

# **СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭХИНОХРОМА А, ОКСИГЕНИРОВАННЫХ КАРОТИНОИДОВ, ГИНЗЕНОЗИДА Rh2, ДИСУЛЬФАТА ЛЮТЕОЛИНА И МЕТФОРМИНА КАК СРЕДСТВ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА**

**Цыбульский А.В.<sup>1</sup>, Попов А.М.<sup>1,2</sup>, Климович А.А.<sup>2</sup>, Артюков А.А.<sup>2</sup>,  
Костецкий Э.Я.<sup>1</sup>, Веселова М.Д.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова» Дальневосточного  
отделения РАН, г. Владивосток, Россия

**Резюме.** Настоящая работа посвящена сравнительному исследованию потенцирующего действия ряда препаратов природного происхождения, а также метформина на противоопухолевую активность доксорубина. В условиях *in vivo* на модели асцитной карциномы Эрлиха показано повышение терапевтической эффективности доксорубина при его сочетанном применении с эхинохромом А, оксикаротиноидами, гинзенозидом Rh2, а также метформином. В исследованных концентрациях (10 мг/кг массы тела) установлено негативное влияние дисульфата лютеолина на эффективность противоопухолевой терапии. При изучении влияния этих веществ на уровень внутриклеточных АФК на первичных культурах клеток селезенки мышей с помощью селективного флуоресцентного индикатора 2',7'-дихлорфлуоресцеин-диацетата показано отсутствие положительной корреляции у изучаемых соединений между индукцией дополнительного синтеза АФК и потенцирующим действием при терапии доксорубином. У части изучаемых соединений отмечена положительная корреляция между интерферон-индуцирующей активностью и негативная корреляция между повышенным содержанием IL-1 с одной стороны и усилением противоопухолевого эффекта доксорубина с другой. Полученные результаты указывают на целесообразность дальнейшего изучения препаратов эхинохрома, гинзенозида Rh2, смеси оксигенированных каротиноидов и метформина как перспективных средств потенцирования эффективности противоопухолевой терапии.

**Ключевые слова:** противоопухолевая активность, доксорубин, эхинохром А, гликозиды женьшеня, оксикаротиноиды, дисульфат лютеолина, метформин, активные формы кислорода, цитокины

## **Адрес для переписки:**

Цыбульский Александр Васильевич  
ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»  
690000, Россия, г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27.  
Тел./факс: 8 (4232) 45-77-79.  
E-mail: tsybulskiy.av@dvfu.ru; avt\_biotech@mail.ru

## **Address for correspondence:**

Tsybulsky Alexander V.  
Far Eastern Federal University  
690000, Russian Federation, Vladivostok,  
Oktyabrskaya str., 27.  
Phone/Fax: 7 (4232) 45-77-79.  
E-mail: tsybulskiy.av@dvfu.ru; avt\_biotech@mail.ru

## **Образец цитирования:**

А.В. Цыбульский, А.М. Попов, А.А. Климович,  
А.А. Артюков, Э.Я. Костецкий, М.Д. Веселова  
«Сравнительное изучение эхинохрома А,  
оксигенированных каротиноидов, гинзенозида Rh2,  
дисульфата лютеолина и метформина как средств  
потенцирования противоопухолевого действия  
доксорубина» // Медицинская иммунология, 2018.  
Т. 20, № 2. С. 179–192.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-179-192

© Цыбульский А.В. и соавт., 2018

## **For citation:**

A.V. Tsybulsky, A.M. Popov, A.A. Klimovich, A.A. Artyukov,  
E.Ya. Kostetsky, M.D. Veselova "Comparative study of  
echinochrome A, oxygenated carotenoids, ginsenoside Rh2,  
luteolin disulfate and metformin as a mean to potentiate  
antitumor effect of doxorubicin", *Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 2,  
pp. 179–192.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-179-192

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-179-192

# COMPARATIVE STUDY OF ECHINOCHROME A, OXYGENATED CAROTENOIDS, GINSENOSE Rh2, LUTEOLIN DISULFATE AND METFORMIN AS A MEAN TO POTENTIATE ANTITUMOR EFFECT OF DOXORUBICIN

Tsybulsky A.V.<sup>a</sup>, Popov A.M.<sup>a,b</sup>, Klimovich A.A.<sup>b</sup>, Artyukov A.A.<sup>b</sup>, Kostetsky E.Ya.<sup>a</sup>, Veselova M.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

<sup>b</sup> Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

**Abstract.** This work concerned a comparative study of potentiating effects produced by some drugs of natural origin, as well as metformin, upon antitumor activity of doxorubicin. An increased therapeutic efficacy of doxorubicin used in combination with echinochrome A, oxycarotenoids, ginsenoside Rh2, and metformin was tested in the *in vivo* Ehrlich ascites carcinoma model. The negative effect of luteolin disulfate (10 mg/kg body weight) upon efficacy of antitumor therapy was revealed. When studying the effect of these substances on the level of intracellular ROS in primary cultures of murine spleen cells, using a selective fluorescent indicator (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate), we did not find a positive correlation between induction of excessive ROS synthesis and potentiation of doxorubicin action with the compounds studied. Some of the studied agents showed a positive correlation between interferon-inducing activity, as well as a negative correlation between increased IL-1 content, and higher antitumor effect of doxorubicin. The obtained results suggest expedience of further studies of antitumor effect potentiation using preparations of echinochrome, ginsenoside Rh2, a mixture of oxygenated carotenoids and metformin.

**Keywords:** antitumor activity, doxorubicin, echinochrome A, ginsenosides, oxygenated carotenoids, Rh2, luteolin disulfate, metformin, reactive oxygen species, cytokines

Список сокращений: ДР — доксорубин, АФК — активные формы кислорода, ДХФ-ДА — 2', 7'-дихлорфлуоресцеин-диацетат, ЭХА — эхинохром А, СОК — смесь оксигенированных каротиноидов, ДСЛ — дисульфат лютеолина

List of the used abbreviations: DR — doxorubicin, ROS — reactive oxygen species, DCF-DA — 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate, ECHA — echinochrome A, МОС — mixture of oxygenated carotenoids, DSL — disulfate of luteolin.

Работа выполнена при финансовой поддержке российского научного фонда (проект № 14-50-00034).

## Введение

Доксорубин (ДР), относящийся к группе антрациклиновых антибиотиков, является одним из самых эффективных и популярных средств противоопухолевой терапии и применяется как в виде монотерапии, так и в составе различных химиотерапевтических схем. Механизмы противоопухолевого действия ДР реализуются посредством генотоксической активности, а также путем индукции повышенной продукции опухолевыми клетками активных форм кислорода (АФК), что

повреждает структуру биомолекул клеток-мишеней и способствует их гибели (в частности за счет активации апоптозных программ). Эти эффекты в то же время ответственны за побочное действие данного препарата [11].

Интересным является вопрос о возможности сочетания ДР с препаратами, не обладающими собственной противоопухолевой активностью, но обладающими способностью модулировать различные физиологические системы организма — иммунную, нервную, цитокиновые и гормональные механизмы регуляции и др. Применение подобных препаратов может, с одной стороны, снизить тяжесть побочных эффектов химиотерапии, а с другой — повысить ее эффективность (что может обеспечить достижение клинического эффекта при применении меньших доз противоопухолевого препарата). В настоящее время подобные подходы в тактике лечения онкопатологий активно исследуются.

Среди биологически активных веществ (БАВ), получаемых из природных источников, оксигенированные каротиноиды, а именно: астаксантин (АК), лютеин и зеаксантин привлекают особое внимание исследователей в качестве новых лечебно-профилактических средств и функциональных

элементов пищи. Оксикаротиноиды занимают особое место среди низкомолекулярных природных соединений и характеризуются высоким потенциалом защиты организма от широкого круга заболеваний при отсутствии побочных и токсических эффектов. АК запатентован как биологически активная добавка и применяется в виде различных лекарственных форм [7, 8, 14].

Сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН выделен ряд нафтохинонов из морских ежей, наибольший интерес из которых вызвал 1,4-полигидроксинафтохинон эхинохром А (ЭХА) из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis* [12]. Некоторые фармакологические эффекты ЭХА обеспечили возможность его внедрения в клинику сердечно-сосудистых и офтальмологических заболеваний в виде препарата «Гистохром» [8, 13]. На ультраструктурном уровне доказано протективное действие препаратов ЭХА при экспериментальном стрессе [12], что выражается в сохранении нормальной структуры миофибриллярного аппарата и митохондрий кардиомиоцитов у животных, улучшение митохондриального дыхательного контроля и стимулирования митохондриального биогенеза. Нарушение функции митохондриального аппарата клеток является характерной чертой многих патологических состояний. ЭХА может выступать в роли эффективного переносчика электронов между различными митохондриальными электрон-донорными и электрон-акцепторными ферментативными комплексами и тем самым уменьшать нарушения в механизмах энергогенерации [8, 9, 15]. Это имеет большое значение для поддержания здоровья в широком смысле этого слова: увеличения продолжительности жизни, улучшения использования энергии и защиты от АФК.

Применение ЭХА в стрессовых условиях не оказывает влияния на уровень половых гормонов в плазме крови и является более безопасным, чем фармакологическое действие некоторых биофлавоноидов (генестеин, лютеолин и др.), которые обладают эстрогеноподобной активностью. То есть использование ЭХА в рамках адаптации к стрессу не несет в себе риска развития комплекса дисгормональных последствий [12].

Пероральное применение ЭХА приводит к системному защитному эффекту, возможно, связанному с повышением как антиоксидантных, так и адаптационно-приспособительных механизмов защиты организма животных, которые возникают в ответ на продукцию физиологических концентраций перекиси водорода, индуцируемую ЭХА [8]. Пероральное применение ЭХА в перспективе может стать наиболее рациональным маршрутом его введения в организм человека.

Однако препараты ЭХА, помимо антиоксидантной активности, имеют гораздо более широкий позитивный спектр фармакологической активности. Так, на экспериментальных моделях атеросклероза и диабета нами показана его лечебно-профилактическая активность: ЭХА эффективно защищает углеводный и жировой обмен в организме экспериментальных животных от патологических процессов, индуцируемых аллоксаном и другими токсинами [8, 15]. Поэтому мы посчитали логичным провести исследование ЭХА как адъювантного агента доксорубицина, при проведении противоопухолевой терапии как фактора защиты от развития полиорганной недостаточности, так и, возможно, фактора потенцирования противоопухолевой активности ДР.

Многолетнее изучение гликозидов женьшеня (гинзенозидов) как в азиатских, так и в европейских странах показывает, что при их применении снижается риск заболевания разными видами опухолей. Это показано не только на экспериментальных опухолевых моделях, но и на людях (данные онкоэпидемиологических исследований) [10, 25].

Гинзенозид Rh<sub>2</sub> в дозах от 10 до 50 мг/кг повышает биологическую реактивность интактного и опухоленесущего организма экспериментальных животных, положительно влияет на иммунную систему: стимулирует фагоцитарную активность макрофагов, усиливает продукцию активных форм кислорода и оксида азота (NO), повышает активность НК-лимфоцитов. Антиметастатическая и иммуномодулирующая активности этих гинзенозидов сочетаются со способностью оказывать прямое цитостатическое действие на опухолевые клетки. В ряде работ показано, что гинзенозид Rh<sub>2</sub> усиливает инфильтрацию опухоли Т-лимфоцитами и активизирует цитотоксичность лимфоцитов селезенки. Получены доказательства того, что лечение гинзенозидом Rh<sub>2</sub> усиливает противоопухолевый иммунологический ответ, который может быть использован для терапии меланомы и ряда других опухолей [3, 17, 21].

Исследователи считают, что действие минорных гликозидов женьшеня на опухолевые и иммунокомпетентные клетки осуществляется трансмембранно в виде сети отдельных сигнальных путей, которые дивергируют на постмембранной и цитоплазматической стадиях трансдукции гликозидных сигналов [3]. Действие этих гликозидов направлено на координацию и регуляцию механизмов, способных осуществлять переключение внутриклеточных сигналов с одного пути на другой. Доза гликозида, его химическая структура и используемая биологическая модель определя-

ют выбор пути трансдукции сигнала: например, запуск апоптозной программы или отключение программ, ведущих к пролиферации клеток (т.е. цитостатический эффект). Активация цитотоксической активности иммунокомпетентных клеток в отношении опухолевых клеток может быть обусловлена активными видами кислорода, генерируемыми НАДН-оксидазой, NO-синтазой, а также другими внутриклеточными оксидазами, опосредующими антиметастатический эффект данных гликозидов [3].

Лютеолин (ЛТ), водонерастворимый 3,4,5,7-тетрагидроксифлавоон, является одним из наиболее изученных представителей биофлавоноидов. Изменяя активность различных ферментов, рецепторов-мишеней и сигнальных трансдукторных путей, ЛТ обладает широким спектром биологической активности. При изучении химического состава полифенольных соединений, выделенных из морских трав семейства *Zosteraceae* (*Zostera marina* и *Z. asiatica*), нами было установлено, что значительную часть полифенольного комплекса (около 40%) составляет 7,3'-дисульфат лютеолина [8]. При моделировании различных патологий *in vivo* нами была изучена фармакологическая активность дисульфата лютеолина (ДСЛ): противовоспалительный, кардиопротекторный, антидиабетический, антиоксидантный, гепатопротекторный, противовирусный эффекты в сравнении с ЛТ [5, 23]. ДСЛ оказался более удобной формой ЛТ, так как обладает хорошей водорастворимостью и может применяться как парентерально, так и перорально. Нами показано, что протективная фармакологическая активность ДСЛ при моделировании патологий углеводного (аллоксановый диабет) и липидного (гиперлипидемия) обмена, а также противовирусная активность в отношении вируса клещевого энцефалита заметно выше, чем у ЛТ [2, 4]. Поэтому представляло интерес провести исследования потенцирующего потенциала этого обладающего большим спектром биологической активности биофлавоноида при экспериментальной комбинированной противоопухолевой терапии ДР.

В последнее время начали появляться сообщения об обнаружении противоопухолевой активности препаратов, в фармакологическом спектре действия которых противоопухолевый эффект ранее никогда не фигурировал. Примером подобного препарата является сахароснижающий препарат метформин, давно с успехом применяющийся в практике лечения предиабетических состояний и диабета, для которого в последнее время установлена способность заметно снижать риск развития раковых заболеваний некоторых локализаций [16, 19, 20]. Мы посчитали интерес-

ным оценить возможное синергичное действие метформина в отношении ДР, а также использовали метформин в качестве препарата сравнения.

Способность различных химических соединений и лекарственных препаратов влиять на редокс-статус клеток может вносить существенный вклад в их лечебное действие [1, 7, 23]. Выяснение роли АФК в фармакологической активности и молекулярных механизмах действия природных редокс-активных соединений является особенно актуальной задачей, так как за последнее время появилось немало обоснованных суждений о потенциальной опасности в отношении канцерогенного риска при применении, например, средств с выраженной антиоксидантной активностью [18, 24]. Представления прежних лет о том, что применение антиоксидантов всегда дает позитивный фармакологический эффект, выражающийся в торможении развития признаков старения и канцерогенеза, требуют в настоящее время серьезной коррекции. Мы не являемся сторонниками экстремальной точки зрения, что применение антиоксидантов — это однозначный риск повышения канцерогенной опасности. Однако требуется проведение масштабных углубленных исследований механизмов действия редокс-активных соединений. Эти соединения могут являться представителями совершенно разных классов веществ, каждый из которых требует детального изучения и формирования в итоге показаний или противопоказаний для применения в схемах противоопухолевой терапии.

