

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Климович Анна Анатольевна
Биомедицинские свойства
фармакологически перспективных вторичных метаболитов растений и
морских организмов

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание учёной
степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Попов А.М.

Владивосток – 2020

Оглавление	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1 ПРИРОДНЫЕ ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ДЕЙСТВУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ.....	12
1.1.2 Основные молекулярные мишени низкомолекулярных биорегуляторов.	14
1.2 АЛКАЛОИДЫ КАК КЛАСС ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	20
1.2.1 Строение, классификация и медицинское применение алкалоидов	20
1.2.2 Медико-биологические свойства и особенности противовоспалительного действия хиназолинового алкалоида триптантрина	22
1.2.3 Триптантрин и его производные как противоопухолевые агенты	28
1.3 МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЙ СВОЙСТВА ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ ЖЕНЬШЕНЯ	30
1.3.1 Тритерпеновые гликозиды как основные действующие вещества корня женьшеня <i>Panax ginseng</i>	30
1.3.2 Особенности фармакологического действия гинзенозида Rh2	32
1.4 СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И БИОМЕДИЦИНСКИЕ СВОЙСТВА КАРОТИНОИДОВ	38
1.4.1 Общая характеристика каротиноидов: классификация, биодоступность, физиологические функции	38
1.4.2. Медико-биологические свойства оксигенированных каротиноидов, на примере астаксантина	41
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.2 ОЦЕНКА МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИССЛЕДУЕМЫХ БАВ	48
2.2.1 Экспериментальные животные	48
2.2.2 Иммунологические и биохимические анализы	48
2.2.3 Модель асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха	49
2.2.4 Модель солидного варианта аденокарциномы Эрлиха	49
2.2.5 Экспериментальное моделирование кожного канцерогенеза.....	51
2.2.6 Экспериментальная модель аллергического контактного дерматита	52

2.2.7 Экспериментальная модель системного воспаления	53
2.2.8 Экспериментальная модель лоскутных и термических ран	54
2.2.9 Оценка влияния Rh2 на редокс-статус различных клеточных культур	54
2.2.10 Оценка влияния Rh2 на активность Nrf2 и HIF-1 α в люциферазном репортерном анализе <i>in vitro</i>	55
2.2.11 Сравнительная оценка антипролиферативной активности мостотрина и триптантрина в отношении опухолевых клеток <i>in vitro</i>	57
2.2.12 Статистическая обработка данных	58
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	59
3.1 ДЕРМАТОПРОТЕКТОРНОЕ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРИПТАНТРИНА	59
3.1.1 Противоаллергическая активность мазевого препарата «Коурохитин» ...	59
3.1.2 Оценка ранозаживляющего действия препарата «Коурохитин» в отношении термических и лоскутных ран	62
3.1.3 Оценка противовоспалительной активности триптантрина на модели системного воспаления	64
3.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПОТЕНЦИАЛА МОСТОТРИНА	66
3.2.1 Сравнительное исследование антипролиферативной активности мостотрина и триптантрина в отношении ряда линий опухолевых клеток	66
3.2.2 Определение острой токсичности мостотрина	67
3.2.3 Эффективность комбинированной терапии доксорубицина с мостотрином при моделировании асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха	68
3.3 ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГИНЗЕНОЗИДА Rh2 В ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	69
3.3.1 Эффективность комбинированной терапии доксорубицина с Rh2 при моделировании асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха	70
3.3.2 Влияния комбинированной терапии Rh2 с доксорубицином на иммунологический статус организма при опухолевом процессе	72
3.3.3 Противоопухолевая активность Rh2 при комбинированной терапии с ДР на модели солидного варианта аденокарциномы Эрлиха	73
3.3.4 Исследование редокс-свойств Rh2 <i>in vitro</i>	77
3.3.5 Оценка влияния Rh2 на активность Nrf2 и HIF-1 α	79

3.3.6 Роль мембранотропной и прооксидантной активности в молекулярных механизмах противоопухолевого и иммуномодулирующего действия Rh2	82
3.4 ПРИМЕНЕНИЕ СМЕСИ ОКСИГЕНИРОВАННЫХ КАРОТИНОИДОВ ИЗ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ P. PECTINIFERA В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	88
3.4.1 Оценка канцерпревентивной активности смеси оксигенированных каротиноидов	89
3.4.2 Оценка противоаллергической эффективности маевой формы смеси оксигенированных каротиноидов на модели аллергического контактного дерматита.....	95
3.4.3 Противовоспалительная активность смеси оксигенированных каротиноидов при моделировании системного воспаления	97
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
5 ВЫВОДЫ	101
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	102

Список сокращений

	Сокращение	Полное название
1.	АКД	Аллергический контактный дерматит
2.	АК	Астаксантин
3.	АОА	Антиоксидантная активность
4.	АФА	Активные формы азота
5.	АФК	Активные формы кислорода
6.	БАВ	Биологически активные вещества
7.	БАД	Биологически активные добавки
8.	ГПК	Глутатионпероксидаза
8.	ГМ-КСФ	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
10.	ДМБА	7,12-диметилбензантрацен
11.	ДФБ	2,4-динитрофторбензол
12.	ДР	Доксорубицин
13.	ДМСО	Диметилсульфоксид
14.	ИФА	Иммуноферментный анализ
15.	ИЛ-1,2,4,6,10,17	Интерлейкины-1,2,4,6,10,17 соответственно
16.	ИФН- γ	Интерферон-гамма
17.	КАТ	Каталаза
18.	ЛОГ	Липоксигеназа
19.	ЛПС	Липополисахарид
20.	МТ	Мостотрин
21.	МДА	Малоновый диальдегид
22.	ММР	Матричные металлопротеиназы
23.	Н2ДХФДА	2',7'-дигидрохлорфлуоресцеин-диацетат
24.	ППД	Протопанаксадиол
25.	ППТ	Протопанаксатриол
26.	СОК	Смесь оксигенированных каротиноидов
27.	СВ	Системное воспаление
28.	СОД	Супероксиддисмутаза
29.	СПЖ	Средняя продолжительность жизни

30.	ТР	Триптантрин
31.	ТБК	Тиобарбитуровая кислота
32.	УПЖ	Уровень продолжительности жизни
33.	ФНО- α	Фактор некроза опухоли
34.	ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
35.	ЦОГ	Циклооксигеназа
36.	AhR	Арильный углеводородный рецептор
37.	AP-1	Активирующий протеин-1
38.	ARE	Антиоксидант-респонсивный элемент
39.	ASK	Регулирующая апоптотические сигналы киназа
40.	APAF-1	Апоптотическая протеаза – 1
41.	AQP	Аквапорин
42.	ERK	Внешние сигнал-регулируемые киназы
43.	MAPK	Митоген-активируемая протеинкиназа
44.	Nrf2	Ядерный фактор 2
45.	NK	Натуральные киллеры
46.	NF- κ B	Ядерный фактор- κ B
47.	Rh2	Гинзенозид корня женьшеня
48.	GRE	Глюкокортикоид-респонсивный элемент
49.	PGE2	Простагландин E2
50.	HIF-1 α	Фактор, индуцируемый гипоксией
51.	iNOS	индуцибельная синтаза оксида азота
52.	IAP	Белки ингибиторы апоптоза
53.	JNK	Стресс-активируемая протеинкиназа
54.	JAK	Тирозиновые янусные киназы
55.	STAT	Сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции
56.	TLR	Толл-подобные рецепторы
57.	VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов
58.	VEGFR	Рецептор VEGF
59.	XRE	Ксенобиотик-респонсивный элемент

Введение

С каждым годом всё большую актуальность приобретает проблема поиска и разработки эффективных средств лечения и профилактики наиболее распространенных патологий, негативно влияющих на качество жизни современного человека. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в области фармакологии и медицины, применение большинства существующих на сегодняшний день лекарственных препаратов до сих пор представляет большую проблему из-за их недостаточной эффективности и множества регистрируемых побочных эффектов. Поэтому важным и перспективным направлением является разработка новых лечебно-профилактических препаратов, биологически активных добавок (БАД), а также средств дополнительной терапии, повышающих эффективность и безопасность применения известных лекарственных агентов. Ими могут стать инновационные терапевтические средства, созданные на основе биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения, среди которых особое внимание исследователей привлекают вторичные метаболиты растений и морских организмов, которые проявляют выраженную фармакологическую активность, не оказывая при этом характерных для многих лекарственных препаратов побочных токсических эффектов.

В течение ряда лет нами проводился отбор и изучение медико-биологических свойств различных вторичных метаболитов. На экспериментальных животных моделях, имитирующих различные патологии человека, и дополняющих их тестах *in vitro* был проведен предварительный скрининг многочисленных природных БАВ и их синтетических аналогов, который позволил выявить ряд соединений, обладающих высокой терапевтической активностью. В круг фармакологически перспективных веществ вошли агенты, представляющие разные классы химических соединений, а именно: Rh2 – гликозид корня женьшеня *Panax ginseng*, смесь оксигенированных каротиноидов (СОК) (астаксантин, лютеин и зеаксантин) из морской звезды *Patiria pectinifera*, хиназолиновый алкалоид триптантрин (ТР) и его водорастворимое производное мостотрин (МТ), полученные путем органического синтеза. В ходе предварительных исследований были получены данные относительно противоаллергической, противовоспалительной, дерматопротекторной и противоопухолевой активности представленных соединений и проведено четкое ранжирование по их медико-биологическим свойствам.

Цель и задачи исследования

Основная цель – Провести углубленное исследование биомедицинских свойств указанных выше БАВ, а также определить возможные механизмы их фармакологического действия на клеточном и молекулярном уровне с использованием различных экспериментальных моделей *in vivo* и дополняющих их методов биотестирования *in vitro*.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить дерматопротекторное действие мазевого препарата «Коурохитин», главным действующим началом которого является ТР, на экспериментальных моделях кожных патологий *in vivo*, а именно: лоскутных и ожоговых ран и аллергического контактного дерматита, вызванного 2,4-динитрофторбензолом;
2. Определить выраженность противовоспалительной активности ТР с использованием экспериментальной модели системного воспаления, индуцированного липополисахаридом *in vivo*;
3. Проанализировать противоопухолевую активность водорастворимого производного ТР – МТ при изучении его антипролиферативного действия в отношении ряда линий опухолевых клеток *in vitro* и при экспериментальном моделировании асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха *in vivo*;
4. Определить особенности химиотерапевтического действия Rh2 в сочетании с известным противоопухолевым антибиотиком антрациклинового ряда доксорубицином на экспериментальной опухолевой модели асцитного и солидного вариантов аденокарциномы Эрлиха *in vivo*;
5. Установить влияние Rh2 на редокс-статус опухолевых и иммунных клеток *in vitro* с помощью селективного флуоресцентного индикатора внутриклеточного содержания активных форм кислорода – 2',7'-дигидрохлорфлуоресцеин-диацетата;
6. С использованием генно-инженерных репортерных технологий оценить влияние Rh2 на функциональную активность ключевых факторов транскрипции двух сигнальных систем: ядерного фактора 2 (Nrf2) и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α), которые ответственны за включение адаптивных программ в клетке;
7. Оценить уровень канцерпривентивной, противоаллергической и противовоспалительной активности СОК при экспериментальном моделировании *in vivo* кожного канцерогенеза, аллергического контактного дерматита и системного воспаления, индуцированных 7,12-диметилбензантраценом, 2,4-динитрофторбензолом и липополисахаридом, соответственно.

