет действия дегидрогеназ живых клеток до водонерастворимых кристаллов формазана. Оптическую плотность образцов регистрировали при длине волны 530 нм на планшетном анализаторе иммуноферментных реакций “УНИПЛАН” АИФР-01 (Россия). Оптическую плотность образцов, не содержащих препарат, принимали за контроль со 100 % выживаемостью клеток. Представлены данные 3 независимых экспериментов ( $n = 3$ ).

Вторая часть исследования включала аналогичные культуры клеток, инкубированные с тест-веществами и дополнительным рентгеновским облучением. Тест-вещества вносили в клеточную культуру за 10 мин до облучения. Облучение клеток проводили с помощью рентгеновской установки “РУСТ-М1” (Россия) в дозах облучения 1, 3, 5 Гр.

Антиоксидантную активность (АОА) веществ оценивали с помощью АБТС-теста (АБТС — 2,2'-азинобис-3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) в триплетах в 3 повторах. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Экрос” (Россия) при 734 нм (максимум поглощения раствора АБТС<sup>+</sup>) [13].

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 6. Достоверность отличий ( $p$ ) оценивали по критерию Стьюдента — Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Оценка цитотоксического действия ЭКК и эсцина на клетки DU145.** Сравнение цитотоксического действия ЭКК и эсцина в 2 концентрациях на опухолевые клетки DU145 показало, что ЭКК в концентрации

0,3 мг/мл превосходит по цитотоксическому действию эсцин, однако уступает цисплатину в концентрации 0,05 мг/мл (рис. 1).

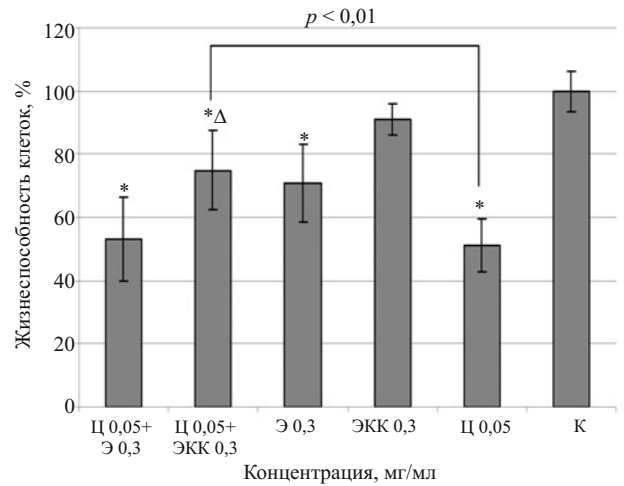
Цитотоксический эффект обоих препаратов (ЭКК и эсцина) зависит от концентрации. При увеличении концентрации ЭКК и эсцина в 10 раз доля выживших опухолевых клеток снижается в среднем с 75 до 42 % и с 86 до 58 %, соответственно ( $p < 0,01$ ).

При совместной инкубации клеток DU145 с ЭКК либо эсцина с цисплатином цитопротекторное действие не выявлено. Однако в нетрансформированных фибробластах кожи крыс ЭКК снижает цитотоксическое действие цисплатина (рис. 2).

Следует отметить, что в отсутствие цисплатина ЭКК не влияет, а эсцин ингибирует жизнеспособность фибробластов на 29 %,  $p < 0,01$  (рис. 2). Сравнение действия ЭКК на опухолевые и нетрансформированные клетки демонстрирует специфичность цитотоксического действия ЭКК на опухолевые клетки. При этом ЭКК снижает цитотоксическое действие цисплатина на фибробласты в среднем на 50 %, проявляя свойства цитопротектора.

Таким образом, результаты проведенного сравнительного анализа нового ЭКК и уже используемого в клинической практике эсцина показали, что ЭКК менее токсичен в отношении здоровых клеток и обладает большим токсическим действием по сравнению с эсцином в отношении клеток рака предстательной железы человека.

