© К.Н. Конторщикова, А.В. Алясова,
С.Ч. Майкопарова, 2008 г.
УДК 615.7:616—006
Поступила 14.04.2008 г.

К.Н. КОНТОРЩИКОВА[1], А.Б. АЛЯСОВА[1], С.Ч. МАЙКОПАРОВА[2]

Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород;
[2]Майкопский онкологический диспансер, Майкоп

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА

В экспериментальных условиях на культурах злокачественных опухолевых клеток продемонстрирована противоопухолевая активность природного биофлавоноида дигидрокверцетина, связанная с активацией процессов липопероксидации в малигнизированных клетках.

The antitumoral activity of a natural bioflavonoid dihydroquercetin, connected with the lipoperoxidation process activation in malignant cells is demonstrated in experimental conditions at the malignant tumoral cell cultures.

Актуальной проблемой современного противоопухолевого лечения онкологических больных является поиск, изучение механизмов действия и разработка схем применения препаратов, обладающих антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами, на основе нетоксичных веществ природного происхождения, например биофлавоноидов [1]. К данной группе относится дигидрокверцетин — липофильное вещество, обладающее высокой антиоксидантной и Р-витаминной активностью [2, 3]. По выраженности антиоксидантного эффекта препарат равен а-токоферолу и более активен, чем Р-каротин. При различных патологических состояниях дигидрокверцетин может проявлять себя как эффективное средство поддерживающей терапии, способен регулировать реакции иммунной системы, оказывать противовирусное, противоаллергическое и противовоспалительное действие, снижать степень эндотоксемии [4]. Для включения его в качестве дополнительного компонента противоопухолевой терапии в состав комплексного и комбинированного лечения пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями, представляется целесообразным изучить антипролиферативное действие препарата на клетки различных видов бластом.

Цель исследования — оценить противоопухолевую активность дигидрокверцетина на культурах злокачественных опухолевых клеток.

Материалы и методы. В качестве экспериментальных клеточных линий использовались культуры клеток HEP-2 (эпидермальная карцинома гортани) и Hela (карцинома шейки матки), полученные из филиала ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ «Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов ИмБио», имеющего лицензию на производство культуры клеток (сертификат производства №001420.02—73024). При выращивании клеток использовалась среда 199. Для обеих клеточных линий посевная доза составляла 50—100 клеток в 1 мл, кратность рассева — 1:4 — 1:10. Снятие клеток осуществлялось с помощью раствора Версена (4/5) с 0,25% трипсином, частота пассирования составляла 5—7 сут. Пересевы клеток выполняли в стерильных условиях. Подсчет количества клеток проводили в суспензии с использованием камеры Горяева при увеличении 150x250. О жизнеспособности клеток судили по их окрашиванию 0,1% раствором трипанового синего на физиологическом растворе. В первый день эксперимента клетки перевивали на стекла, помещенные в пробирки с питательной средой, и инкубировали при температуре 37° С в течение 48 ч.

На третий день эксперимента навески дигидрокверцетина по 150; 50; 20; 10; 5 и 2,5 мг растворяли в 10 мл раствора (5 мл 0,9% NaCl + 5 мл питательной среды), помещали в стерильные флаконы и растворяли на водяной бане в тече-

Материал с сайта www.robios.ru

ние 5 мин. Из пробирок со стеклами, на которых находились клетки, удаляли старую питательную среду. В каждую пробирку добавляли 2 мл полученного раствора, содержащего дигидрокверцетин, так, чтобы стекла погружались в жидкость полностью. Контролем служили клеточные линии, помещенные в 2 мл питательной среды (1-я серия), и клеточные линии, находящиеся в 2 мл смеси, состоящей из физиологического раствора (0,9% NaCl) и питательной среды в соотношении 1:1 (2-я серия). Пробирки с контрольными и опытными средами закрывали плотно прижатыми резиновыми пробками (для соблюдения стерильности) и помещали в термостат на 48 ч при температуре 37°С.

На пятый день эксперимента пробирки извлекали из термостата, стекла вынимали и высушивали на открытом воздухе. Препараты фиксировали раствором эозин-метиленового синего по Май-Грюнвальду и окрашивали азур-эозиновым красителем по Романовскому в течение 3 мин. Далее стекла промывали холодной проточной водой, высушивали на воздухе и просматривали в микроскоп.

Интенсивность свободно-радикальных реакций определяли методом индуцированной биохемилюминесценции на приборе БХЛ-06. При этом анализировались параметры, характеризующие уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ): Imax — максимальная интенсивность свечения, показывающая потенциальную способность биологического объекта к перекисному окислению липидов, S — светосумма, отражающая содержание в плазме радикалов, соответствующих обрыву цепи свободно-радикального окисления, обратно пропорциональна антиоксидантной активности пробы; tg-2a — показатель, характеризующий скорость спада процессов свободнорадикального окисления в плазме; Imax/S. Кроме того, измеряли уровни молекулярных продуктов ПОЛ в гомогенате из культуры клеток — диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК), оснований Шиффа (ОШ). Для этого жидкость из пробирок каждой серии сливали, к оставшимся клеткам добавляли 0,5 мл физиологического раствора, под действием которого клетки разрушались.

Результаты и обсуждение. Данные микроскопического исследования показали, что в 1-й серии сохранялось 77% жизнеспособных клеток, мертвых насчитывалось 23% от общего числа. Во 2-й серии эти показатели составили 79 и 21% соответственно.