Научная новизна и практическая значимость работы

Разработана новая оптимальная лекарственная форма известного алкалоида ТР – мазь «Коурохитин», содержащая 0,01% действующего вещества (ТР), 0,1% хитозана (носитель ТР), дистиллированную воду и ланолин-вазелиновую смесь (основа). Показано, что при моделировании кожных патологий *in vivo* «Коурохитин» обладает ярко-выраженным дерматопротекторным эффектом: снижает клинические проявления кожных аллергических реакций, оказывая при этом сильное противовоспалительное действие, а также ускоряет репаративные процессы в эпидермисе при раневых поражениях кожи. После проведения клинических испытаний, мазь «Коурохитин» может найти широкое применение в качестве универсального средства лечения различных заболеваний кожи.

Впервые были проведены исследования биомедицинских свойств нового синтетического производного ТР – МТ, обладающего большей растворимостью в воде и меньшей токсичностью. Установлено, что МТ оказывает избирательное антипролиферативное действие в отношении различных линий опухолевых клеток *in vitro*, проявляет противоопухолевую активность *in vivo* и повышает химиотерапевтический эффект доксорубина, при их совместном применении. Полученные результаты создают предпосылки для дальнейшего исследования МТ, как потенциального противоопухолевого средства.

Получены новые экспериментальные данные относительно медико-биологической активности и механизмов действия известного гинзенозида корня женьшеня Rh2. При моделировании опухолевого процесса *in vivo* показано, что Rh2 значительно повышает эффективность химиотерапевтического действия и уменьшает иммуносупрессорное действие доксорубина, при проведении комбинированной химиотерапии. Впервые установлено, что Rh2 на клеточном уровне выступает как прооксидант и «мягкий» регулятор активности редокс-чувствительного комплекса Keap1/Nrf2, что, возможно, связано с противоопухолевым, иммуномодулирующим и адаптогенным действием этого моноглюкозида.

Впервые предложен молекулярный механизм, объясняющий причины принципиально разного характера действия Rh2 на функциональную активность опухолевых (вызывает некроз или включение апоптотических программ) и иммунокомпетентных (индуцирует их активацию и запускает адаптивные программы) клеток, который связан со структурными и функциональными различиями в составе плазматических мембран этих клеток и с особенностями мембранотропного действия Rh2.

Обнаружено, что СОК, полученная из нового природного источника каротиноидов *P. pectinifera*, при моделировании кожного канцерогенеза, аллергических и воспалительных патологий является эффективным иммуномодулятором и корректором нарушений кожного гомеостаза, чем, вероятно, обусловлена выраженная противоаллергическая, противовоспалительная и канцерпревентивная активность этого средства. В дальнейшем, необходимо проведение предклинических испытаний СОК, как средства профилактики и лечения широкого спектра кожных заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Хиназолиновый алкалоид ТР в составе препарата «Коурохитин» – эффективный противовоспалительный агент и корректор патологических изменений кожи при моделировании аллергических и раневых процессов;
2. МТ – водорастворимое и значительно менее токсичное производное ТР, обладающее противоопухолевой активностью;
3. Гинзенозид Rh2 – эффективное средство комбинированной терапии, повышающее эффективность и безопасность противоопухолевого препарата доксорубицина, при моделировании онкологических заболеваний;
4. СОК – потенциальное лечебно-профилактическое средство, проявляющее канцерпревентивную, противоаллергическую и иммуномодулирующую активность.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов исследования и обоснованность выводов базируется на достаточном количестве наблюдений и методов статистического анализа полученных данных с использованием статистического пакета Microsoft Excel 2019.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были представлены на Объединенном иммунологическом Форуме (Россия, Нижний Новгород, 2013); Международном конгрессе «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии» (Россия, Москва, 2015); Научно-практической школе-конференции «Аллергология и клиническая иммунология (иммунодиагностика, иммунопрофилактика и иммунотерапия)» (Крым, Ливадия, 2016); Научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам (ДВФУ ШЕН, Владивосток, 2017); Одиннадцатой международной конференции «Медицинская химия и фармацевтические технологии» (Чехия, Прага, 2019);

Двадцать четвёртом мировом конгрессе «Достижения в онкологии» и симпозиуме «Молекулярная медицина» (Греция, Спарта, 2019); Научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по естественным наукам (ДВФУ ШЕН, Владивосток, 2020).

По теме диссертации опубликовано 22 работы: 12 статей в журналах, 3 патента, 7 тезисов в сборниках научных трудов по материалам конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 120 страницах, содержит 23 рисунка и 7 таблиц. Список литературы содержит 213 источников.

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (ТИБОХ) ДВО РАН.

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в планировании и проведении экспериментальной работы, в обработке и анализе полученных данных, в подготовке научных публикаций и текста диссертации.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность: своему научному руководителю д.б.н. Попову А.М. за неоценимую помощь в выполнении диссертации, постоянное внимание к работе, ценные замечания и полезные советы на всех этапах исследования, академику РАН Стонику В.А., доценту Дальневосточного федерального университета (ДВФУ), к.х.н. Московкиной Т. В., зав. лаб. биотехнологии, д.б.н. Артюкову А.А., с.н.с. Атопкиной Л.Н, за любезное предоставление для тестирования исследуемых в данной работе веществ, а также всем коллегам из лабораторий ТИБОХ ДВО РАН и других институтов, причастных к экспериментальной части данной работы.

1 Литературный обзор

1.1 Природные вторичные метаболиты как потенциальные действующие вещества фармацевтических средств

Из 400 тысяч известных жизненно важных биомолекул, около 200 тысяч относятся к низкомолекулярным биорегуляторам, многие из которых являются продуктами вторичного метаболизма растений, гидробионтов, грибов, лишайников и микроорганизмов. Вторичные метаболиты разделять на основные: алкалоиды, изопреноиды, стероиды, поликетиды, нерибосомальные пептиды, фенольные соединения, и минорные группы: различные гликозиды (цианогенные гликозиды, тиогликозиды, сапонины и т.д.), растительные амины, небелковые аминокислоты, полиацетилены. На сегодняшний день хорошо известно, что вторичные метаболиты, в отличие от первичных продуктов обмена (аминокислоты, нуклеотиды, жирные кислоты, сахара, органические кислоты), не являются универсальными для любых организмов и не принимают непосредственного участия в росте, развитии и репродукции клеток, тем не менее они оказывают весьма высокий физиологический эффект на организменном уровне (Pott et al., 2019).

В организме продуцента вторичные метаболиты выполняют самые разнообразные функции: защита от вредителей, патогенов, фунги- и фитофагов (выполняют роль токсинов, репеллентов, инсектицидов, фунгицидов и бактерицидов); адаптация к условиям среды обитания (защита от ультрафиолетового излучения (УФ), активных форм кислорода (АФК), пестицидов и т.д.); участие в клеточном метаболизме (запасная функция, участие в фотосинтезе, активаторы или ингибиторы различных ферментов: оксидоредуктаз, лигаз, трансфераз и т.д.); являются пигментами или эфирами, обеспечивая окраску и ароматические свойства многих растений для внутри- и межвидового взаимодействия организмов в экосистеме (Mohiuddin, 2019; Lubbe and Verpoorte, 2011).

В животный организм, как правило, большинство вторичных метаболитов поступают с пищей, так как животные (за исключением морских беспозвоночных) и человек не способны синтезировать их *de novo*. Часть из них является незаменимыми элементами питания, выполняя жизненно важные физиологические функции в организме животных (провитамины, витаминоподобные вещества, антиоксиданты и биорегуляторы). Кроме того, хорошо известно, что лекарственные свойства многих растений, грибов и морских организмов определяются присутствием в их тканях продуктов вторичного метаболизма, которые проявляют разнообразную биологическую активность при

воздействии на организм животного и человека. Поэтому уже не одно десятилетие ведётся поиск новых индивидуальных вторичных метаболитов, разработка методов их выделения и синтеза, изучение различных сторон их биомедицинских свойств и оценка возможности их практического применения (Juric et al., 2020; Seca and Pinto, 2019).

Среди наиболее фармакологически перспективных групп вторичных метаболитов выделяют индольные и хиназолиновые алкалоиды, каротиноиды (изопреноиды) и тритерпеновые гликозиды (сапонины). Ряд достоинств, которыми обладают представители указанных групп соединений, позволяет рассматривать их в качестве действующих компонентов различных фармацевтических средств (Bhaskarachary et al., 2015; Crozier et al., 2006), среди преимуществ, прежде всего, выделяют:

1. Экономичный и доступный процесс промышленного получения. Это связано с широкой распространенностью в природе (источниками служат как растения, так и различные гидробионты, высшие и низшие грибы и микроорганизмы). Кроме того, относительная простота молекулярного строения позволила разработать способы их получения биотехнологическими (с помощью различных клеточных культур: бактериальных, растительных, дрожжевых и других) и синтетическими методами;
2. Разнообразие представителей в каждой из групп соединений, что расширяет арсенал фармакологически перспективных БАВ;
3. Низкая токсичность или её отсутствие даже при длительном воздействии на организм;
4. Широкий спектр медико-биологической активности, зачастую с плеiotропным (множественным) характером фармакологического действия и высоким терапевтическим индексом в отношении различных патологий человека.

Многие индивидуальные представители указанных групп соединений уже сейчас нашли широкое применение в лечении и профилактике ряда заболеваний, а также в области косметологии и функционального питания. На сегодняшний день не прекращается поиск новых БАВ, относящихся к вторичным метаболитам, исследование их терапевтического потенциала и механизмов действия с целью разработки на их основе новых лечебно-профилактических средств, БАД и вспомогательных средств комплексной терапии. При этом результаты исследования молекулярных механизмов действия данных БАВ с использованием современных методов биотестирования *in vitro* свидетельствуют о наличии у них разнообразных внутриклеточных мишеней, которые определяют, как селективный, так и плеiotропный характер их фармакологического действия (Velu et al., 2018).

1.1.2 Основные молекулярные мишени низкомолекулярных биорегуляторов

Неотъемлемым этапом изучения биомедицинских свойств потенциальных лекарственных средств и БАД является анализ молекулярных механизмов их терапевтического действия. На сегодняшний день хорошо известно, что физиологическое действие, которое оказывают различные вторичные метаболиты на организм человека и животных, связано с их способностью прямо или опосредовано модулировать работу различных жизненно важных клеточных систем, включающих ферменты, рецепторы, адапторные и сигнальные белки. Поэтому за последнее десятилетие было разработано множество методик, активно используемых современными исследователями, для поиска молекулярных мишеней различных БАВ (Wink, 2015; Schenone et al., 2013).

Особый интерес представляют БАВ способных регулировать функциональную активность универсальных клеточных регуляторов, с нарушением работы которых связывают развитие различных патологий человека. Как правило, к таким универсальным регуляторам относятся рецепторы, ферменты и факторы транскрипции, имеющие следующие свойства: присутствие в клетках практически всех видов тканей; множественная регуляция различных внутриклеточных процессов; неспецифическая активация под действием самых разнообразных стимулов, в том числе, различных этиологических и патогенетических факторов. Ниже приведена общая характеристика наиболее известных клеточных регуляторов, соответствующих указанным свойствам.

В этом разделе представлена информация о регуляторных белках, которые согласно многочисленным литературным данным являются мишенями для исследуемых в настоящей работе БАВ.

Ядерный фактор-κВ (NF-κB) – один из наиболее универсальных клеточных регуляторов, контролирующий транскрипцию около 400 генов. NF-κB экспрессируется практически во всех клетках и присутствует постоянно в неактивном состоянии в ассоциации с белком репрессором IκB. Деградация комплекса NF-κB/IκB приводит к освобождению активного димера NF-κB – p65/p50 с его последующей ядерной транслокацией и активацией экспрессии генов мишеней. Многие экзогенные мембранные рецепторы: толл-подобные рецепторы (TLR), рецепторы цитокинов, CD-рецепторы иммунокомпетентных клеток, рецепторы ростовых факторов и т.д. используют для передачи сигнала NF-κB-сигнальный путь. Сигнал от соответствующих рецепторов передаётся через специфический активатор NF-κB - серин/треониновую киназу (IKK), обеспечивающую фосфорелирование IκB, который затем расщепляется протеасомой, с

освобождением субъединицы p65/p50. Активация NF-κB может также происходить при окислительном стрессе и гипоксии, в этом случае АФК напрямую осуществляют окисление IκB по тиоловым группам и нарушают его связь с NF-κB. Кроме того, костимулирующим фактором NF-κB также является белок аннексин A2 (AnxA2), который непосредственно взаимодействует с p65 субъединицей, повышая её активность (Lin et al., 2010).