ЭКК не оказывает химиосенсибилизирующего действия, но снижает влияние цисплатина на фибробласты. Полученные данные подтверждают предположение о том, что ЭКК обладает цитопротекторным дей-



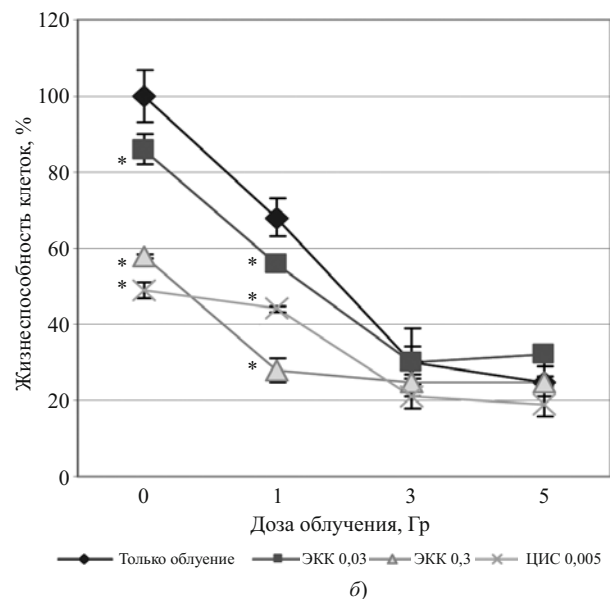
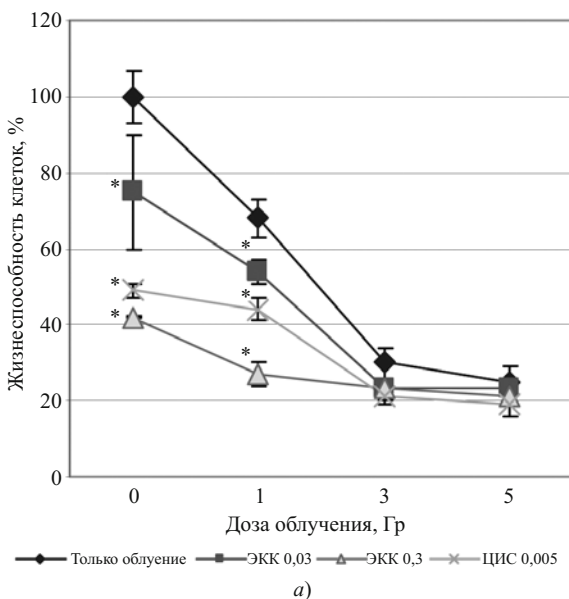
**Рис. 2.** Жизнеспособность фибробластов кожи крыс после инкубации (24 ч) с цисплатином, эсцином и ЭКК и их комбинациями (в % от контроля) ( $M \pm m$ ).

\* Достоверное отличие от контроля ( $p < 0,01$ );

Δ достоверное уменьшение цитотоксического действия цисплатина в присутствии экстракта каштана конского ( $p < 0,01$ ).

ствием на нетрансформированные клетки, которое может быть связано с АОА экстракта.

Для проверки этого предположения была исследована АОА эсцина и ЭКК. Оказалось, что ЭКК, в отличие от эсцина, обладает высокой АОА, снижая оптическую плотность раствора катион-радикалов АБТС при  $\lambda = 734$  нм на 37 % ( $p < 0,01$ ) в концентрации 0,3 мг/мл в течение 100 с. Эсцин не проявлял АОА в эксперименте, следовательно, цитопротекторное действие ЭКК не связано с содержанием в нем эсцина, а



**Рис. 3.** Влияние эсцина (а) или экстракта каштана конского (б) на жизнеспособность опухолевых клеток DU145 (в % от контроля) при рентгеновском облучении в разных дозах и инкубации (24 ч) с цисплатином ( $M \pm m$ ).

\* Достоверные отличия между соединениями без облучения и в дозе облучения 1 Гр ( $p < 0,01$ ).

может быть обусловлено наличием в экстракте, например, гидроксикумаринов. Известно, что гидроксикумарином свойственна АОА, реализующаяся за счет их связывания с ARE и дальнейшей индукцией синтеза антиоксидантных белков [8].