В случаях использования навесок дигидрокверцетина в 50 и 150 мг наблюдалось интенсивное прокрашивание препаратов, по всей видимости, связанное с повышением проницаемости клеточных мембран. Дегенеративных изменений в клетках не отмечалось, особенностью явилось выраженное прилипание клеток к поверхности стекол (явление «приваривания»). Видны были кристаллы препарата, образовавшего осадок. В связи с этим в дальнейшем учитывались результаты эксперимента с меньшими навесками препарата.

Данные микроскопического исследования этих клеточных линий показали, что противоопухолевый эффект дигидрокверцетина начинал проявляться при самой низкой концентрации препарата — 2,5 мг. При этом в клетках выявлялись размытые ядра, начало кариолизиса, неизмененные клетки сохранялись только в 7% случаев (табл. 1).

При увеличении навески препарата до 20 мг

Таблица 1

Микроскопические изменения в опухолевых клетках при воздействии на них различных концентраций дигидрокверцетина, %

Микроскопические признаки	Концентрация дигидрокверцетина, мг			
	2,5	5	10	20
Голые ядра	5	20	17	11
Клетки без ядра, цитоплазма и клеточная мембрана сохранены	21	23	5	15
Контуры ядра размыты, начался кариолизис	32	38,5	15	53
Гиперхромная окраска, клеточные структуры не различаются	2	—	7,5	15
Контуры ядра нарушены или оно фрагментировано, цитоплазма фрагментирована, клеточная оболочка разрушена	33	14	50,5	11
Неизмененные клетки	7	5	10	2

материал с сайта www.robios.ru

Таблица 2

Показатели ПОЛ и антиоксидантной системы защиты в опухолевых клетках контрольных и опытных серий

Серии	Показатели						
	tg-2a	1тах, мВ/с	S, мВ/30 с	Imax/S	ДК	ТК	ОШ
Контроль 1	0,60±0,007	0,23±0,013	2,92±0,12	0,29±0,11	0,07±0,001	0,019±0,0010	6,9±0,98
Контроль 2	0,83±0,004	0,26±0,015	2,74±0,19	0,23±0,10	0,10±0,002	0,02±0,0012	4,0±0,75
Опыт 1, 5 мг	0,50±0,003+	0,90±0,006*+	3,95±0,21*+	0,25±0,13	0,10±0,003	0,03±0,0013	2,5±0,63*+
Опыт 2, 10 мг	0,71±0,004+	1,49±0,007*+	4,91±0,32*+	0,41±0,11*+	0,12±0,002	0,05±0,0012*+	2,62±0,54*
Опыт 3, 20 мг	0,67±0,10+	1,46±0,006*+	4,34±0,51*+	0,34±0,09+	0,12±0,003	0,05±0,0011*+	2,62±0,81*

* — различия достоверны с контрольной серией 1 ($p<0,05$); + — различия достоверны с контрольной серией 2 ($p<0,05$).

количество неизмененных клеток снижалось до 2%, а число клеток с размытым контуром и началом кариолизиса составило 53%.

Представленные данные свидетельствовали о том, что добавление в питательную среду, окружающую опухолевые клетки, дигидрокверцетина способствовало развитию в них деструктивных изменений, приводящих в конечном итоге к гибели, т.е. препарат оказывал противоопухолевое действие.

Для уточнения механизма противоопухолевого действия дигидрокверцетина оценивалось влияние препарата на процессы свободно-радикального окисления. Анализ результатов проведенных исследований показал, что применение растворов дигидрокверцетина способствует достоверной активации реакций липопероксидации в клетках культуры опухолей по сравнению с соответствующими показателями, полученными в опухолевых клетках контрольных серий (табл. 2). Отчетливо прослеживался дозозависимый эффект действия препарата. Так, при навеске дигидрокверцетина 5 мг величина Imax, характеризующая активность свободно-радикальных реакций, увеличилась более чем в 3 раза ($p<0,05$); при использовании навесок 10 и 20 мг — в 5 раз ($p<0,05$) по сравнению со значением данного параметра в опытных группах. Одновременно возрастал уровень первичных продуктов ПОЛ — ДК, что свидетельствовало об активации начальных процессов липопероксидации. Увеличение показателей S и Imax/S указывало на снижение активности антиоксидантной системы защиты в опухолевых клетках. Последнее явилось причиной активации процессов ПОЛ и, возможно, способствовало запуску апоптотических реакций, что, в конечном итоге, приводило к разрушению и гибели клетки.

Заключение. Дигидрокверцетин продемонстрировал противоопухолевую активность на культурах злокачественных опухолевых клеток, связанную с активацией процессов липопероксидации в малигнизированных клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Yeou K.S., Jun G.J., Kyoung K.H.* Two flavonoids from the leaves of Morus alba induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line. Biol and Pharm Bull 2000; 23 (4): 451—455.
2. *Конторщикова К.Н., Жулина Н.И., Рунова А.А.* Оценка эффективности препарата «Биоскан С» у больных геронтологического центра. В кн.: Биоскан С — антиоксидант природного происхождения. Сборник научных трудов. Саров; 2000; с. 5—8.
3. *Конторщикова К.Н., Перетягин С.П., Билков С.А.* Оценка эффективности препарата «Биоскан С» у больных с ожоговой травмой. В кн.: Биоскан С — антиоксидант природного происхождения. Сборник научных трудов. Саров; 1999; с. 9—11.
4. *Wickramasinghe S.N., Hasan R, Khalpey Z.* Differences in the serum levels of acetaldehyde and cytotoxic acetaldehyde — albumin complexes after the consumption of red and white wine: in vivo effect of flavonoids, vitamin E and ofter dietary antioxidants on cytotoxic complexes. Alcohol Clin Exp Res 1996; 20 (5): 799—803.

Материал с сайта www.robios.ru