NF-κB играет важную роль в становлении воспалительных и онкологических процессов в организме, поэтому рассматривается в качестве одной из главных мишеней для противовоспалительных и противоопухолевых агентов. Наиболее известна роль NF-κB в различных иммунных клетках, где он обеспечивает транскрипцию генов, ответственных за синтез различных медиаторов воспаления: цитокины (интерлейкины, факторы некроза опухоли, колониестимулирующие факторы), хемокины, адгезивные молекулы, белки острой фазы, системы комплемента, комплекса гистосовместимости (МНС-I и -II), а также некоторых индуцибельных ферментов, например, индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS) и циклооксигеназы 1 и 2 (ЦОГ 1-2). При этом NF-κB принадлежит к категории факторов транскрипции "быстрого действия", которые одними из первых активируются, как на первичные, так и вторичные воспалительные стимулы, усиливая иммунный ответ на всех стадиях развития воспалительной реакции. Не менее важна роль NF-κB в становлении опухолевого процесса, поскольку в атипичных клетках он повышает экспрессию генов, ответственных за синтез ряда ростовых факторов, циклинов, анти-апоптотических белков, матричных металлопротеиназ (ММР), в частности ММР-9. Тем самым, NF-κB стимулирует пролиферацию и рост атипичных клеток, способствует их выживаемости и увеличению метастатического потенциала (Miller et al., 2010; Labbozzetta et al., 2020).

Белки семейства сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции (STAT1-6) и тирозиновые янус-киназы (JAK1-3 и Tyk2), которые катализируют фосфорилирование и активацию STAT, также рассматриваются как потенциальные мишени для БАВ, обладающих противовоспалительной и противоопухолевой активностью. В иммунокомпетентных клетках система сигнальной трансдукции JAK/STAT – это один из наиболее хорошо изученных путей передачи внутриклеточного сигнала от TLR и цитокиновых рецепторов (прежде всего интерлейкинов-1, 2, 4, 6 (ИЛ 1, 2, 4, 6) и интерферонов (INF)). Активация JAK/STAT-пути направлена преимущественно на усиление воспалительного ответа, через стимуляцию экспрессии генов, ответственных за активацию, пролиферацию, выживание и рекрутинг в очаг воспаления иммунных клеток. Поэтому гиперактивация JAK/STAT при аутоиммунных процессах не редко приводит к развитию системной воспалительной реакции. В опухолевых клетках присутствуют только

STAT-3 и 5. Принимая сигнал от рецептора факторов роста, STAT-3 и 5 контролируют активность генов, ответственных за процессы пролиферации, роста и дифференцировки опухолевых клеток, метастазирование и инвазивный рост опухолевых клеток, а также участвуют в процессах ангиогенеза (Seif et al., 2017; Bose et al., 2020).

При разработке фармацевтических средств различной направленности ведётся поиск агентов, проявляющих активность в отношении группы мультифункциональных внутриклеточных сигнальных путей, содержащих одну из митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК). Основные МАРК эукариот – это регулируемые внешними сигналами киназы 1 и 2 (ERK1/2), а также стресс-активируемые киназа p38 и c-Jun N-терминальная киназа (JNK). Как правило, результатом их активации являются регулирование деления клеток, стимуляция их функциональной активности и запуск механизмов, обеспечивающих их выживание (Yang et al., 2013).

Активацию ERK1/2 запускают различные внеклеточные сигналы, а именно: гормонами, факторами роста, цитокинами, хемокинами, нейротрансмиттерами, канцерогенами, вирусными и бактериальными АГ. Причем активация ERK1/2 связана преимущественно с клеточным выживанием и стимуляцией пролиферации, что нередко приводит к индукции онкологического процесса. Так, ERK1/2 выступают посредниками повышенной экспрессии основных протоонкогенов c-Fos и c-Myc, ответственных за пролиферацию и подвижность клетки. Кроме того, ERK1/2 участвуют в экспрессии генов, отвечающих за синтез различных про-апоптотических белков, например, сурвина и белков-ингибиторов апоптоза (IAP1 и c-IAP2), которые связывают и инактивируют каспазы 3, 7 и 9, а также белков семейства Bcl (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W и Mcl-1), препятствующих запуску митохондриального пути апоптоза. Сигнальные пути ERK1/2 принимают непосредственное участие в передаче сигнала от рецептора эпидермального фактора роста (VEGFR), после контакта с его высокоаффинным лигандом – фактором роста эндотелия сосудов (VEGF). Так, принимая сигнал от комплекса VEGF/VEGFR, ERK1/2 способствуют пролиферации и увеличению подвижности эндотелиальных клеток, запуская процесс ангиогенеза. Как известно, усиление ангиогенеза многократно возрастает при онкологических процессах. Так, опухолевая ткань, формируя собственную сосудистую сеть, обеспечивает своё кровоснабжение, питание, а также метастазирование в другие ткани через кровоток (Mendoza and Blenis, 2011).

Активация сигнальных киназ JNK и p38 обеспечивается стрессовыми стимулами, а именно: воспалительными факторами, например, цитокинами первой линии реагирования, УФ излучением, тепловым или осмотическим шоком, механическим повреждением и

окислительным стрессом. Гиперактивность JNK и p38, в основном, непосредственно связана с развитием воспалительных процессов, поскольку их ключевой функцией является регулирование работы врождённого и приобретённого иммунитета. Передачу сигнала в иммунных клетках JNK и p38 часто осуществляют через сигнальные пути, включающие NF-κB или активирующий протеин-1 (AP-1). Интересно, что гиперактивность JNK и p38 в иммунных клетках опосредует воспалительный ответ, однако в атипичных клетках эта киназа фосфорилирует белки-мишени, связанные с активацией апоптоза. При воспалительных процессах JNK и p38 обеспечивают пролиферацию клеток миелоидного ряда, а также стимулируют синтез многих цитокинов зрелыми иммунными клетками (Huang et al., 2009; Kim, 2004; Ye et al., 2014).

AP-1 также часто рассматривается в качестве универсальной мишени для различных БАВ, поскольку гиперактивность этого белка играет немаловажную роль в становлении онкологических и воспалительных заболеваний. Основная функция AP-1 заключается в контроле экспрессии генов, обеспечивающих пролиферацию, рост, выживание и контроль за дифференцировкой клеток, в ответ на внешние стимулы: цитокины, факторы роста, гормоны и стрессорные сигналы. В норме, AP-1 принимает участие в репаративных процессах повреждённых тканей, например, обеспечивает заживление эпидермиса через стимуляцию пролиферации фибробластов и блокирование некроза тканей. Однако в неопластических и злокачественных клетках активная форма AP-1 может обеспечивать ингибирование апоптоза и стимулирование роста и пролиферации этих клеток, индуцируя синтез различных циклинов и трансформирующих факторов роста. В иммунных клетках AP-1 запускает синтез провоспалительных цитокинов, стимулирующих, главным образом, созревание иммунных клеток (колониестимулирующие факторы), а также их хемотаксис (RANTES и интерлейкин-8), содействуя как индукции, так и прогрессии воспалительного процесса (Srivastava and Baig, 2018).

Семейство протеинкиназ В или АКТ также являются довольно популярной мишенью для многих антиканцерогенных средств. АКТ выступает в роли онкогена при многих злокачественных заболеваниях, так как считается главным внутриклеточным медиатором сигнального пути выживания, который защищает клетки от апоптоза. Кроме того, при ангиогенезе АКТ обеспечивают миграцию эндотелиоцитов (Hers et al., 2011).

Поскольку указанные факторы транскрипции регулируют экспрессию генов в ответ на различные стимулы, в том числе цитокинов, ростовых факторов, сигналов стресса, бактериальных и вирусных инфекций и онкогенных воздействий, то они непосредственно участвуют в развитии онкологического процесса и устойчивого хронического воспаления,

которые приводят к развитию множества патологий: всех видов аллергий, абсцессов различных тканей, ревматоидного артрита, сердечно-сосудистых и многих других заболеваний. Неслучайно, ингибиторы этих сигнальных путей рассматриваются в качестве потенциальных противоопухолевых и противовоспалительных агентов.

В качестве потенциальных молекулярных мишеней БАВ рассматривают не только сигнальные белки, содействующие развитию воспалительных и онкологических заболеваний. Многие БАВ, напротив, стимулируют синтез адаптивных белков, которые усиливают резистентность нормальных клеток к клеточному стрессу и обеспечивают поддержание гомеостаза организма. Действие таких БАВ часто направленно на ингибирование развития патологических процессов и профилактику различных заболеваний.

Для ряда низкомолекулярных соединений была показана способность повышать уровень активности ядерного фактора 2 (Nrf2). Nrf2 играет важную роль в жизнедеятельности всех типов эукариотических клеток, обеспечивая включение клеточных адаптационно-приспособительных механизмов в условиях различного рода стрессов (окислительный стресс, токсические вещества, ксенобиотики и другие факторы). В отсутствие стресса Nrf2 находится в цитоплазме клетки в ассоциации с белком репрессором Kelch-like ECH associating protein 1 (Keap1). При стрессорном воздействии, Nrf2 освобождается из комплекса с Keap1. Свободный Nrf2, минуя деградацию в протеосомах, переносится в ядро, где имеет несколько сайтов связывания в ДНК: ARE (антиоксидант-респонсивный элемент), XRE (ксенобиотик-респонсивный элемент) и GRE (глюкокортикоид-респонсивный элемент). Тем самым Nrf2 усиливает экспрессию цитопротективных генов, продуктами которых являются ферменты, обеспечивающие вторую фазу детоксикации ксенобиотиков, а также антиоксидантные ферменты, включая супероксиддисмутазу (СОД), глутатионпероксидазу (GPx) и каталазу (КАТ) (Kim et al., 2016; DeNicola et al., 2011; Gambhir 2016).

Известный внутриклеточный белок опухолевый супрессор p53 часто рассматривается в качестве мишени для потенциальных противоопухолевых агентов. Его главная биологическая роль связана с контролем генетической однородности клеток в целостном организме. При накоплении повреждений в ДНК происходит активация p53, который, направляясь в ядро, связывается с p53-чувствительными элементами, где активирует транскрипцию группы генов, ответственных за «арест» клеточного цикла и ингибирование репликации ДНК. Например, p53 обеспечивает синтез супрессорного белка p21, главная функция которого заключается в подавлении активности циклин-зависимых

киназ 2 и 4, что блокирует клеточный цикл. При сильном стрессорном сигнале p53 индуцирует запуск апоптоза. При этом p53 подавляет транскрипцию и активность анти-апоптотных и активирует транскрипцию про-апоптотных белков семейства Bcl (Shamloo and Usluer, 2019; Hientz et al., 2017).

В последнее время в центре внимания исследователей в области биомедицины, фармакологии и токсикологии находится арильный гидрокарбоновый рецептор (AhR). AhR присутствует в клетках всех органов, но в наибольшем количестве он был обнаружен в клетках печени, почек, кожи, мышечной ткани, мозга и органов пищеварительной системы. В стационарных условиях AhR прибывает в инактивированном состоянии в ассоциации с разными молекулярными шаперонами, например, с белком теплового шока (hsp90), или иммунофиллин-подобным белком (XAP2). Активация AhR происходит после распада комплекса hsp90-AhR и XAP2-AhR при взаимодействии с лигандом. Свободный AhR, находясь в ассоциации с лигандом, димеризуется с транспортным белком – ядерным переносчиком ароматических углеводов (ARNT), который способствует транслокации AhR в ядро. В дальнейшем, комплекс AhR-ARNT-лиганд контактирует с регуляторными сайтами генов-мишеней, запуская процесс их транскрипции (Rogers et al., 2017).

