

УТВЕРЖДАЮ  
 Проректор по научной работе НГМА  
 д.м.н., проф. Б.Е. Шахов



2004г.

### ОТЧЕТ по НИР

по договору о сотрудничестве № 37 / 02 П с ООО «РОСБИОПРОМ»

Оценка антиоксидантной и противоопухолевой активности

препарата «Биоскан С»

Ответственный исполнитель:  
 Зав.каф. клинической лабораторной  
 диагностики НГМА  
 д.б.н. профессор  
 К.Н.Конторщикова

*20 января* 2004 г.

Нижний Новгород

Алясова А.В.<sup>1</sup>, Майкопарова С.Ч.<sup>2</sup>, Конторщикова К.Н.<sup>1</sup>

### К вопросу противоопухолевого действия дигидрокверцетина

1 – Нижегородская государственная медицинская академия (ректор – профессор Б.Е. Шахов),

2 – Майкопский онкологический диспансер (главный врач – М.А. Намитогов)

#### Реферат

В экспериментальных условиях на культурах злокачественных опухолевых клеток продемонстрирована противоопухолевая активность природного биофлавоноида дигидрокверцетина составе биологически активной добавки “[Биоскан С](#)”, связанная с активацией процессов липопероксидации в малигнизированных клетках.

**Ключевые слова:** дигидрокверцетин, злокачественные опухолевые клетки

**Адрес для переписки:** г. Н. Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1, 603001, кафедра онкологии ЦПК и ППС.

Алясова Анна Валерьевна

**Введение.** 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 [4]. К данной группе относится дигидрокверцетин ( ДКВ ) составе биологически активной добавки к пище “[Биоскан С](#)” – липофильное вещество, обладающее высокой антиоксидантной и Р-витаминной активностью [1; 2]. По выраженности антиоксидантного эффекта препарат равен  $\alpha$ -токоферолу и более активен, чем  $\beta$ -каротин. При различных патологических состояниях ДКВ может проявлять себя как эффективное средство поддерживающей терапии, способен регулировать реакции иммунной системы, оказывать противовирусное, противоаллергическое и противовоспалительное действие, снижать степень эндотоксмии [3]. Для включения дигидрокверцетина в качестве дополнительного компонента противоопухолевой терапии в состав комплексного и комбинированного лечения пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями, представляется целесообразным изучить его антипролиферативное действие на клетки различных видов бластом.

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

**Материал и методы.** В качестве экспериментальных клеточных линий использовались культуры клеток НЕР–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 посева 1:4 – 1:10. Снятие клеток осуществлялось с помощью раствора Версена (4/5) с 0,25% трипсином, частота пассирования составляла 5–7 суток. Пересевы клеток выполняли в стерильных условиях. Подсчет количества клеток проводили в суспензии с использованием камеры Горяева при увеличении 150×250. 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<sup>0</sup> С в течение 48 часов.

На третий день эксперимента навески ДКВ 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 течение 5 минут. Из пробирок со стеклами, на которых находились клетки, удаляли старую питательную среду. В каждую пробирку добавляли 2 мл полученного раствора, содержащего ДКВ, так, чтобы стекла погружались в жидкость полностью. Контролем служили клеточные линии, помещенные в 2 мл в питательной среды (1 серия), и клеточные линии, находящиеся в 2 мл смеси, состоящей из физиологического раствора (0,9 % NaCl) и питательной среды в соотношении 1:1 (2 серия). Пробирки с контрольными и опытными средами закрывали плотно прижатыми резиновыми пробками (для соблюдения стерильности) и помещали в термостат на 48 часов при температуре 37<sup>0</sup> 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 минут. Далее стекла промывали холодной проточной водой, высушивали на воздухе и просматривали в микроскоп.

Интенсивность свободнорадикальных реакций определяли методом индуцированной биохемилуминесценции на приборе БХЛ–06. При этом анализировались параметры, характеризующие уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) – I<sub>max</sub>, S и антиоксидантную активность – tg-2α, I<sub>max</sub>/ 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–ой серии сохранялось 77% жизнеспособных клеток, мертвых насчитывалось 23% от общего числа клеток. Во 2–ой серии эти показатели составили 79% и 21%, соответственно.