Данное исследование направлено на изучение в условиях лабораторного эксперимента возможности применения ряда препаратов природного происхождения (выделенных из морских гидробионтов ЭХА, СОК, ДСЛ, а также гинзенозида Rh2 и фармакопейного препарата метформина) как средств потенцирования противоопухолевого эффекта ДР. Рассмотрение вопроса об активности всех изученных нами в данной работе соединений как редокс-активных веществ, а также изучение некоторых цитокиновых параметров, важных для функционирования механизмов иммунологического противоопухолевого надзора, составляет содержание данной работы.

## Материалы и методы

Экспериментальные животные: 150 мышей линии CD-1 массой 20-22 г, самки. Животные получены из питомника лабораторных животных Филиала ИБХ РАН в г. Пущино (Московская обл.) и содержались в виварии ТИБОХ ДВО РАН.

Экспериментальная модель онкологического заболевания — перевивная асцитная карцинома Эрлиха. Клетки карциномы Эрлиха получены из банка клеточных культур ТИБОХ ДВО РАН.

Инокуляция опухоли проводилась путем внутрибрюшинного (в/бр) введения  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток в объеме 0,5 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ).

#### Препараты

В работе использовали: 1) Доксорубин (ДР) (Pharmachemie); 2) полученный путем органического синтеза индивидуальный гликозид женьшеня Rh2 (любезно предоставленный для работы сотрудником лаборатории органического синтеза природных соединений ТИБОХ ДВО РАН Атопкиной Л.Н.); 3, 4, 5) дисульфатированное производное лютеолина ДСЛ из морской травы *Zostera marina*, полигидроксинафтахинон эхинохром А (ЭХА) из морского ежа *Scaphechinus mirabilis*, смесь оксигенированных каротиноидов (СОК) из морской звезды *Patiria pectinifera* (выделены в лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН; 6) метформин (Глюкофаж – препарат метформина пролонгированного действия производства Merck serono, Германия). Структурные формулы всех использованных препаратов представлены на рисунке 1.

Методом газо-жидкостной хроматографии было определено, что основными компонентами СОК являются астаксантин – 46%, лютеин – 23%, зеаксантин – 23%, что отражено на рисунке 2.

**Экспериментальные группы животных (все животные кроме группы интактных мышей – с асцитной карциномой Эрлиха)**

Сформированы А: 8 групп животных (в каждой группе  $n = 10$ ) для краткосрочного 9-дневного эксперимента (оценка продукции АФК спленоцитами и содержания цитокинов в сыворотке крови): 1) интактные, 2) контроль – опухоленосители без лечения, 3) «ДР», 4) «ДР + Метформин», 5) «ДР + Rh2», 6) «ДР + ДСЛ», 7) «ДР + ЭХА», 8) «ДР + СОК», Б: 7 групп животных ( $n = 10$ ) для долгосрочного 68-дневного эксперимента (оценка параметров выживаемости): 1) контроль – опухоленосители без лечения, 2) «ДР», 3) «ДР + Метформин», 4) «ДР + Rh2», 5) «ДР + ДСЛ», 6) «ДР + ЭХА», 7) «ДР + СОК».

#### Дозы препаратов

ДР вводили в дозе 0,5 мг/кг массы тела, все остальные препараты – в дозе 10 мг/кг.

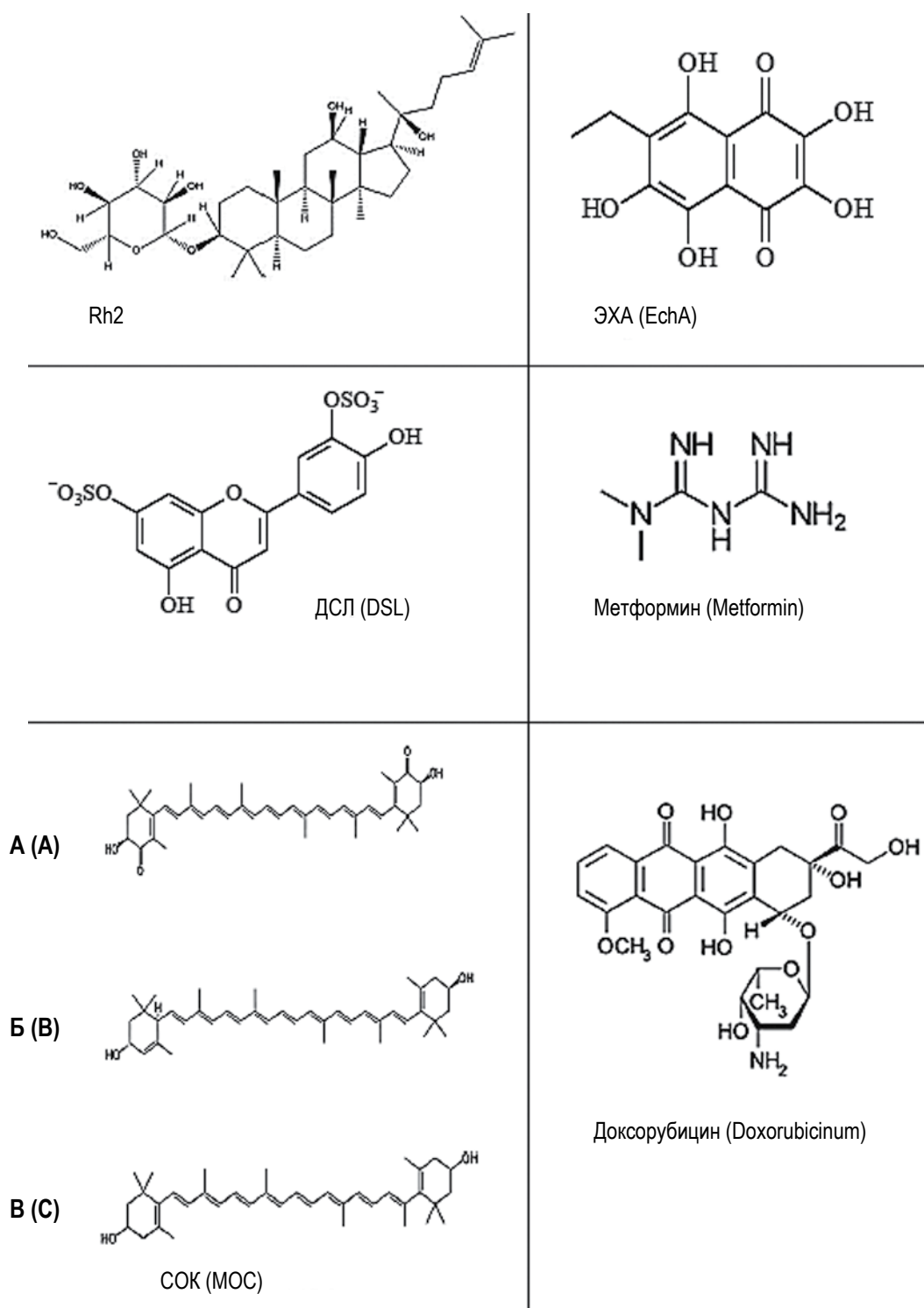
Схемы экспериментального лечения: лечение препаратами начинали через сутки после инокуляции опухоли и проводили путем 5-кратного в/бр (ДР и Rh2) или перорального введения (ЭХА, СОК, Метформин) в объеме 0,2 мл ФСБ с суточным интервалом. Терминацию эксперимента проводили, соответственно, через 9 (эксперимент А) и 68 суток (эксперимент Б) после инокуляции опухоли.