Главной функцией AhR является запуск экспрессии генов ферментов всех стадий метаболизма ксенобиотиков: первой фазы – семейство цитохром P450-зависимых монооксигеназ (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2S1 и др); второй фазы – уридиндифосфоглюкуронозилтрансфераз, сульфотрансферазы, гидратазы, S-глютатионтрансферазы, УДФ-глюкуронозилтрансферазы, N-ацетилтрансферазы, S-метилтрансферазы; и третьей фазы – трансмембранные-транспортёры, обеспечивающие экскрецию ксенобиотиков, например, такие как гликопротеин-P и транспортеры органических анионов. Таким образом активация AhR обеспечивает трансформацию и экскрецию различных ксенобиотиков (молекул лекарственных средств, токсинов, в том числе бактериальных, канцерогенов, аллергенов и многих других), что приводит к их обезвреживанию и выведению из организма.

Относительно недавно было обнаружено, что AhR также участвует в модуляции работы иммунной системы. Например, AhR нарушает передачу сигнала от TLR и рецепторов цитокинов по сигнальным путям, зависимым от NF-κB и STAT, тем самым препятствуя синтезу провоспалительных медиаторов. Показана также роль AhR в усилении барьерных функций эпидермиса, путём участия в запуске экспрессии гена белка филагтрина (FLG) клетками кожи. FLG – основной белок клеток кожи, обеспечивающий агрегацию филаментов кератина. Данный процесс является ключевым моментом процесса

кератинизации эпителия с образованием рогового слоя кожи, который выполняет функцию защитного барьера, от действия различных внешних неблагоприятных факторов. Сбои в экспрессии гена FLG и нарушение кератинизации может привести к ослаблению барьерных и репаративных функций в эпидермисе, что приводит к развитию различных дерматологических заболеваний, в частности онкологических и аллергических (Tsuji et al., 2017). Лигандами AhR выступает широкий спектр соединений, имеющих в структуре молекулы ароматические группировки: гетероциклические алкалоиды, каротиноиды, фенолы и многие другие метаболиты, которые часто рассматриваются в качестве перспективных противовоспалительных, противоаллергических, канцерпривентивных и дерматопротекторных агентов (Xue et al., 2017).

Таким образом, мультифункциональность и универсальность указанных факторов транскрипции делает их идеальными молекулярными мишенями для потенциальных терапевтических средств. Поэтому представители различных классов вторичных метаболитов и их синтетических аналогов, обладающих способностью модулировать работу данных сигнальных белков, могут оказывать лечебное действие при развитии патологических процессов.

1.2 Алкалоиды как класс фармакологически активных соединений

1.2.1 Строение, классификация и медицинское применение алкалоидов

Алкалоиды - это обширный класс азотсодержащих органических соединений, основного характера, преимущественно растительного происхождения, реже синтезируются грибами и микроорганизмами. Биогенетическими предшественниками большинства алкалоидов являются аминокислоты, а также терпены, стероиды и пуриновые основания. Известно, что организмы продуценты синтезируют многочисленные виды алкалоидов в качестве регуляторов роста, а также факторов защиты от их естественных врагов (выступают в роли токсинов различной направленности, инсектицидов, антибактериальных и антифунгальных средств). Поэтому для большинства представителей данной группы соединений характерно ярко выраженное физиологическое действие на организм. Неслучайно, что ещё с древнейших времен алкалоидсодержащие растения и грибы применялись в качестве антисептиков, анальгетиков, снотворных средств, средств

для лечения сердечной недостаточности, а также различных воспалительных и кожных заболеваний (Aniszewski, 2007; O'Connor, 2010).

К настоящему моменту открыто и выделено около 15 тысяч представителей алкалоидов. Поскольку данный класс соединений отличается большим структурным многообразием, то сложно провести его чёткую классификацию. Наиболее популярна классификация алкалоидов на основе их молекулярной структуры, согласно которой можно выделить две группы: 1) гетероциклические азотсодержащие алкалоиды, которые в зависимости от строения углеродноазотного цикла подразделяются на производные индола, хинолина, изохинолина, пиридина, пиперидина, пирролидина, пиррола, тропана, хинолизидина, пурина, апарфина, пирролизидина, имидазола, инолизидина и хиназолина. В эту же группу входят терпеноидные и стероидные алкалоиды; 2) псевдоалкалоиды - группа индивидуальных соединений, не содержащих аминогруппу в гетероцикле. Типичными представителями являются такие известные алкалоиды, как горденин, мескалин, эфедрин, колхицин и другие (Dey et al., 2020).

Благодаря своей распространенности, многочисленности и ярко выраженной физиологической активности алкалоиды нашли широкое применение в производстве лекарственных препаратов самой различной направленности. Многие индивидуальные представители алкалоидов используют в терапии следующих патологий: острый и хронический болевой синдром, психоэмоциональные, нейродегенеративные и нейромышечные расстройства, бронхолёгочные, сердечно-сосудистые (например, сердечная аритмия, гипертензия и другие осложнения) заболевания. В современной медицине некоторые алкалоиды получили широкое распространение также в качестве противовоспалительных, антиинфекционных и противоопухолевых агентов (Roy and Datta, 2019; Jayakumar and Murugan, 2016).

Самой многочисленной в природе, разнообразной по химическому строению и спектру фармакологического действия считается группа индольных алкалоидов. Данная группа насчитывает около 4100 представителей, все из которых являются производными триптофана. Медицинское применение природных и синтетических производных индола чрезвычайно широко. Чаще всего их используют в качестве транквилизаторов (иохимбин, резерпин, гарман, гармин), анальгетиков (эрготамин, эргометрин), антиаритмических препаратов (аймалин, раубазин). Помимо этого, некоторые представители данной группы соединений применяются в качестве противоопухолевых (винбластин и винкристин) и нестероидных противовоспалительных (индометацин) препаратов. Ярко выраженная противовоспалительная активность была также установлена для таких индольных

алколоидов, как 3,3-дииндолилметан, берберин, индирубин, изатин и триптантрин (ТР), которые рассматриваются в качестве перспективных агентов для лечения различных воспалительных заболеваний. (Peng et al., 2019; Souto et al., 2011; Ko et al., 2007).

В настоящее время актуальным направлением является выделение и синтез новых представителей производных индола. Такой подход позволит пополнить арсенал фармакологически перспективных соединений и разработать на их основе лекарственные препараты с улучшенными терапевтическими показателями.

1.2.2 Медико-биологические свойства и особенности противовоспалительного действия хиназолинового алкалоида триптантрина

Алкалоид ТР относится к индольным производным хиназолина, который синтезируется из триптофана высшими растениями и некоторыми микроорганизмами. На сегодняшний день ТР считается одним из наиболее востребованных и фармакологически перспективных вторичных метаболитов класса алкалоидов, что обусловлено относительной простотой его синтеза и наличием широкого спектра медико-биологических свойств (Jun et al., 2015).

Первыми природными источником получения ТР в чистом виде стали высшие растения родов *Couroupita* (*Couroupita guianensis*), *Indigofera* (*Indigofera Tinctoria*), *Isatis* (*Isatis tinctoria*), *Polygonum* (*Polygonum tinctorium*), *Strobilanthes* (*Strobilanthes cusia* O Kuntze). Из листьев и стеблей данных растений выделяют синий экстракт – *Indigo naturalis*, который уже не одно столетие применяют в традиционной Восточной медицине для лечения различных воспалительных заболеваний, главным образом, дерматологических, таких как псориаз. Интересно, что несмотря на относительно низкое содержание в суммарной фракции *Indigo naturalis*, ТР является одним из основных действующих компонентов, определяющих лечебное действие этого экстракта. Позже, ТР был обнаружен в некоторых видах высших грибов, таких как *Schizophyllum commune* и *Leucopaxillus cerealis*, в дрожжевидных грибах *Candida lypolitica* и *Malassezia furfur*, а также в морских микроорганизмах, например, в альфапротеобактерии *Oceanibulbus indolifex* (Московкина и др., 2012; Naganum, 2019; Lin et al., 2013; Wagner-Dobler et al., 2004).

Простота химической структуры позволила разработать и оптимизировать различные пути органического синтеза ТР из небольшого набора исходных соединений, например, из хиназолина и антраниловой кислоты, 2-нитробензойной кислоты, 2-

бромбензамида и L-пролина, изатина и изатоевого ангидрида, и других (Kaur et al., 2017; Tucker and Grundt, 2012).

В результате множественных биомедицинских исследований было обнаружено, что ТР обладает целым рядом фармакологических активностей: противовоспалительное, противоаллергическое, противомикробное, антипротозойное, противоопухолевое и дерматопротекторное действие. При этом наибольшую эффективность ТР проявляет в терапии различных кожных патологий, особенно связанных с воспалением. Например, показано, что в относительно низких концентрациях ТР оказывает выраженное терапевтическое действие *in vivo* при аллергических (аллергический дерматит и псориаз) и раневых (гнойные, ожоговые и лоскутные раны) поражениях кожи, эффективно снижая проявления воспалительных процессов в эпидермисе (Попов и др., 2011; Попов и др, 2012; Pergola et al., 2012).

Поскольку воспалительный ответ является неотъемлемой частью патогенеза многих заболеваний, считается, что мощная противовоспалительная активность ТР лежит в основе его терапевтического действия (Gaitanis et al., 2012; Hay 2011; Velegaki et al., 2015). При изучении молекулярных механизмов действия ТР было установлено, что противовоспалительная активность этого алкалоида достигается за счёт его влияния на функциональную активность ряда рецепторов, ферментов и транскрипционных факторов, ответственных за инициацию и прогрессию воспалительных реакций в организме. Согласно многочисленным экспериментальным и литературным данным, ТР имеет следующие основные молекулярные мишени: TLR, STAT, NF-κB, AhR, 5-LOX, COX-2, iNOS, а также сигнальные пути VEGF/EGFR/ERK1/2 и VEGF/EGFR/PI3K/Akt (Рисунок 1).

В ряде исследований было показано, что ТР, как *in vitro*, так и *in vivo*, препятствует активации TLR и сопряжённых с ним некоторых факторов транскрипции, например, STAT и NF-κB. TLR – семейство паттерн-распознающих трансмембранных рецепторов, преимущественно иммунокомпетентных клеток, а также эндотелиоцитов и клеток кожного покрова (фибробластов, кератиноцитов). TLR являются эволюционно-консервативными белками, играющими ведущую роль в инициации воспалительных процессов в ответ на разнообразные эндогенные стимулы (эволюционно-стабильные антигенные детерминанты патогенных микроорганизмов, потенциальные аллергены: компоненты пыли, шерсти животных, пыльцы растений, различные химические вещества, входящие в состав бытовых и косметических средств и т.д.). Обеспечивая раннее распознавание различных антигенных структур, TLR активирует ряд сигнальных каскадов, которые запускают экспрессию генов ответственных за синтез различных медиаторов воспаления.

Вероятно, как и многие другие соединения, имеющие индольную группировку, TP выступает в качестве антагониста TLR и тем самым блокирует начальные стадии воспалительного клеточного ответа (рисунок 1). В частности, была хорошо продемонстрирована ингибирующая активность TP в отношении TLR4, гиперактивность которого связана с развитием многих воспалительных патологий: различные аллергические заболевания, атеросклероз, бактериальный сепсис, воспалительные расстройства ЖКТ (язвенный колит, болезнь Крона) и другие (Mahesh et al., 2016).