Цитопротективное действие ЭКК (а именно эсцина и кумаринов, входящих в состав экстракта) может также проявляться в их способности защищать опухолевые клетки от облучения. Для проверки гипотезы о наличии цитопротекторного эффекта у ЭКК было изучено его действие на жизнеспособность опухолевых клеток при рентгеновском облучении в дозах 1 – 5 Гр. По данным [2, 5], дозы рентгеновского облучения 0,1 – 5 Гр являются адекватными для экспериментальных исследований на клеточных линиях и животных и сопоставимыми с используемыми в клинической лучевой терапии. При дозе облучения 3 и 5 Гр статистически достоверной разницы в действии соединений не было: цисплатин, эсцин и ЭКК подавляли жизнеспособность опухолевых клеток на 70 – 80 %. Достоверные отличия в действии соединений наблюдали в дозе 1 Гр (рис. 3).

Жизнеспособность опухолевых клеток в присутствии ЭКК в высокой концентрации (0,3 мг/мл) при облучении дозой 1 Гр составляет в среднем 27 %, что практически совпадает с жизнеспособностью клеток в присутствии цисплатина в высокой концентрации без облучения — 31 % (рис. 1). Так же действовал эсцин: в высокой концентрации (0,3 мг/мл) при облучении дозой 1 Гр жизнеспособность клеток составила в среднем 28 % (рис. 3). Таким образом, эсцин и ЭКК не защищают опухолевые клетки от облучения, а, наоборот, потенцируют его действие.

Выраженный токсический эффект ЭКК в высокой концентрации (42 % в сравнении с 31 % у цисплатина) при достоверно меньшей токсичности в отношении здоровых клеток (91 % жизнеспособных клеток) позволяет рассматривать ЭКК как потенциальное противоопухолевое средство. Для дальнейшего исследования ЭКК необходимо оценить его токсичность *in vivo* и установить соотношение ED<sub>50</sub> и LD<sub>50</sub>.

Выявленное *in vitro* увеличение цитотоксичности ЭКК после облучения позволяет предположить возможность чередования цисплатина (во избежание возникновения множественной лекарственной устойчивости к цисплатину) в высоких концентрациях и ЭКК в высоких концентрациях в комбинации с облучением дозой 1 Гр при проведении противоопухолевой терапии.

Цитотоксическое действие ЭКК обусловлено значительным содержанием эсцина, так как цитотоксические свойства эсцина уже описаны [12]. В отличие от ЭКК, эсцин не обладает АОА, как показано нами в АБТС-тесте, поэтому, вероятно, антиоксидантное действие ЭКК не связано с эсцином, а связано с другими компонентами экстракта конского каштана — напри-

мер, кумаринами, количество которых в экстракте составляет около 10 %.

## ВЫВОДЫ

1. ЭКК с 50 % содержанием эсцина в концентрации 0,3 мг/мл в пересчете на эсцин подавляет жизнеспособность опухолевых клеток DU145 эффективнее, чем эсцин (42 % жизнеспособных клеток в сравнении с 58 % ( $p < 0,01$ )).

2. ЭКК в концентрации 0,3 мг/мл не влияет, а эсцин в концентрации 0,3 мг/мл ингибирует жизнеспособность фибробластов кожи крыс на 29 % ( $p < 0,01$ ).

3. ЭКК (0,3 мг/мл) снижает цитотоксичное действие цисплатина (0,05 мг/мл) на 50 % ( $p < 0,01$ ) на фибробласты кожи крыс, проявляя цитопротекторные свойства. Эсцин не снижает цитотоксичность цисплатина.

4. ЭКК (0,3 мг/мл) обладает АОА, снижая оптическую плотность раствора катион-радикалов АБТС при  $\lambda = 734$  нм на 37 % ( $p < 0,01$ ). Эсцин такой активностью не обладает.

5. ЭКК и эсцин в концентрации 0,3 мг/мл повышают цитотоксический эффект рентгеновского облучения в дозе 1 Гр ( $p < 0,01$ ).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №19-015-00195\19.