Рассчитывали % выживших животных и показатель средней длительности жизни ( $M \pm m$ ) в днях.

Реактивность иммунокомпетентных клеток селезенки к опухолевым клеткам и цитокиновые параметры сыворотки крови оценивали в условиях той же модели перевивной асцитной карциномы Эрлиха при лечении аналогично вышеописанному способу. Забой животных проводили на 9 сутки после инокуляции опухоли, когда опухоль имела средние размеры и фактов гибели животных-опухоленосителей не регистрировалось. Получали фракцию моноклеарных клеток селезенки, а также сыворотку крови экспериментальных животных.

Тест оценки интенсивности образования АФК использовали для определения активности иммунокомпетентных клеток после 1-часовой инкубации спленоцитов с опухолевыми клетками карциномы Эрлиха, инактивированными путем трехкратной процедуры замораживания-оттаивания. Инкубация проводилась в лунках черного непрозрачного 96-луночного планшета (Greiner, США) в течение 1 час при 37 °С. Соотношение спленоциты/опухолевые клетки составляло, соответственно,  $2 \times 10^4/10^3$  клеток на лунку планшета. Клетки вносили в объеме 0,2 мл на лунку в питательной среде ДМЕМ («Биолот», Россия). По окончании инкубации для оценки уровня продукции АФК в каждую лунку вносили 10 мкл рабочего разведения флуоресцентного зонда 2',7'-дихлорфлуоресцеин-диацетата (ДХФ-ДА) (Sigma, США), растворенного в ДМСО. Конечная концентрация красителя в инкубационной среде составляла 10 мкМ/мл. ДХФ-ДА проявляет селективную чувствительность к  $H_2O_2$  и супероксид-аниону  $O_2^-$  и, окисляясь в их присутствии внутри клетки, приобретает флуоресцентные свойства [22]. Оценку флуоресцентной активности проводили на планшетном ридере Fluoroscanner Ascent FL (LabSystems, США) при экстинкции 485 нм и эмиссии 538 нм, Scaling Factor: 1/1 и выражали в единицах флуоресценции.

Цитокины: содержание в сыворотке крови мышей интерлейкинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, интерферона  $IFN\gamma$ , фактора некроза опухоли  $TNF\alpha$  оценивали методом твердофазного неконкурентного гетерогенного иммуноферментного анализа с применением тест-систем ELISA Mouse Set (Bioscience, США) в соответствии с приложенной лот-специфической инструкцией. Использовали 96-луночные планшеты для ELISA (NUNC, Дания). Оптическую плотность измеряли на планшетном ридере ELS 808 (BioTeck, США) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов выражали в пг/мл. Для графического представления массива данных

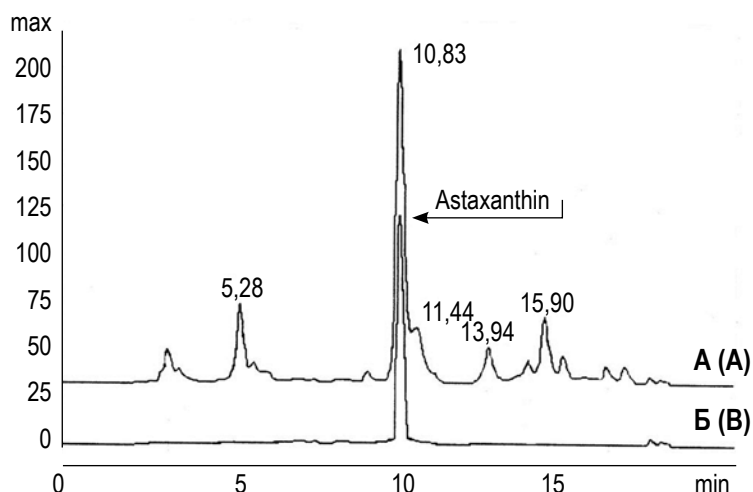


**Рисунок 1. Структурные формулы веществ, использованных в эксперименте**

Примечание. Rh2 – индивидуальный гликозид женьшеня, ЭХА – эхинохром А, ДСЛ – дисульфат лутеолина, СОК – смесь оксигенированных каротиноидов (А) астаксантин, (Б) лютеин, (В) зеаксантин.

Figure 1. Structural formulas of substances used in experiments

Note. Rh2, individual ginseng glycoside; EchA, Echinochrome A; DSL, luteolin disulfate; MOC, mixture of oxygenated carotenoids: (A) astaxanthin, (B) lutein, (C) zeaxanthin.



**Рисунок 2.** Хроматографические профили смеси оксигенированных каротиноидов (А) из морской звезды *Patiria pectinifera* и эталонного препарата астаксантин (Б)

Примечание. Содержание астаксантина в смеси оксигенированных каротиноидов составляет около 46%.

Figure 2. Chromatographic profiles of a mixture of oxygenated carotenoids (A) from *Patiria pectinifera* and a reference preparation of astaxanthin (B)

Note. Astaxanthin content makes about 46% in a total mixture of oxygenated carotenoids.

рассчитывали процент изменения концентрации цитокинов в опытной группе относительно соответствующих показателей интактных животных.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 11/0 с определением критерия достоверности Фишера—Стьюдента. Различия между средними считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Изучение показателей выживаемости

Анализ количества выживших мышей и средней длительности жизни животных с асцитной карциномой Эрлиха — контрольных и получавших монотерапию ДР и лечение ДР в сочетании с различными природными соединениями и метформин, показал следующие результаты (рис. 3).

В группе мышей с опухолью, не получавших никакого лечения, погибли все животные в сроки  $16 \pm 2$  дней после в/бр инокуляции опухоли. Применение ДР оказало выраженный лечебный эффект: на 68-й день эксперимента (дата прекращения наблюдений) выявлено 60% живых мышей, а средняя длительность жизни относительно срока наблюдения составила  $52,5 \pm 3,9$  дней ( $p < 0,01$ ). Потенцирующее действие на эффективность терапевтического эффекта ДР оказали препараты метформин, ЭХА, СОК и Rh2: регистрируется повышение процента выживших животных и увеличение средней длительности жизни. В то же время ДСЛ проявил негативный эффект при его комбинации с ДР: произошло до-

стоверное снижение как показателя выживших животных, так и показателя длительности жизни в сравнении с группой ДР ( $p < 0,05$ ).

### Анализ уровня продукции АФК

Индукцируемый ДР окислительный стресс вносит существенный вклад в его противоопухолевое действие. АФК действуют как прямые цитотоксические агенты, повреждая различные биомолекулы по механизму перекисного окисления, а также являются индукторами апоптоза в клетке, повышая активность редокс-чувствительных систем регуляции апоптозных программ [1, 11]. Для оценки влияния изученных препаратов на параметры АФК иммунокомпетентных клеток мы использовали флуоресцентный зонд ДХФ-ДА, способный проникать внутрь клетки и дезацетилироваться при участии внутриклеточных эстераз. Окисляясь преимущественно под действием  $H_2O_2$ , зонд образует интенсивно флуоресцирующий 2',7'-дихлорфлуоресцеин (ДХФ). Эта реакция позволяет оценить динамику изменения уровня внутриклеточных АФК, главным образом  $H_2O_2$  [22]. С использованием ДХФ-ДА была исследована способность спленоцитов, полученных через 9 дней после в/бр инокуляции мышам  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток, продуцировать АФК при контакте *in vitro* с целыми, но нежизнеспособными клетками карциномы, т.е. оценивалась общесистемная реактивность иммунокомпетентных клеток в модели прямого контакта *in vitro* с опухолевыми клетками (рис. 4).