STAT и NF-κB играют первостепенную роль в передаче сигнала от TLR и рецепторов цитокинов, что, как известно, приводит к повышению экспрессии генов ряда цитокинов, хемокинов, адгезинов, ростовых факторов и других биоактивных молекул, как на ранней, так и на прогрессирующей стадии воспалительной реакции. Показано, что TP ингибирует фосфорилирование STAT 3 и 5, а также предотвращает деградацию комплекса NF-κB-IκBα, тем самым блокируя их активацию (Wang et al., 2018; Ito et al., 2010). Кроме того, была выявлена способность TP снижать уровень активности основного адаптерного белка TLR - MyD88, который непосредственно участвует в передаче сигнала через путь NF-κB, а также через путь, ведущий к экспрессии генов интерферонов (Lee et al., 2018).

Позитивное влияние TP при лечении различных поражениях кожи может быть также связано с его способностью выступать в качестве агониста AhR (Hubbard et al., 2015). Как известно, главная физиологическая функция AhR – запуск транскрипции генов ферментов, ответственных за биотрансформацию, детоксикацию и элиминацию ксенобиотиков, в том числе и различных аллергенов. Частично благодаря этому механизму обеспечивается толерантность организма к потенциальным аллергенам, что снижает риск развития различных видов гиперчувствительности. Кроме того, как было отмечено ранее, AhR принимает участие в регуляции иммунной системы и усиливает барьерные свойства эпидермиса. Ограничивая передачу сигнала от TLR и цитокиновых рецепторов, через супрессорное действие на активность NF-κB и STAT, AhR модулирует активность антиген-презентирующих, эффекторных, киллерных и фагоцитарных клеток, тем самым сдерживая избыточный иммунный ответ при воспалительных процессах. Кроме того, при различных кожных патологиях AhR, через регулирование синтеза белка FLG, способствует восстановлению повреждённого кожного покрова. (Vazquez and Quintana, 2018). Следовательно, способность к активации AhR позволяет TP не только содействовать элиминации потенциальных аллергенов из организма, но и, вероятно, определяет его ранозаживляющее действие и усиливает противовоспалительную активность (рисунок 1).

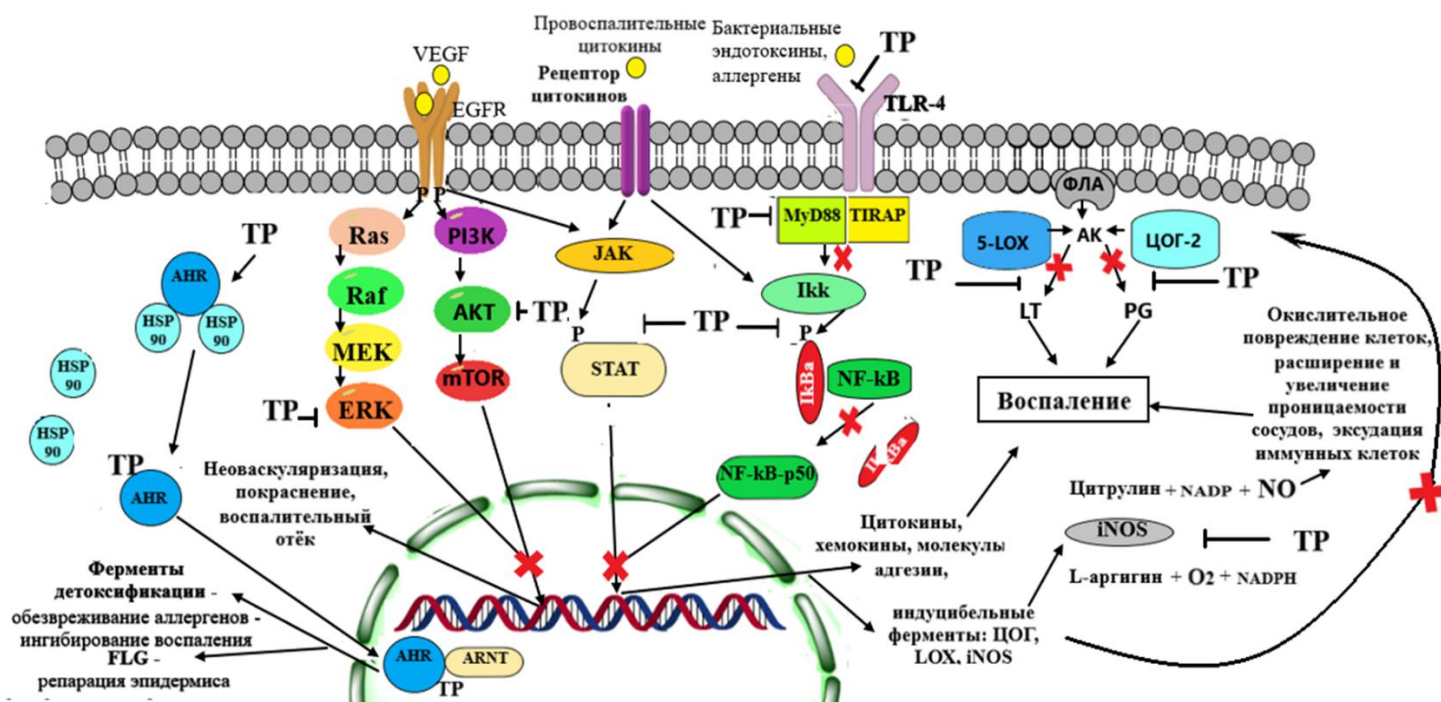


Рисунок 1. Молекулярные механизмы противовоспалительного действия TP.

TP ингибирует активацию TLR4, а также препятствует диссоциации комплекса IκBα/NF-κB, фосфорилированию STAT, AKT, mTOR и ERK, блокируя передачу сигнала от рецепторов цитокинов, TLR и EGFR, с последующим ингибированием синтеза цитокинов, индуцибельных ферментов (5-LOX, COX-2, iNOS), молекул адгезии, хемокинов и ростовых факторов, участвующих в повышении активности и миграции иммунокомпетентных клеток и ангиогенезе, что ведёт к усилению воспалительной реакции. TP, являясь агонистом AhR, способствует диссоциации комплекса hsp90-AhR и связыванию активированного AhR с ARNT, что обеспечивает транслокацию комплекса Ahr-ARNT-TP в ядро, где Ahr-ARNT-TP запускает транскрипцию генов биотрансформации ксенобиотиков и FLG, что способствует восстановлению эпидермиса и обезвреживанию токсинов, аллергенов и других веществ, стимулирующих воспалительный ответ.

Интересен тот факт, что TP был найден в дрожжевых грибах рода *Malassezia*. При определённых условиях *Malassezia* становится возбудителем таких кожных заболеваний как цветной лишай, себорейный дерматит и т.д. Однако дрожжи рода *Malassezia* является частью естественного микробиома кожи человека, где они синтезируют индольные алкалоиды на основе L-триптофана: индирубин, индолокарбазол и TP. Поскольку многие производные триптофана имеют сильный аффинитет к AhR и TLR, можно предположить, что патобиологическое значение указанных метаболитов *Malassezia* состоит в супрессии

антифунгального иммунного ответа и сдерживании воспалительного процесса в коже. Данное свойство позволяет *Malassezia*, пребывать на коже в состоянии комменсала в течение многих лет, не вызывая тяжёлых патоморфологических проявлений острого воспаления, таких как зуд, гранулёматоз, эритема, отёк и так далее, даже при прогрессировании заболевания (Vlachos et al., 2012; Mexia et al., 2019).

Отсюда, очевидно, что путём ингибирования TLR, STAT и NF-κB и стимуляции активности AhR TR способен ограничивать ответ антигенпрезентирующих, хелперных (в частности Th2-клеток), киллерных и фагоцитарных клеток на воспалительные стимулы. Тем самым TR снижает пролиферативный потенциал и препятствует фенотипическому созреванию иммунокомпетентных клеток и ингибирует их способность осуществлять синтез провоспалительных медиаторов, определяющих патогенез аллергических и других воспалительных заболеваний. В частности, за счёт влияния на указанные молекулярные мишени осуществляется отмеченная для TR мощная цитокин-ингибирующая активность в отношении различных интерлейкинов, интерферонов, факторов некроза опухоли, колониестимулирующих факторов, тимического стромального лимфопоэтина и других цитокинов на всех стадиях воспалительного ответа. Кроме того, с ингибированием активности NF-κB может быть связана способность TR снижать уровень экспрессии ЦОГ-2 и iNOS. Поскольку NF-κB, как один из универсальных факторов транскрипции, участвует в экспрессии генов данных ферментов (Han et al., 2014; Cheng et al., 2020; Iwaki et al., 2011).

Установленный для TR не прямой ингибирующий эффект на 5-липоксигеназу (5-LOX), ЦОГ-2 и iNOS – ферменты, используемые иммунными клетками в становлении воспалительного ответа, играет не менее важную роль в противовоспалительном действии TR (рисунок 1). ЦОГ-2 и 5-LOX – ключевые энзимы, которые осуществляют биосинтез провоспалительных продуктов метаболического каскада арахидоновой кислоты (лейкотриенов и простагландинов). iNOS катализирует образование NO из аргинина, кислорода и NADPH в фагоцитах и гранулоцитах. В ряде исследований было установлено, что за счёт супрессорной активности в отношении 5-LOX, ЦОГ-2 и iNOS TR эффективно ингибирует образование NO и синтез простагландина E2 (PGE2) и лейкотриена B4 (LT-B4), повышение уровня которых является важным звеном патогенеза всех воспалительных заболеваний (Ishihara et al., 2000; Danz et al., 2002).

Повышенный синтез PGE2, LT-B4, NO, наблюдается в процессе развития аутоиммунных реакций. При воспалительном ответе PGE2 ответственен за пирогенный эффект, гипералгезию (усиление болевой чувствительности), вазодилатацию (релаксация гладкой мускулатуры в стенках кровеносных сосудов, что ведёт к расширению сосудистых

просветов и адгезии лимфоцитов и фагоцитов в очаге воспаления), а LT-B4 опосредует экссудацию плазмы и хемотаксис иммунных клеток в очаг воспаления, способствуя образованию воспалительного отёка. Провоспалительный эффект NO заключается в окислительном повреждении клеток нормальных тканей, а также в расширении сосудов и увеличении проницаемости эндотелия, что облегчает инфильтрацию иммунных клеток и белков в очаг воспаления. Кроме того, на поздней стадии воспалительного процесса NO стимулирует дополнительный синтез и высвобождение некоторых провоспалительных интерлейкинов: ИЛ-1, ИЛ-2 и ИЛ-6, оксипинов и хемокинов, усиливая воспалительный процесс (Dennis and Norris, 2015). Очевидно, TR, ингибируя образование данных медиаторов, снижает их физиологическое действие на организм при воспалительных процессах.

У TR также была обнаружена антиангиогенная активность, которая связана с его способностью подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов в G2/M фазе, путём нарушения передачи сигнала от VEGF/EGFR. Важную роль в патогенезе кожных воспалительных заболеваний играет нарушение ангиогенных процессов, следствием которого может стать усиление периферического кровообращения, за счёт неоваскуляризации (разрастание сосудов), увеличения размера и проницаемости кровеносных сосудов, что способствует поступлению иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления. Клинически это проявляется в виде гранулёмы, гиперемии, зуда, часто с появлением некротических участков в поврежденном участке тканей. Предполагают, что TR препятствует передаче сигнала от VEGF/EGFR путём ингибирования фосфорилирования ERK1/2 и АКТ, которые принимают сигнал от стимулированного VEGFR и запускают экспрессию генов, обеспечивающих пролиферацию, миграцию и рост эндотелиальных клеток, с образованием новых сосудов (рисунок 1). Тем самым TR уменьшает клинические проявления воспалительной реакции в эпидермисе при дерматозах разной этиологии (Chang et al., 2015; Chang et al., 2019).