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Князев, В. С. Роговский, Е. Д. Свешникова и др., *Хим.-фарм журн.*, **52**(3), 17 – 20 (2018); *Pharm. Chem. J.*, **52**(3), 205 – 208 (2018), doi: 10.30906/0023-1134-2018-52-3-17-20.
2. А. А. Липенгольц, А. А. Черепанов, И. Н. Шейно и др., *Радиацион. биол. радиоэкол.*, **54**(5), 479 – 481 (2014).
3. Патент РФ № 2665630 от 3.09.2018 г. (2018).
4. А. В. Семейкин, Т. А. Федотчева, И. С. Левина и др., *Хим.-фарм журн.*, **48**(6), 9 – 13 (2014); *Pharm. Chem. J.*, **40**(6), 363 – 367 (2014).
5. С. С. Сорокина, С. И. Заичкина, О. М. Розанова и др., *Биофизика*, **61**(1), 172 – 177 (2016).
6. Т. А. Федотчева, О. П. Шейченко, В. В. Ануфриева и др., *Хим.-фарм журн.*, **51**(7), 34 – 39 (2017); *Pharm. Chem. J.*, **51**(7), 590 – 595 (2017).
7. *Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система)*; Российская академия наук, Фонд “Здоровье”, Москва, Выпуск XVI (2017).
8. R. Arora, S. Sawney, V. Saini, et al., *Mol. Cancer*, **15**(1), 64 – 79 (2016); doi:10.1186/s12943-016-0550-2.
9. H. Mansouri-Torshizi, E. Rezaei, F. Kamranfar, et al., *Adv. Pharm. Bull.*, **6**(3), 449 – 453 (2016).
10. G. Mojžišová, M. Kello, M. Pilátová, et al., *Acta Biochim. Pol.*, **63**(1), 79 – 87 (2016); doi: 10.18388/abp.2015.1013.
11. F. Naselli, L. Tesoriere, F. Caradonna, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**(1), 652 – 658 (2014); doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.029.
12. V. T. Nguyen, J. A. Sakoff, C. J. Scarlett, et al., *Chem. Biodivers.*, **14**(6) (2017); doi: 10.1002/cbdv.201600498.
13. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, et al., *Free Rad. Biol. Med.*, **26**(9/10), 1231 – 1237 (1999).
14. P. Sehgal, P. Szalai, C. Olesen, et al., *J. Biol. Chem.*, **292**(48), 19656 – 19673 (2017); doi: 10.1074/jbc.M117.796920.
15. Y. Wang, X. Xu, P. Zhao, et al., *Oncotarget*, **7**(17), 23684 – 23699 (2016); doi: 10.18632/oncotarget.8152.

16. K. Wang, Y. Jiang, W. Wang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **468**(4), 541 – 547 (2015); doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.117.

Поступила 09.10.19

## EXPERIMENTAL STUDY OF THE CYTOTOXIC, CYTOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF HORSE CHESTNUT EXTRACT WITH 50% ESCIN CONTENT

T. A. Fedotcheva<sup>1,2</sup>, A. I. Matyushin<sup>1</sup>, A. N. Usenko<sup>1</sup>, O. P. Sheychenko<sup>2</sup>, A. Yu. Radimich<sup>2</sup>, V. I. Sheychenko<sup>2</sup>, N. I. Fedotcheva<sup>3</sup>, and N. L. Shimanovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, 1 Moscow, 117997 Russia

<sup>2</sup> All-Russia Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), ul. Grina 7, Moscow, 117216 Russia

<sup>3</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

Evaluation of the properties of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) extract (HCE) containing 50% beta escin (aescin) in comparison to synthetic chemically pure escin (Sigma, USA) was carried out by studying the cytotoxic effect on DU145 tumor cells (human prostate cancer) and rat skin fibroblasts. It is established that HCE at a concentration of 0.3 mg/mL suppresses the viability of tumor cells by 16 % more efficiently than does escin at the same concentration ( $p < 0.01$ ). A comparison of the cytotoxic action of HCE and escin on rat skin fibroblasts showed that HCE does not affect while escin inhibits the viability of fibroblasts (by 29%,  $p < 0.01$ ) upon 24 h incubation. HCE reduces the cytotoxicity of cisplatin by 50% when they jointly act on fibroblasts and show a cytoprotective effect, possibly related to the presence of antioxidant activity. Escin does not possess antioxidant activity and does not exhibit cytoprotective effect, as shown by the *in vitro* ABTS test. Escin and HCE do not protect tumor cells from x-ray irradiation at a dose of 1 Gr – on the contrary, they potentiate x-ray action. The increased cytotoxicity of irradiation *in vitro* in the presence of HCE suggests the effectiveness of using HCE in combination with antitumor cisplatin radiotherapy.

**Keywords:** saponins; coumarins; horse chestnut extract; escin; x-ray exposure; DU145; prostate cancer; rat skin fibroblasts.