По данным этого эксперимента не выявлено достоверных различий в реактивности сплено-

цитов к опухолевым клеткам в сравнении с контрольной группой мышей-опухоленосителей. Выявляется только некоторая тенденция повышенной чувствительности спленоцитов к опухолевым клеткам в группах «ДР + метформин» и «ДР + ДСЛ»: повышенная продукция АФК спленоцитами мышей этих групп при контакте с клетками карциномы Эрлиха в течение 1 часа. На этом основании можно предположить, что иммунокомпетентные клетки мышей этих групп более реактивны в отношении опухолевых клеток. Однако в отношении группы «ДР + ДСЛ» этот эффект не коррелирует с протективным эффектом (рис. 3). В то же время ни в одной из экспериментальных групп, в которых был выявлен положительный клинический эффект (группы «ДР», «ДР + метформин», «ДР + СОК», «ДР + ЭХА», «ДР + Rh2»), не определяется существенных сдвигов по показателю, характеризующему АФК-генерирующую активность.

#### Цитокиновые параметры сыворотки крови

При изучении содержания цитокинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  в сыворотке крови животных-опухоленосителей мы установили следующие изменения (рис. 5).

В контрольной группе мышей-опухоленосителей определяется умеренное повышение уровня IL-1, а также IL-2 и IL-10. Уровень цитокинов IL-12, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , значимых для противоопу-

холевой резистентности, практически не изменяется, оставаясь на уровне показателей интактных животных. В группе мышей, получавших лечение ДР, отмечается другая картина — отсутствие повышения титра провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6 на фоне увеличения содержания в сыворотке крови IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ . Исходя из этих данных, можно предположить позитивное значение таких сдвигов цитокиновых параметров в отношении клинической эффективности и других терапевтических схем. В группах «ДР + Rh2», «ДР + ЭХА» и «ДР + СОК», где был достигнут потенцирующий терапевтический эффект, мы также зарегистрировали повышение содержания IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ . Изменения содержания других цитокинов не позволяют выявить какой-либо четко выраженной тенденции.

В группе «ДР + Метформин», где также был установлен потенцирующий терапевтический эффект, установлено заметное снижение содержания большинства изученных цитокинов в сравнении с животными-опухоленосителями. Снижено содержание IL-1 и IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ . Это в целом можно трактовать как свидетельство подавления провоспалительных реакций в организме мышей с опухолью. При этом активность ключевого фактора роста Т-лимфоцитов — IL-2 — не подвергается супрессии.

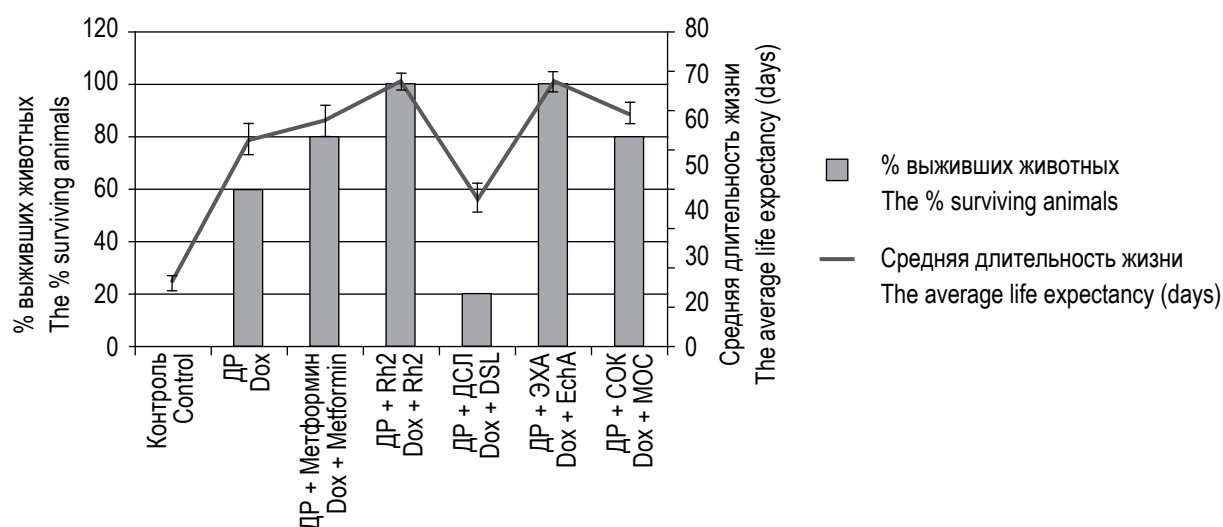


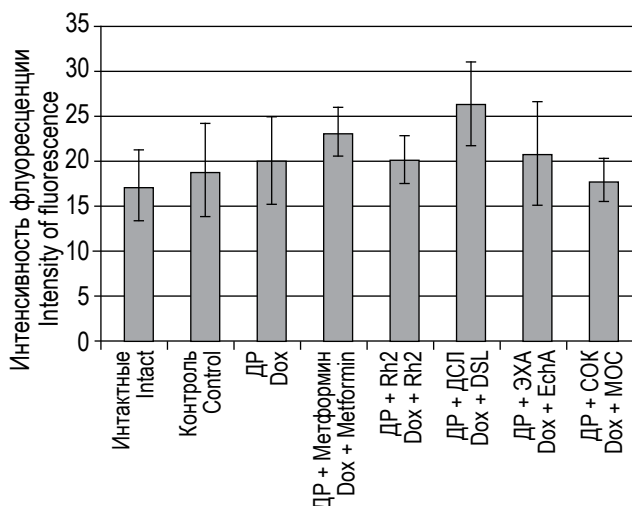
Рисунок 3. Показатели % выживших животных и средней длительности жизни мышей линии CD-1 с асцитным вариантом перевивной карциномы Эрлиха

Примечание. По оси абсцисс — экспериментальные группы животных. По оси ординат (слева) — количество выживших животных в %. По оси ординат (справа) — средняя длительность жизни животных-опухоленосителей (в днях после в/б инокуляции 5 млн клеток карциномы Эрлиха).

Figure 3. Percentage of surviving animals and average life-span of CD-1 mice with Ehrlich carcinoma ascites

Note. Abscissa, experimental groups of animals. Ordinate (left), number of surviving animals, % of total. Ordinate (right), the average life-span (days) of tumor-bearing animals (terms after inoculation with  $5 \times 10^6$  Ehrlich carcinoma cells).





**Рисунок 4. Реактивность спленоцитов мышей-опухоленосителей с асцитным вариантом перевивной карциномы Эрлиха в отношении нежизнеспособных клеток этой опухоли в условиях *in vitro***

Примечание. Тест с флуоресцентным зондом ДХФ-ДА. По оси абсцисс – экспериментальные группы животных. По оси ординат – показатели флуоресцентной активности.