Таким образом, за счёт влияния на вышеперечисленные мишени TR ограничивает избыточный ответ иммунокомпетентных клеток, как на стадии инициации, так и прогрессии воспалительного процесса.

Необходимо отметить, что в дерматопротекторном действии TR важную роль играет также его выраженная бактерицидная и антифунгальная активность. TR оказывает антибактериальный эффект в отношении различных штаммов стафилококков (например, *Staphylococcus aureus* и *S. epidermis*), некоторых патогенных микроорганизмов: *Bacillus subtilis*, *Escherlichia coli*, *Helicobacter pylori* и микобактерий, в частности *Mycobacterium*

tuberculosis. Антифунгальный эффект ТР направлен против дерматофитов рода *Trichophyton*, *Microsporum* и *Epidermophyton*. Данное действие несомненно вносит существенный вклад в терапевтическую активность ТР при лечении ран и аллергических дерматозов, поскольку кожа, поражённая аллергеном или повреждённая раневым процессом, крайне чувствительна к бактериальным и грибковым инфекциям, которые усиливают воспалительную реакцию и замедляют репаративные процессы в эпидермисе (Yurngdong, 2013; Hesse-Macabata et al., 2020).

Таким образом, накопленные данные позволяют говорить о том, что ТР является одним из самых перспективных дерматопротекторных агентов, оказывающего противовоспалительное, ранозаживляющее, противомикробное, антифунгальное и противоаллергическое действие. Следовательно, ТР может быть использован в качестве основного активного начала средств топикального применения при лечении кожных патологий разной этиологии: лоскутные, ожоговые и гнойные раны, контактный дерматит, псориаз, экзема, гранулематозные поражения кожи и другие, что и было продемонстрировано в данной работе.

1.2.3 Триптантрин и его производные как противоопухолевые агенты

Многokратно показано, что ТР, как и многие другие растительные алкалоиды, обладает противоопухолевой активностью. Установлено, что ТР оказывает выраженное цитотоксическое действие *in vitro* в отношении различных линий опухолевых клеток человека и животных, в том числе обладающих резистентностью к противоопухолевым препаратам, таким как ДР. При этом в высоких концентрациях ТР содействует апоптотической гибели клеток по митохондриальному и Fas-индуцируемому пути, а в низких дозах может способствовать редифференцировке опухолевых клеток, то есть переключать атипичные клетки с опухолевого фенотипа на более специализированный (Yu et al., 2007; Jao et al., 2008; Kimoto et. al., 2001). Противоопухолевое действие ТР, вероятно, осуществляется за счет отмеченного выше супрессорного эффекта в отношении STAT3 и NF-κB, а также сигнального пути VEGF/EGFR/ERK. Путём ингибирования указанных сигнальных белков ТР подавляет экспрессию генов, ответственных за синтез ростовых и других факторов, обеспечивающих пролиферацию, ангиогенез, инвазию и метастазирование опухолевых клеток, и тем самым препятствует промоции и прогрессии опухолевого процесса (Liao et al., 2013). Исследования противоопухолевой активности ТР

in vivo показали, что применение ТР сдерживает развитие злокачественной меланомы и рака кожи, индуцированного ДМБА. Предполагают, что механизм терапевтического действия ТР против кожных опухолей частично реализуется за счёт его влияния на функциональную активность β -катенина – белка с двойной функцией, участвующего в регуляции и координации межклеточной адгезии, транскрипции генов и пролиферации клеток эпителия, в том числе кератиноцитов и меланоцитов. Его гиперактивация может стать причиной опухолевой трансформации клеток кожи (Shankar et al., 2020; Antony et al., 2015).

Несмотря на наличие противоопухолевого эффекта, применение ТР в качестве химиотерапевтического средства ограничено плохой растворимостью в воде и биологических жидкостях, высокой хронической токсичностью и выраженным иммуносупрессивным действием. Поэтому весьма популярным и перспективным направлением является получение и исследование биомедицинских свойств различных производных ТР, имеющих в разных положениях фенильного фрагмента, такие дополнительные группы, как NO₂, NH₂, C₂N₂, CH₃, CH₃O, Br, Cl, F и другие. Такие модификации молекулы ТР позволяют получать новые физиологически активные агенты, обладающие высокой противоопухолевой активностью, но меньшей токсичностью, лучшей растворимостью и биодоступностью, чем ТР. Антиканцерогенные свойства были показаны для ряда производных ТР, как в *in vivo*, так в *in vitro* тестах.

Наиболее известным считается бромированное производное ТР (ТР-Br). Установлено, что ТР-Br является сильным апоптотическим агентом в отношении клеточной линии промиелоцитарного лейкоза человека HL-60. ТР-Br содействует активации внутренних и внешних путей апоптоза, повышая реактивность каспаз-3, -8 и -9, а также проапоптотических белков семейства Bcl-2. Кроме того, ТР-Br препятствует пролиферации и выживанию HL-60, что обусловлено супрессией ERK и запуском убиквитин-зависимой деградации STAT3 (Pathania et al., 2014).

Другие исследования показали, что ТР-Br, а также хлорпроизводное ТР (ТР-Cl) оказывают более выраженный антимитотический и апоптотический эффект в отношении клеточной линии карциномы мочевого пузыря человека T-24, чем их предшественник ТР. При этом ТР-Br и ТР-Cl эффективно ингибировали клеточную пролиферацию и клеточный цикл в S-фазе клеток T-24, уменьшая активность телоизомеразы-II, циклина A и циклинзависимой киназы-2 и снижая уровень экспрессии главного протоонкогена белка c-myc. Одновременно с этим, ТР-Br и ТР-Cl способствовали повышению уровня апоптотических белков, таких как цитохром C, BAX и BAD, Araf-1, каспазы -3 и -9 и, как следствие, апоптотической гибели клеток T-24. Интересно, что в комплексе с платиной

(TPBr-Pt, TPCl-Pt) цитотоксическая активность данных производных усиливалась приблизительно в 8-10 раз (Qin et al., 2018).

Антимитотическое и апоптотическое действие было также обнаружено у бензо-ТР. Показано, что в клеточных культурах аденокарциномы кишечника HCT15 и человеческих эмбриональных клетках почек HEK293 бензо-ТР ингибирует топоизомеразу I и II, одновременно повышая активность каспазы-3. Кроме того, бензо-ТР оказывает цитотоксическое действие на линию клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, препятствуя развитию резистентности этих клеток к ДР и снижая уровень экспрессии белка множественной лекарственной устойчивости MDR1 (Jun et al., 2015).

Для дицианометиленового (TP6-C₂N₂), йод (TP8-I) и азотного (TP4-N) производных ТР установлен антипролиферативный и апоптотический эффект в отношении клеточных культур MCF-7, рака шейки матки HeLa, карциномы почек человека A498 и рака яичника человека SKOV3. При этом указанные выше производные ТР способствуют фрагментации ДНК и повышению активности каспаз 3 и 7. Для TP4-N также показано активирующее действие в отношении Fas-рецептора, который индуцирует развитие внешнего пути апоптоза (Yu et al., 2010).

Противоопухолевая активность также была обнаружена у метилированного ТР (TP8-CH₃) и фторпроизводного ТР (TF). Показано, что TP8-CH₃ способствует дифференцировке *in vitro* клеточной линии эмбриональной карциномы P19CL6 в спонтанно сокращающиеся кардиомиоцитоподобные клетки, а на экспериментальной модели карциномы Льюиса *in vivo* отмечено, что TF оказывает ингибирующее действие на метастазирование опухолевых клеток в легкие (Seya et al., 2014; Yang et al., 2013).

Следовательно, модификация молекулы ТР даёт возможность получать новые фармакологически перспективные соединения, которые действуют на разные мишени в опухолевых клетках и вызывают их гибель, ингибирование роста или редифференцировку. Такой подход позволит пополнить арсенал потенциальных противоопухолевых агентов.

1.3 Медико-биологические свойства тритерпеновых гликозидов женьшеня

1.3.1 Тритерпеновые гликозиды как основные действующие вещества корня женьшеня *Panax ginseng*

В настоящее время большой интерес для мировой медицины и фарминдустрии представляют тритерпеновые гликозиды даммаранового ряда группы протопанаксадиола и

протопанаксатриола, которые, главным образом, синтезируются лекарственными растениями рода *Panax* (женьшень) и поэтому получили название гинзенозиды. Наибольшее содержание этих гинзенозидов было обнаружено в зрелом корне женьшеня обыкновенного *Panax ginseng* С.А. Meyer – легендарном растении, широко распространённом на территории стран восточной Азии (Китае, Корее), а также на Дальнем Востоке, в частности, в Приморье. Данное растение активно применяется в традиционной восточной медицине уже более трёх тысяч лет и по сей день используется в приготовлении фармацевтических средств для лечения различных заболеваний. Хорошо известно, что суммарные экстракты корня женьшеня обладают: тонизирующим эффектом - задерживают наступление мышечного и умственного утомления; адаптогенной активностью - повышают устойчивость организма к изменяющимся неблагоприятным условиям окружающей среды, а также активизируют восстановительные процессы в организме после тяжёлых физических нагрузок и действия различных негативных факторов, оказывая при этом кардио-, гепато- и нейропротекторное действие. Кроме того, у препаратов женьшеня были обнаружены антиканцерогенные, противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства, на изучение которых направленно большое внимание современных исследователей (Mancuso et al., 2017; Евдокимова, 2011).

Приблизительно в начале 1960-х годов появились технические возможности, позволившие определить химический состав и выделить в чистом виде отдельные действующие вещества корня женьшеня. В России работу в этой области возглавил специалист в области органической химии природных соединений академик Еляков Г.Б., а в Японии химики Шибата С. и Танака О. Они были первыми, кому, независимо друг от друга, удалось выделить и установить структуру ряда индивидуальных гликозидов женьшеня тритерпеновой природы, получивших название гинзенозиды, а также показать, что именно эта группа соединений выступает в качестве основных действующих веществ женьшеня, определяющих лекарственные свойства этого растения (Попов, 2006).

На сегодняшний день известно, что большинство гинзенозидов женьшеня имеют тетрациклические агликоны даммаранового ряда, которые делятся на производные, протопанаксадиола (ППД) и протопанаксатриола (ППТ), главное структурное отличие между которыми заключается в том, что ППД содержит гидроксильную группу/сахарный остаток в положении С-3, С12 и С-20, а ППТ в положении С3, С-6, С12 и С-20. Реже встречаются гинзенозиды, принадлежащие к пентациклическим тритерпеноидам олеананового ряда (производные олеаноловой кислоты). По типу углеводной связи все гинзенозиды являются О-гликозидами, углеводная часть представлена главным образом

глюкозой, арабинозой, ксилозой, или арабинофуранозой. Так в зависимости от наличия и расположения гидроксигруппы или углеводного остатка в цикле ППД делятся на: Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, F2, Mc1, Mc, Mx1, Mx, C-O, C-Y, C-K, G17, G75, Rg3, Rh2, и APPD, а ППТ на: Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1, F1, APPT, R1 и R2, производные олеаноловой кислоты обозначают Ro и Z-R1 (Shin et al., 2016; Yang et al., 2015). При этом, установлено, что Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re и Rg1 составляют около 70-80% от общего содержания гинзенозидов в корне самого популярного вида женьшеня *Panax ginseng*, остальные являются минорными (Noh et al., 2009; Кочкин и др., 2018).