В случаях использования навесок ДКВ 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 ДКВ

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

Таблица 1

**Микроскопические изменения в опухолевых клетках при воздействии на них различных концентраций дегидрохверцетина**

Микроскопические признаки	Концентрация дегидрохверцетина			
	2,5 мг	5 мг	10 мг	20 мг
1	2	3	4	5
Голые ядра	5%	20%	17%	11%
Клетки без ядра, цитоплазма и клеточная мембрана сохранены	21%	23%	5%	15%
Контур ядра размыты, начался кариолизис	32%	38,5%	15%	53%
Гиперхромная окраска, клеточные структуры не различаются	2%	–	7,5%	15%
Контур ядра нарушены или оно фрагментировано, цитоплазма фрагментирована, клеточная оболочка разрушена	33%	14%	50,5%	11%
Неизменные клетки	7%	5%	10%	2%

При увеличении навески препарата до 20 мг количество неизменных 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, ДКВ способствовало развитию в них деструктивных изменений, приводящих в конечном итоге к гибели, т.е. препарат оказывал противоопухолевое действие.

Для уточнения механизма противоопухолевого действия дигидрохверцетина оценивалось влияние препарата на процессы свободнорадикального окисления. Анализ результатов проведенных исследований показал, что применение растворов ДКВ 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 дигидрохверцетина 5 мг величина  $I_{max}$ , характеризующая активность свободнорадикальных реакций увеличилась более, чем в 3 раза ( $p < 0,05$ ); при использовании навески 10 мг 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  $I_{max}/S$  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.

Таким образом, дигидрохверцетин, составе биологически активной добавки [“Биоскан С”](#), продемонстрировал противоопухолевую активность на культурах злокачественных опухолевых клеток, связанную с активацией процессов липопероксидации в малигнизированных клетках.

**Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы защиты в опухолевых клетках контрольных и опытных серий**

Серии	Показатели						
	tg-2 $\alpha$	I <sub>max</sub>	S	I <sub>max</sub> /S	ДК	ТК	ОШ
<b>Контроль 1</b>	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
<b>Контроль 2</b>	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
<b>Опыт 1 5 мг</b>	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***
<b>Опыт 2 10 мг</b>	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*
<b>Опыт 3 20 мг</b>	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).

Примечание: tg-2 $\alpha$  - показатель, характеризующий скорость спада процессов свободно-радикального окисления в плазме; I<sub>max</sub> (mv/сек) - максимальная интенсивность свечения, показывающая потенциальную способность биологического объекта к перекисному окислению липидов, S - светосумма ( mv /30 секунд), отражающая содержание в плазме радикалов, соответствующих обрыву цепи свободно-радикального окисления, обратно пропорциональна антиоксидантной активности пробы, ДК– диеновые конъюгаты, ТК– триеновые конъюгаты, ОШ– основания Шиффа.

### Литература:

1. Конторщикова К.Н., Жулина Н.И., Рунова А.А. Оценка эффективности препарата «Биоскан С» у больных геронтологического центра // Биоскан С – антиоксидант природного происхождения: Сб.научн.тр. - Саров, 2000. - С. 5-8.
2. Конторщикова К.Н., Перетягин С.П., Вилков С.А. Оценка эффективности препарата «Биоскан С» у больных с ожоговой травмой // «Биоскан С» - антиоксидант природного происхождения: Сб.научн.тр. - Саров, 1999. - С. 9-11.
3. Wickramasinghe S.N., Hasani 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 other dietary antioxidants on cytotoxic complexes // Alcohol. Clin. Exp. Res. - 1996. - vol. 20. - № 5. - P. 799-803.
4. 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. - vol. 23. - № 4. - P. 451-455.

Алясова Анна Валерьевна	Alyasova A. V.
Майкопарова Саида Челечбиевна	Maykoparova S. Ch.
Конторщикова Клавдия Николаевна	Kontorschikova C. N.

**Адрес для переписки:** г. Н. Новгород, Московское шоссе, 21–65, 603116

Т. +79202524248, эл. почта: alyasovaav68@mail.ru

Алясова Анна Валерьевна