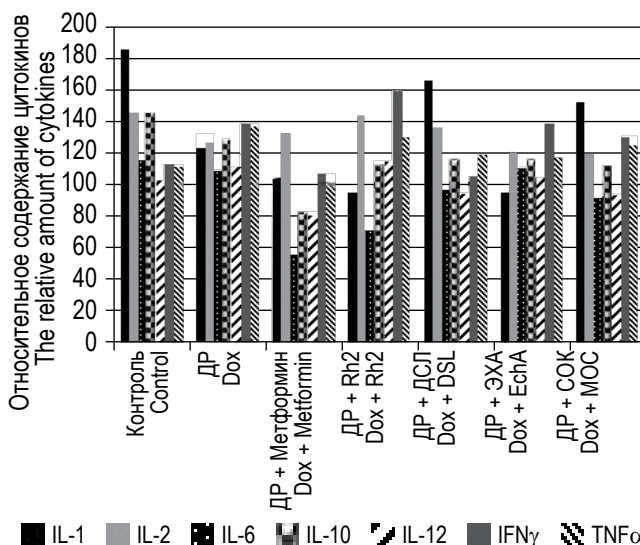
Figure 4. *In vitro* reactivity of splenocytes from tumor-bearing mice with Ehrlich carcinoma ascites against non-viable cells of the tumor

Note. A test with a fluorescent DXF-DA probe. Abscissa, experimental groups of animals. Ordinate, arbitrary fluorescence intensity.

## Обсуждение

Установлена принципиальная возможность повысить эффективность противоопухолевой терапии ДР при использовании в качестве средств дополнительной терапии самых разнообразных соединений – полифенолов и оксикаротиноидов, полученных из морских гидробионтов, индивидуального гинзенозида Rh2 и сахароснижающего бигуанида метформина. Определяется существенный прирост показателей выживаемости и длительности жизни животных с моделированным онкологическим процессом (рис. 3). Причем, если для метформина и Rh2 имеются данные о наличии собственной некоторой противоопухолевой активности, проявляющейся при монотерапии этими препаратами [10, 20, 21, 25], то для ЭХА, СОК и ДСЛ, позиционируемых как редокс-соединения, обладающие выраженной антиоксидантной активностью [6, 8, 9, 12, 15], противоопухолевых свойств в наших исследованиях не установлено (данные не представлены).

В нашем эксперименте ЭХА и СОК проявили потенцирующий эффект в отношении противоопухолевой активности ДР, тогда как ДСЛ резко ее снизил. Можно предположить, что этот нега-



**Рисунок 5. Относительное содержание цитокинов в сыворотке крови мышей с асцитной карциномой Эрлиха в сравнении с интактными животными**

Примечание. По оси абсцисс – экспериментальные группы животных. По оси ординат – относительное содержание цитокинов в % по отношению к показателям интактных животных (принятых за 100%)

Figure 5. Relative contents of cytokines in the serum of mice with ascitic Ehrlich carcinoma as compared to intact animals

Note. Abscissa, experimental groups of animals. Ordinate, relative content of cytokines (per cent of appropriate indices in normal animals taken as 100%).

тивный эффект является следствием «гашения» АФК, роль которых для реализации противоопухолевого эффекта ДР считается важной [11]. Кроме того, известно, что для препаратов лютеолина характерна активность фитоэстрогенов [4], обладающих большим спектром биологической активности и способных, в частности, стимулировать процессы пролиферации некоторых типов клеток. Поскольку в нашем эксперименте использовались мыши-самки, было бы интересным сравнить эффект модуляции активности ДР при терапии препаратом ДСЛ мышей-самцов. Результаты предварительно проведенных нами экспериментов показывают, что такие гендерные различия действительно имеются (данные не представлены). Это еще больше усложняет проблему применения подобных препаратов (позиционируемых как мощные антиоксиданты, но реально обладающих более широким и часто недостаточно изученным спектром биологической активности) в качестве средств потенцирования противоопухолевой терапии. Имеющие место опасения в отношении повышения канцерогенного риска при применении антиоксидантов [18, 24] объясняются именно недостаточной изученностью подобных средств, в группу которых включаются самые разнообразные соединения:

биофлавоноиды, полифенолы, каротиноиды, лигнаны, различные витамины, стильбены и т.п. Причем, по нашей оценке, в группу «мощных антиоксидантов» нередко произвольно включают соединения, способные реализовывать при некоторых условиях и противоположный прооксидантный эффект. Таким образом, требуется более глубокое изучение подобных препаратов с целью определения спектра их биологической активности для более рационального включения их в схемы комбинированной противоопухолевой терапии. По результатам нашей работы, можно предположить что перспективными препаратами для продолжения их исследования как средств потенцирования эффективности противоопухолевой химиотерапии являются RH2, ЭХА, СОК, а также метформин.

Оценивая результаты исследования *in vitro* реактивности спленоцитов по отношению к «нагрузке» опухолевыми клетками, отметим, что нам не удалось подтвердить предполагаемое *a priori* усиление иммунореактивности иммунокомпетентных клеток у животных, получающих терапию ДР как в виде монотерапии, так и в комбинации с препаратами потенцирования. Различия между экспериментальными группами определяются только на уровне статистически недостоверных тенденций (рис. 4). В серии других экспериментов с применением этого флуоресцентного зонда мы убеждались в его исключительно высокой чувствительности к АФК, поэтому вышеописанные результаты позволяют однозначно говорить об ареактивности, инертности клеток селезенки мышей-опухоленосителей к клеткам этой опухоли, т.е. об отсутствии активации общесистемного иммунного ответа к клеткам развивающейся опухоли. Можно предположить, что более заметные проявления реактивности к опухолевым клеткам могут иметь место на локальном уровне, т.е. в брюшной полости при прямом контакте иммунокомпетентных клеток с клетками асцитной опухоли. Очевидно, что для проверки этого положения необходим соответствующий эксперимент с оценкой АФК-продуцирующей активности иммунокомпетентных клеток брюшной полости по отношению к опухолевым клеткам асцитной карциномы.

Анализируя результаты, представленные на рисунке 4, тем не менее нужно обратить внимание на особенно заметную тенденцию к усилению АФК-продукции клеток селезенки мышей, получавших в качестве средства потенцирования ДСЛ. Эта группа является единственной, статистически достоверно отличающейся ( $p < 0,05$ ) по уровню этого показателя от интактных животных. Величина этого показателя не является достаточной, чтобы говорить об усилении цитотоксического противоопухолевого потенциала

спленоцитов мышей, получавших ДСЛ. Скорее, это отражает некоторую антиген-специфическую активацию спленоцитов. Требуется проведение дополнительных исследований для определения иммунофенотипа клеток, отвечающих на контакт с опухолевыми клетками подобным образом. Понятно, что исход подобной активации будет принципиально разным в том случае, если такой активации подвергаются СТЛ, НК-лимфоциты или Treg. Таким образом, полученные нами результаты подчеркивают обоснованность мнения о том, что представления о принципиальной канцерогенной опасности антиоксидантов являются не совсем корректными. Каждая из групп соединений, относимых к антиоксидантам, требует продолжения масштабных исследований их фармакологической активности на молекулярном и других уровнях. Актуальность такой работы подтверждается тем, что некоторые из этих соединений могут действительно оказать потенцирующий эффект на проводимую противоопухолевую терапию, что и показано в нашей работе. Этот эффект может заключаться, например, в защите мембранных структур и других биомолекул от альтергирующего действия свободных радикалов, в активации процессов клеточной дифференцировки (что хорошо известно, например, в отношении транс-ретиноевой кислоты), модуляции апоптозных программ и механизмов иммунологического противоопухолевого надзора.

Подобные соединения потенциально могут выступать и в роли индукторов синтеза различных регуляторных и эффекторных цитокинов. Общесистемная регуляция функций иммунной системы, и механизмов иммунологического противоопухолевого надзора в том числе, в значительной степени обусловлена цитокиновыми сетями регуляции. Это очень важный аспект изучения механизмов канцерогенеза и противоопухолевого иммунитета с фундаментальной точки зрения, также имеющий очевидное практическое значение. Выявление цитокиновых сдвигов в организме-опухоленосителе может быть важным для таргет-специфических подходов к модуляции иммунной системы с целью повышения ее противоопухолевого потенциала. Клиническая эффективность в схеме биотерапии рака таких цитокинов, как рекомбинантные препараты IL-1, IL-2, интерфероны различных классов, TNF, демонстрирует перспективность такого подхода. Однако ввиду большой сложности, многокомпонентности, плейотропности и полифункциональности многих компонентов цитокиновых сетей эти подходы до сих пор плохо охарактеризованы и недостаточно оптимизированы. В связи с чем отсутствуют четкие алгоритмы для определения показаний и формирования

схем биотерапии опухолей на основе применения препаратов цитокинов.