Исследования биомедицинских свойств гинзенозидов показали, что они как самостоятельные физиологически активные агенты имеют разную направленность терапевтического действия, чем и обусловлен множественный лечебный эффект женьшеня. Например, гинзенозиды Rb-группы способны оказывать седативный эффект на ЦНС, а также снижать артериальное давление, предотвращать атеросклероз и тромбообразование, тогда как представители Rg-группы напротив, стимулируют ЦНС и повышают артериальное давление. Гинзенозиды Ro-группы и Rc обладают противовоспалительной активностью. Rg1 проявляет гепатопротекторную активность, а Re, Rg3, Rc, Rd, Rh1 и C-K оказывают нейропротекторный эффект, снижая риск развития различных нейродегенеративных заболеваний. У Rh2, Rg3, M1, Z-R1 было отмечено противоопухолевое действие (Rajabian et al., 2019; Christensen, 2009).

Следовательно, получение отдельных гинзенозидов в чистом виде и изучение их биомедицинских свойств и механизма действия, является перспективной стратегией для разработки эффективных лекарственных средств разного назначения.

1.3.2 Особенности фармакологического действия гинзенозида Rh2

Среди всех известных гликозидов, обнаруженных в корне женьшеня, наиболее изученным и фармакологически перспективным считается гинзенозид Rh2, относящийся к производным протопанаксадиола. Несмотря на то, что Rh2 содержится в корне женьшеня в следовых количествах, именно он из всех гликозидов женьшеня отличается наиболее высоким медико-биологическим потенциалом (Попов, 2011; Jin et al., 2018). Вероятно, данный факт обусловлен тем, что в результате кислотного и бактериального гидролиза в животном организме подавляющая часть гликозидов женьшеня группы 20-S-протопаноксодиола, таких как Rg3, Rb1, Rb2 и Rc чаще всего превращается именно в Rh2

и его генин. (Попов и др., 1998; Baе et al., 2004). Среди спектра фармакологического действия Rh2, прежде всего, выделяют противоопухолевою, иммуномодулирующую и адаптогенную активность.

Особый интерес Rh2 представляет в качестве потенциального противоопухолевого агента. Согласно многочисленным литературным и экспериментальным данным, этот гинзенозид эффективно ингибирует рост и развитие различных видов опухолей, благодаря наличию прямого цитотоксического и цитостатического действия в отношении многих линий опухолевых клеток (Razina et al., 2010; Yang et al., 2016). Одновременно с этим, Rh2 проявляет способность повышать защитные функции организма, положительно влияя на его иммунологический статус: стимуляция иммуногенеза, усиление фагоцитарной активности макрофагов и нейтрофилов и цитотоксической активности NK и Т-киллеров, повышение синтеза некоторых цитокинов, участвующих в противоопухолевом иммунитете. Так усиление иммунного надзора опосредует антиканцерогенное действие Rh2. Кроме того, как и многие другие гликозиды женьшеня, Rh2 оказывает общеукрепляющий и адаптогенный эффект, тем самым стимулируя организм к выработке устойчивости и запуску восстановительных механизмов, в условиях стресса, в том числе при различных патологических состояниях (Попов и др., 1994; Попов и др., 2001; Wang et al., 2017).

Предполагается, что в основе всех молекулярных механизмов терапевтического действия Rh2, лежит его первичное мембранотропное действие, характерное для сапонинов из-за их амфифильности и поверхностной активности. Хорошо известно, что неполярные агликоны молекул гинзенозидов имеют высокое сродство к мембранным липидам, что позволяет им напрямую взаимодействовать с липидным бислоем. В результате этого взаимодействия изменяется подвижность и упорядоченность мембранных фосфолипидов, и как следствие микровязкость и проницаемость мембраны, что в последствии изменяет структурно-функциональные характеристики клетки.

Интересно, что у Rh2 были выявлены важные индивидуальные особенности мембранотропного действия. Во-первых, исключительной чертой Rh2 является то, что его мембранотропная активность обратно пропорциональна содержанию холестерина в мембране, то есть достигает максимума при взаимодействии с липидным бислоем, не содержащим холестерина. При этом Rh2 имеет достаточно сильное сродство к сфингомиелину, вероятно, за счёт этого происходит его направленное взаимодействие с определёнными мембранными структурами, например, с липидными рафтами, в которых содержится подавляющее количество мембранного сфингомиелина. Во-вторых, согласно

данным микрокалориметрического анализа и результатам изучения электропроводимости модельных липосомальных и плоских бислойных липидных мембран, встраиваясь в липидный бислой, молекулы Rh2 образуют между собой кооперативные структуры, с формированием проводящих структур в виде новых каналов диффузии (Лихацкая и др., 1990; Verstraeten et al., 2018). Поэтому, в отличие от многих других сильных мембранолитических гликозидов (например, гликозидов голотурий, образующих в очень низких концентрациях гликозид-холистериновые комплексы) Rh2 не вызывает фатальных деструктивных нарушений в плазматических мембранах клеток млекопитающих, а лишь вносит «мягкие» изменения в её структуру и функциональную активность. В связи с этим, была предложена концепция «мягкого стресса», согласно которой Rh2 оказывает мягкое влияние на микровязкость липидного бислоя плазматических мембран и их избирательную проницаемость, что является инициирующим сигналом для перестройки ряда внутриклеточных процессов, ведущих к изменению привычного физиологического состояния клетки (Попов, 2002).

При подобного рода стрессах, первичным клеточным ответом является сдвиг в редокс-балансе. Не случайно для Rh2 была установлена неспецифическая прооксидантная активность в различных клеточных культурах, что, вероятно, связано с повышением проницаемости липидного бислоя плазматической мембраны для H_2O_2 с последующим ростом уровня внутриклеточных АФК (Sodrul et al., 2018). В случае действия Rh2, главным физиологическим источником синтеза H_2O_2 , следует считать интегральные ферменты плазматических мембран семейства НАДФН-оксидаз (NOX и DuOX) (Sung et al., 2017). К настоящему времени в клетках млекопитающих обнаружены 6 изоформ НАДФН-оксидаз: NOX1-4, и DUOX 1 и 2. Наиболее хорошо изучена основная изоформа – NOX2, которая экспрессируется практически всеми типами клеток, но в большем количестве опухолевыми и фагоцитарными. Эта оксидаза переносит электроны через клеточные мембраны, восстанавливая при этом молекулярный кислород до супероксид-аниона, который затем вне клетки превращается в H_2O_2 с помощью супероксиддисмутазы 3 (СОД3), которая располагается в плазматической мембране, а ее активный центр экспонирован во внеклеточное пространство (Bertolotti et al., 2016).

В нормальных условиях облегчённый транспорт через плазматическую мембрану H_2O_2 , образованной в процессе НАДФН-оксидазного катализа, обеспечивают три основные изоформы аквапоринов: AQP1, AQP3 и AQP8. При действии Rh2, за счёт образования дополнительных каналов диффузии, резко увеличивается трансмембранная проницаемость для экзогенной H_2O_2 . Дальнейшее распространение «перекисной волны» от

плазматической мембраны «вниз по течению» вызывает стресс митохондрий и эндоплазматического ретикулума (ЭР). Впоследствии, в митохондриях и ЭР происходит дополнительное образование эндогенных АФК в результате окислительного фосфорилирования и окислительного фолдинга белков, соответственно. Далее, в цитозоле из молекулы H_2O_2 образуются более агрессивные радикалы: гидроксильный радикал ($OH\cdot$) – при реакции с ионами металлов переменной валентности (главным образом Fe^{2+}) и гипохлорная кислота ($HClO$) – при реакции с анионом хлора в присутствии миелопероксидазы. Кроме того, высокий уровень внутриклеточной H_2O_2 стимулирует синтез NO , который в результате реакции с супероксид анионом формирует самый реактивный из нитроксильных радикалов – пероксинитрит ($ONOO\cdot$). Результатом этих событий является сдвиг внутриклеточного редокс-баланса, что, в зависимости от типа клеток, либо приводит к клеточной гибели, либо содействует активации сигнальных путей и транскрипционных факторов, ответственных за функциональную активность и устойчивость клетки (Dalla et al., 2017; Bienert et al., 2014).

Важно отметить, что результатом отмеченной зависимости мембранотропной активности $Rh2$ от липидного состава является то, что его влияние на функциональное состояние опухолевых и нормальных клеток кардинально отличается. Эти отличия заключаются в том, что в одинаковых концентрациях $Rh2$ оказывает более сильное перфорирующие и прооксидантное действие на опухолевые клетки, чем на нормальные.

В первую очередь, это связано с тем, что для плазматических мембран опухолевых клеток характерно уменьшение микровязкости липидного бислоя, главным образом, вследствие снижения содержания холестерина, с чем часто связывают способность злокачественных клеток к активной пролиферации и метастазированию (Shergis et al., 2013; Li et al., 2016). Обратно пропорциональная зависимость мембранотропного действия $Rh2$ от содержания холестерина является одной из причин его более агрессивного перфорирующего действия на мембраны опухолевых клеток, и, как следствие, более сильного прооксидантного и цитотоксического действия. Относительно недавно было подтверждено, что повышение содержания холестерина в клеточной мембране, снижает цитотоксический потенциал $Rh2$ (Verstraeten et al., 2018).

Кроме того, следует отметить, что опухолевые клетки имеют свои особенности производства АФК, одной из них является преимущественно внеклеточное образование АФК, за счёт того, что в мембранах опухолевых клеток, количество НАДФН-оксидаз, в частности $NOX2$, на порядок больше, чем в нормальных. Считается, что функционирование $NOX2$ направленно, в основном, на образование супероксид аниона, который опухолевые

клетки используют для формирования токсического примембранного слоя, который контактирует с окружающими их здоровыми тканями и иммунокомпетентными клетками. Большая часть супероксид аниона перерабатывают в H_2O_2 ферментами СОД3. Рядом с NOX2, на мембранах опухолевых клеток, как правило, находится специализированный AQP8 пропускающий H_2O_2 в количестве, обеспечивающем пролиферативный процесс, в то время как AQP1 и AQP3 изоформы не функционируют (Vieceli et al., 2014). При этом опухолевые клетки менее устойчивы к окислительному стрессу, поэтому резкий рост внутриклеточных АФК и АФА, может вызывать окислительные повреждения жизненно важных макромолекул, ведущих либо к некрозу клеток, либо к запуску летальных клеточных программ: апоптоза и аутофагии (Kalyanaraman, 2013). Следовательно, дополнительные каналы диффузии, образованные Rh2, обеспечивают избыточное поступление H_2O_2 внутрь опухолевых клеток, что приводит к их преимущественной гибели.

Немаловажную роль в противоопухолевом действии Rh2 играет отмеченная для него способность влиять на структуру липидных рафтов. Липидные рафты, как наиболее упорядоченные структуры плазматических мембран, обеспечивают интернализацию различных мембранных белков. При этом для липидного состава рафт характерно наличие сфингомиелина, с которым преимущественно связывается Rh2, тем самым влияя на функциональную активность содержащихся в них рецепторов и мембранных ферментов. С этим во многом связана способность Rh2 запускать внешний путь апоптоза, через активацию рецепторов смерти, и нарушать работу многих адаптерных белков, которые, передавая сигнал от различных рецепторов, запускают сигнальные пути, обеспечивающие выживание, рост и пролиферацию клеток (Park et al., 2013).

Таким образом, селективное цитотоксическое и цитостатическое действие Rh2 в отношении опухолевых клеток, определяется сильным влиянием этого гинзенозида на их мембранную проницаемость, редокс-гомеостаз и функциональную активность рафтовых структур.

Поскольку в плазматических мембранах нормальных клеток содержится значительно больше холестерина и меньше NOX, чем в опухолевых, Rh2 не вызывает значительных повреждений их мембран и сильных сдвигов в редокс-балансе. Такое мягкое воздействие Rh2 на нормальные, в частности иммунокомпетентные клетки, напротив, стимулирует иммунные процессы и способствует активации сигнальных путей и транскрипционных факторов, обеспечивающих устойчивость и адаптацию организма к неблагоприятным условиям, в том числе к окислительному стрессу. Стоит отметить, что у иммунокомпетентных клеток хорошо развита антиоксидантная система защиты, поэтому

они более устойчивы к окислительному стрессу, чем опухолевые. Кроме того, иммунные клетки, особенно фагоциты, Т-киллеры и НК, сами генерируют высокие уровни АФК и АФА, и используют их как важное звено неспецифического иммунитета. Основные функции АФК и АФА – контроль пролиферации, дифференцировки и миграции иммунных клеток, стимуляция синтеза медиаторов иммунного ответа (цитокины, хемокины, иммуноглобулины и другие), а также они принимают непосредственное участие в уничтожении чужеродных или атипичных клеток (Yang et al., 2013).