В нашей работе изучение цитокиновых параметров по семи различным цитокинам: IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  выявило неоднозначную картину. Не выявлено значительных по величине сдвигов содержания этих цитокинов в сыворотке крови мышей в сроки на 9 сутки после в/бр инокуляции  $3 \times 10^6$  опухолевых клеток (рис. 5). Очевидно, что общесистемный уровень содержания цитокинов в условиях нашего эксперимента является недостаточно информативным, поскольку основные события на данном этапе онкологического процесса разворачиваются *in situ* в брюшной полости (что требует соответствующего изучения). Тем не менее некоторые тенденции определяются достаточно четко при экстраполяции этих данных по цитокинам на параметры выживаемости в более отдаленные сроки в 68 суток после инокуляции опухоли (рис. 3). В экспериментальных группах животных с выраженным лечебным эффектом ДР выявлено отсутствие повышения титра провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6 на фоне увеличения содержания в сыворотке крови IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ . Можно предположить позитивное значение таких сдвигов цитокиновых параметров в отношении клинической эффективности других терапевтических схем. В группах «ДР + Rh2», «ДР + ЭХА» и «ДР + СОК», где был достигнут потенцирующий терапевтический эффект, также зарегистрировано повышение содержания IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ . Изменения содержания других цитокинов не позволяют выявить каких-либо четко выраженных закономерностей, что, очевидно, определяется большими различиями в природе и механизмах действия изучаемых соединений (гликозидов, полифенолов, оксикаротиноидов).

В группе «ДР + метформин», где также был установлен потенцирующий терапевтический эффект, сдвиги цитокиновых параметров имеют особенности, характеризующиеся заметным снижением содержания большинства изученных цитокинов в сравнении с контрольными животными-опухоленосителями. Снижено содержание IL-1 и IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ . Это в целом можно трактовать как свидетельство подавления провоспалительных реакций в организме мышей с опухолью. При этом активность IFN $\gamma$  и ключевого фактора роста Т-лимфоцитов — IL-2 — не подвергается супрессии.

Имеет ли потенцирующий противоопухолевый эффект метформина значимую связь с такими цитокиновыми сдвигами или же цитокиновые сдвиги являются только проявлением иммуносупрессии вследствие снижения энергетического метаболизма под влиянием этого сахароснижающего бигуанида? Данный вопрос на этом эта-

пе исследований не имеет корректного ответа и требует проведения дополнительных исследований. Отметим, что отсутствие факта снижения реактивности спленоцитов мышей этой группы в отношении клеток опухоли (рис. 4) позволяет предположить нелинейность характера индуцируемых в ответ на развитие опухоли реакций.

Исходя из представленных результатов, можно предположить перспективным вариант противоопухолевой терапевтической схемы с применением ДР, метформина и какого-либо из препаратов, обладающих выраженной интерферон-индуцирующей активностью.

Необходимо также подчеркнуть, что показавшие способность потенцировать эффективность противоопухолевой химиотерапии препараты ЭХА, СОК и метформина оказались эффективными при пероральном употреблении, что дополнительно подчеркивает перспективность их дальнейшего исследования.

## Выводы

1) Применение препаратов ЭХА, СОК, Rh2 совместно с доксорубицином в схеме краткосрочной терапии экспериментального опухолевого процесса у мышей способно обеспечить потенцирующий эффект, т.е. повышение эффективности противоопухолевой терапии.

2) Применение метформина совместно с доксорубицином в схеме краткосрочной терапии экспериментального опухолевого процесса способно обеспечить потенцирующий противоопухолевый эффект.

3) Потенцирующий противоопухолевый эффект ЭХА, СОК, Rh2 коррелирует с общесистемным повышением содержания IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$ , на фоне снижения содержания провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-6.

4) Применение ДСЛ в использованной концентрации (10 мг/кг массы тела) совместно с доксорубицином приводит к негативному эффекту — снижению эффективности противоопухолевой терапии. Данный эффект не обусловлен отсутствием общесистемной реактивности иммунокомпетентных клеток к опухоли и, видимо, не связан с антиоксидантной активностью ДСЛ.

5) Потенцирующий противоопухолевый эффект метформина в условиях экспериментального опухолевого процесса у мышей имеет механизмы, не связанные с активацией цитокиновых сетей регуляции: определяется значительное снижение общесистемной концентрации IL-1 и IL-6, IL-10, IL-12, TNF $\alpha$ . Это в целом можно трактовать как свидетельство значительного подавления провоспалительных реакций в организме мышей с опухолью.

## Список литературы / References

1. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии, 2014. Т. 54. С. 299-348. [Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biochemistry*, 2014, Vol. 54, pp. 299-348. (In Russ.)]
2. Крылова Н.В., Попов А.М., Леонова Г.Н. Антиоксиданты как потенциальные антивирусные агенты при флавивирусных инфекциях // Антибиотики и химиотерапия, 2016. Т. 61, № 5-6. С. 25-31. [Krylova N.V., Popov A.M., Leonova G.N. Antioxidants as potential antiviral agents for flavivirus infections. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2016, Vol. 61, no. 5-6, pp. 25-31. (In Russ.)]
3. Попов А.М. Противоопухолевая и антиметастатическая активность моногликозидов женьшеня: современные представления // Биофармацевтический журнал, 2011. Т. 3, № 5. С. 3-8. [Popov A.M. Antineoplastic and antimetastatic activity of ginseng monoglycosides: modern concepts. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2011, Vol. 3, no. 5, pp. 3-8. (In Russ.)]
4. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Сравнительная оценка фармакологической активности лутелина и 7,3'-дисульфата лутеолина при моделировании разных патологий // Биофармацевтический журнал, 2011. Т. 3, № 4. С. 27-33. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A. The comparative evaluation of the pharmacological activity of luteolin and luteolin 7,3'-disulfate in the modeling of various pathologies. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2011, Vol. 3, no. 4, pp. 27-33. (In Russ.)]
5. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Механизмы протективной фармакологической активности флавоноидов // Биофармацевтический журнал, 2012. Т. 4, № 4. С. 27-41. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A. Mechanisms of protective pharmacological activity of flavonoids. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2012, Vol. 4, no. 4, pp. 27-41. (In Russ.)]
6. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Перспективы клинического применения астаксантина и других оксигенированных каротиноидов // Биофармацевтический журнал, 2013. Т. 5, № 5. С. 13-30. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A. Prospects for the clinical use of astaxanthin and other oxygenated carotenoids. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2013, Vol. 5, no. 5, pp. 13-30. (In Russ.)]
7. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Цыбульский А.В., Штода Ю.П., Климович А.А., Шнайдер К.Д., Артюков А.А. Оценка лечебной активности различных природных соединений при моделировании аллергического контактного дерматита // Биофармацевтический журнал, 2014. Т. 6, № 5. С. 3-10. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Tsybulsky A.V., Shtoda Yu.P., Klimovich A.A., Schneider K.D., Artyukov A.A. Evaluation of the therapeutic activity of various natural compounds in the modeling of allergic contact dermatitis. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2014, Vol. 6, no. 5, pp. 3-10. (In Russ.)]
8. Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А. Механизмы протективного действия эхинохрома А при различных патологиях // Биофармацевтический журнал, 2016. Т. 8, № 4. С. 7-13. [Popov A.M., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A. Mechanisms of the protective effect of echinochrome A for various pathologies. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2016, Vol. 8, no. 4, pp. 7-13. (In Russ.)]
9. Попов А.М., Осипов А.Н., Корепанова Е.А., Кривошапко О.Н., Артюков А.А., Климович А.А. Изучение антиоксидантной и мембранной активности эхинохрома А с использованием различных модельных систем // Биофизика, 2017. Т. 62, № 3. С. 509-517. [Popov A.M., Osipov A.N., Korepanova E.A., Krivoshapko O.N., Artyukov A.A., Klimovich A.A. The study of antioxidant and membrane activity of echinochrome A using various model systems. *Biofizika = Biophysics*, 2017, Vol. 62, no. 3, pp. 509-517. (In Russ.)]
10. Разина Т.Г., Крылова С.Г., Амосова Е.Н., Зуева Е.П., Лопатина К.А., Попов А.М., Атопкина Л.Н., Козловская Э.П. Влияние гинзенозида Rh2 на развитие перевиваемых опухолей животных и эффективность химиотерапии // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2010. Т. 73, № 4. С. 27-30. [Razina T.G., Krylova S.G., Amosova E.N., Zueva E.P., Lopatina K.A., Popov A.M., Atopkina L.N., Kozlovskaya E.P. The influence of ginsenoside Rh2 on the development of transplanted animal tumors and the effectiveness of chemotherapy. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2010, Vol. 73, no. 4, pp. 27-30. (In Russ.)]
11. Саенко Ю.В., Шутов А.М. Изучение генотоксических свойств доxorубина с использованием клеточной модели *Saccharomyces cerevisiae* // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2007. Т. 70, № 3. С. 29-32. [Saenko Yu.V., Shutov A.M. The study of the genotoxic properties of doxorubicin using the *Saccharomyces cerevisiae* cell model. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2007, Vol. 70, no. 3, pp. 29-32. (In Russ.)]
12. Цыбульский А.В., Попов А.М., Артюков А.А., Костецкий Э.Я., Кривошапко О.Н., Мазейка А.Н., Козловская Э.П. Сравнительное изучение лечебного действия лутеолина, розмариновой кислоты и эхинохрома А при экспериментальной кардиопатологии, индуцированной стрессом // Биомедицинская химия, 2011. Т. 57, № 3. С. 314-325. [Tsybulsky A.V., Popov A.M., Artyukov A.A., Kostetsky E.Y., Krivoshapko O.N., Maseyka A.N., Kozlovskaya E.P. The comparative study of the medical action of luteolin, rosmarinic acid and echinochrome A at experimental stress-induced cardiopathology. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2011, Vol. 57, no. 3, pp. 314-325. (In Russ.)]

13. Цыбульский А.В., Попов А.М., Кривошапко О.Н., Артюков А.А., Козловская Э.П., Богданович Л.Н., Крыжановский С.П., Блинов Ю.Г. Влияние эхинохрома А на биохимические параметры крови у больных с кардиопатологией // Биомедицинская химия, 2014. Т. 60, № 1. С. 115-124. [Tsybulsky A.V., Popov A.M., Artiukhov A.A., Krivoshapko O.N., Kozlovskaya E.P., Bogdanovich L.N., Kryzhanovsky S.P., Blinov I.G. The effects of preparation «Histochrome» in biochemical parameters of blood for patients with cardiopathologies. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2014, Vol. 60, no. 1, pp. 115-124. (In Russ.)]
14. Ambati R.R., Phang S.-M., Ravi S., Aswathanarayana R.G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. A Review. *Marine Drugs*, 2014, Vol. 12, no. 1, pp. 128-152.
15. Artyukov A.A., Popov A.M., Tsybulsky A.V., Krivoshapko O.N., Polyakova N.V. Pharmacological activity of echinochrome a alone and in the biologically active additive timarin. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2013, Vol. 7, pp. 237-242.
16. Evans J.M., Donnelly L.A., Emslie-Smith A.M., Alessi D.R., Morris A.D. Metformin and reduced risk of cancer of 25-37% in diabetic patients. *British Medical Journal*, 2005, Vol. 330, pp. 1304-1305.
17. Feng Z., Zhao L., Luo L., You Z., Li D., Xia J., Zuo G., Chen D. Effect of ginsenoside Rh2 on the migratory ability of HepG2 liver carcinoma cells: Recruiting histone deacetylase and inhibiting activator protein 1 transcription factors. *Molecular Medicine Reports*, 2014, Vol. 10, pp. 1779-1785.
18. Kaiser J. Antioxidants could spur tumors by acting on cancer gene. *Science*, 2014, Vol. 343, no. 6170, p. 477.
19. Li D., Yeung S.C., Hassan M.M., Konopleva M., Abbruzzese J.L. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 137, no. 2, pp. 482-488.
20. Libby G., Donnelly L.A., Donnan P.T., Alessi D.R., Morris A.D., Evans J.M. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2009, Vol. 32, pp. 1620-1625.
21. Liu S., Chen M., Li P., Wu Y., Chang C., Qiu Y., Cao L., Liu Z., Jia C. Ginsenoside Rh2 inhibits cancer stem-like cells in skin squamous cell carcinoma cell. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2015, Vol. 36, pp. 499-508.
22. Loetchutinat C., Kothan S., Dechsupa S., Meesungnoen J., Jay-Gerin J.P., Mankhetkorn S.J. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 2005, Vol. 72, no. 2-3, pp. 323-331.
23. Popov A.M., Krivoshapko O.N. Protective effects of polar lipids and redox-active compounds from marine organisms at modeling of hyperlipidemia and diabetes. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 2013, Vol. 6, pp. 543-550.
24. Sayin V.I., Ibrahim M.X., Larsson E., Nilsson J.A., Lindahl P., Bergo M.O. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. *Science Translational Medicine*, 2014, Vol. 6, pp. 221-225.
25. Shin H.R., Kim J.Y., Yun T.K., Morgan G., Vainio H. The cancer-preventive potential of Panax ginseng: a review of human and experimental evidence. *Cancer Causes and Control*, 2000, Vol. 11, no. 6, pp. 565-576.

---

**Авторы:**

**Цыбульский А.В.** — к.м.н., доцент кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Попов А.М.** — д.б.н., руководитель группы изучения биологически активных добавок ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения РАН; профессор кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Климович А.А.** — аспирант группы изучения биологически активных добавок ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, Россия

---

**Authors:**

**Tsybulsky A.V.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Biochemistry, Microbiology and Biotechnology Department, Natural Sciences School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Popov A.M.**, PhD, MD (Biology), Head, Group of Study Biologically Active Supplements, Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Biochemistry, Microbiology and Biotechnology Department, Natural Sciences School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Klimovich A.A.**, Graduate Student, Group of Study Biologically Active Supplements, Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

**Артюков А.А.** — д.б.н., руководитель лаборатории биотехнологии ФГБУН «Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения РАН, г. Владивосток, Россия

**Artyukov A.A.**, PhD, MD (Biology), Head, Biotechnology Laboratory, Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

**Костецкий Э.Я.** — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Kostetsky E.Ya.** — PhD, MD (Biology), Professor, Head, Biochemistry, Microbiology and Biotechnology Department, Natural Sciences School, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

**Веселова М.Д.** — бакалавр кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

**Veselova M.D.**, Bachelor, Biotechnology Laboratory, Pacific Ocean G.B. Elyakov Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 22.06.2017  
Отправлена на доработку 13.07.2017  
Принята к печати 18.07.2017

Received 22.06.2017  
Revision received 13.07.2017  
Accepted 18.07.2017