Как итог, Rh2 выступает в качестве цитотоксического и цитостатического агента в отношении опухолевых клеток, одновременно являясь стимулятором активности и адаптогеном для нормальных клеток. Данная уникальная особенность Rh2 играет немаловажную роль в его противоопухолевом, иммуномодулирующем и адаптогеном действии.

Благодаря своей относительно мягкой цитотоксической активности, преимущественно в отношении опухолевых клеток, способности положительно влиять на иммунологический статус организма и адаптогенному эффекту, Rh2 рассматривается исследователями в качестве потенциального средства дополнительной противоопухолевой терапии. Неоднократно показано, что как *in vitro*, так и *in vivo* Rh2 способен повышать эффективность и одновременно смягчать тяжесть проявления побочных токсических эффектов некоторых известных и широко применяемых в химиотерапии препаратов. Например, установлено, что Rh2 усиливает апоптоз *in vitro*, индуцированный цисплатином в клетках немелкоклеточного рака легкого линии A549 и H1299 (Chen et al., 2019). Rh2 также повышает антимиотическое действие доксорубина (ДР) на клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 и препятствует развитию лекарственной резистентности (Hou et al., 2020; Zhou et al., 2012). На животных моделях меланомы B16 и гепатомы было показано, что циклофосфан, при применении в комбинации с Rh2, более эффективно ингибирует пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток и ангиогенез. Одновременно с этим Rh2 уменьшает иммунодепрессивное действие циклофосфана при онкологическом процессе, усиливая активность Т-лимфоцитов, макрофагов и стимулируя ими выработку различных цитокинов. Иммуностимулирующее действие Rh2 также было подтверждено на модели *in vivo* циклофосфан-индуцированного иммунодефицита (Wang et al., 2006; Qi et al., 2019).

1.4 Структурные особенности и биомедицинские свойства каротиноидов

1.4.1 Общая характеристика каротиноидов: классификация, биодоступность, физиологические функции

Класс каротиноидов (КР) представлен более чем 700 представителями природных жирорастворимых пигментов, входящих в состав самой многочисленной группы вторичных метаболитов – терпеноидов (изопреноидов). По химической природе КР являются тетратерпеноидами, так как основу структуры их молекулы составляет С-40 полиеновый углеводородный скелет, который построен из восьми изопреновых фрагментов и разделен на две зеркально симметричные С-20 части. Структура КР может иметь вид простой изопреновой ациклической цепи, например, красный пигмент томатов – ликопин, но чаще всего модифицирована: на одном или обоих концах две изопреноидные группировки образуют шестичленное, в редких случаях пятичленное кольцо (Eldahshan and Singab, 2013). Основная масса КР представлена именно бициклическими тетратерпеноидами, традиционно их делят на две группы: 1) каротины – обычные углеводороды. Данная группа представлена оранжевыми пигментами: β -, α -, γ - и δ -каротинами и 2) ксантофиллы (КТ) – кислородсодержащие производные каротинов, дополнительно содержащие: гидрокси-, метокси-, карбокси-, эпокси- или кето-функциональные группировки. КТ являются наиболее разнообразной и многочисленной природе группой КР (Jaswir et al., 2011).

На сегодняшний момент известно, что КР являются самыми распространёнными в природе пигментами и содержатся практически во всех живых организмах. Однако синтез КР способны осуществлять только высшие растения, водоросли, фитопланктон, фототрофные бактерии и отдельные виды актиномицетов, дрожжевых и низших грибов, поэтому они являются главными источниками КР. Основными биологическими функциями этих пигментов в организмах продуцентах являются: участие в световой фазе фотосинтеза, защита хлорофилла от фотоокисления, мембраностабилизирующее (регуляция транспортной и биосинтетической функции мембран), фотопротекторное и антиоксидантное действие. Животные и человек получают КР исключительно с пищей и могут лишь пассивно накапливать их в тканях. При этом КР являются незаменимыми факторами питания для животного организма, что подтверждается их высокой биодоступностью и широтой биологических функции (Takaichi 2011; Rosas-Saavedra and Stange, 2016).

Высокая биодоступность и легкая усвояемость являются одним из самых значимых преимуществ КР перед другими низкомолекулярными БАВ, что обусловлено их высокой липофильностью. Данное свойство позволяет КР посредством пассивной диффузии всасываться в энтероциты тонкого кишечника и легко взаимодействовать с основными белками переносчиками питательных веществ - липопротеидами (ЛП). Транспорт КР или их метаболитов из тонкого кишечника осуществляется хиломикронами (самые высокомолекулярные ЛП), которые через лимфатические протоки доставляют КР к гепатоцитам печени. Часть КР депонируется в печени, а другая часть захватывается ЛП различной плотности, в составе которых КР посредством кровотока распределяются по организму. Благодаря высокой липофильности молекулы КР легко проникают в липидный бислой плазматических мембран клеток всех видов тканей, что даёт им возможность накапливаться в различных органах. Так, при регулярном потреблении в пищу КР способны накапливаться в тканях животных и человека. При этом физиологическая роль КР в животном организме достаточно широка (Britton, 2020; Lintig et al., 2019; Fiedor and Burda, 2014).

Наиболее изучена А-провитаминная функция, ведь ферментативный гидролиз β -, α - и γ -каротина и β -криптоксантина в тонком кишечнике и печени животных – это единственный путь получения ретинола и его ретиноидных форм – ретинойвой кислоты и ретиналя. Ещё в период с 1911 по 1931 г. швейцарскому химику П. Карреру удалось установить, что каротин является предшественником витамина А, который представляет собой половину симметричной молекулы β -каротина с гидроксигруппой на конце изопrenoидной цепи ($C_{20}H_{29}OH$). В свою очередь, ретинол регулирует синтез коллагена и гликопротеинов, редок-гомеостаз организма, процессы эпителизации и кератинизации эпидермиса, а также выполняет иммуномодулирующую (стимуляция выработки интерферонов, иммуноглобулинов и лизоцима); ретинойвая кислота участвует в процессах пролиферации и дифференцировки клеток, а ретиналь является необходимым компонентом зрительного пигмента палочек (родопсина), обеспечивающего фоторецепцию и последующую передачу зрительного светового сигнала по зрительным нервам от сетчатки глаза в головной мозг (Rutz et al., 2016; Saini et al., 2015).

Изначально КР исследовались как агенты для профилактики и лечения ретинолового авитаминоза, и только во второй половине XX века было выявлено, что большинство КР не являются провитаминами А. Чаще всего, КР доставляются в ткани различных органов, не подвергаясь биотрансформации, и выполняют либо аналогичные витамину А, либо свои специфические функции. Среди наиболее значимых для организма биологических

активностей КР считают их мембранопротекторное, фотопротекторное и антиоксидантное действие (Alos et al., 2016).

Антиоксидантная активность большинства КР гораздо выше, чем у ретинола. За антирадикальные свойства КР в основном ответственны $C=C$ двойные связи в изопреноидной цепи, которые способны принимать неспаренный электрон, нейтрализуя тем самым, как не органические, так и органические радикалы. В силу высокой липофильности и преимущественной аккумуляции в липидной части клеточных мембран, действие КР направленно против свободорадикальных форм липидов $LO\cdot$, $LOO\cdot$, за счёт чего они эффективно обрывают цепную реакцию перекисного окисления липидов. При этом, отмеченная способность КР встраиваться в липидный бислой плазматической мембраны клеток позволяет им также выступать в качестве «скрепляющих» мембрану агентов, обеспечивая на молекулярном уровне защиту клеток организма от дестабилизирующего действия различных эндогенных и экзогенных факторов. Кроме того, КР могут существенно влиять на работу многих жизненно-важных мембранных ферментов, адгезивных молекул, рецепторов и активируемых ими сигнальных путей, что позволяет КР оказывать различные физиологические эффекты на организм (Garcia-de Blas et al., 2016).

Открытие многофункциональной роли КР в организме человека привела к тому, что на мировом рынке уже активно ведётся промышленное производство таких КР, как β -каротин, ликопин, астаксантин (АК), лютеин, зеаксантин, фукоксантин, виолоксантин, катаксантин. Данные представители КР, характеризуются высоким потенциалом защиты организма от широкого круга заболеваний и уже сейчас используются в пищевой, нутрицевтической, косметической и фармацевтической промышленности (Sathasivam and Ki, 2018). В многочисленных исследованиях отмечается, что включение в пищевой рацион КР является эффективным методом профилактики онкологических, аутоиммунных, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, дерматорлогических, офтальмологических и других заболеваний. Многие КР также используют в составе БАД общеукрепляющего действия для борьбы с повышенной утомляемостью. Они способны повысить выносливость организма при физических нагрузках и обеспечить устойчивость к гипоксии и окислительному стрессу, а также предупредить развитие серьезных метаболических расстройств, таких как диабет 2 типа, гиперлипидемия и ожирение (Chuyen et al., 2017; Panic et al., 2017; Leoncini et al., 2015; Babin et al., 2019).

Особое внимание уделяют позитивному влиянию КР на состояние кожных покровов. Был установлен интересный факт, касаемый распределения и депонирования КР в тканях различных органов, после их употребления в пищу. Показано, что после

транспортировки, в кровяном русле остаётся около 10%-тов КР (вероятно, оставшиеся в результате освобождения от ассоциации с хиломикронами в процессе их созревания в плазме лимфатических протоков), остальная часть аккумулируется в различных тканях. При этом наибольшая концентрация КР обнаруживается в жировой ткани, а также верхних слоях эпидермиса, куда они перемещаются посредством диффузии из подкожной жировой ткани или/и секретируются через сальные и потовые железы (Darvin et al., 2011).

Накапливаясь в клетках эпидермиса, КР обеспечивают защиту кожи от действия УФ излучения, повреждения свободными радикалами и различными химическими, токсическими веществами. Помимо этого, участие КР в процессах эпителизации, кератинизации и синтезе коллагена, способствует усилению репаративных процессов в эпидермисе, его обновлению, и как следствие замедлению возрастных изменений кожи. В связи с этим КР представляют интерес не только для пищевой, но и для косметической и космецевтической промышленности, для производства различных дерматопротекторных средств. Установлено, что использование средств наружного применения в совокупности с приёмом пищи и БАД, содержащих КР, способно улучшать состояние эпидермиса, а также предупредить развитие различных кожных заболеваний, в том числе аллергических и онкологических (Baswan et al., 2020).

Следовательно, широкий спектр медико-биологических свойств в сочетании с высокой биодоступностью и отсутствием побочных и токсических эффектов позволяют рассматривать КР в качестве потенциальных лечебно-профилактических средств и БАД. Поэтому на сегодняшний день не прекращается поиск новых природных источников КР, а также исследование их биомедицинских свойств с целью расширить спектр их применения в фармацевтике, косметологии и медицине.

1.4.2. Медико-биологические свойства оксигенированных каротиноидов, на примере астаксантина

Подкласс КТ представляют особый интерес для исследователей области фармакологии и биомедицины. В отличие от каротинов КТ характеризуются большим структурным разнообразием и распространённостью, а также наличием дополнительных кислородсодержащих функциональных групп в их молекулах, увеличивающих терапевтический потенциал КТ. Показано, что КТ обладают более выраженной канцерпривентивной, иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью, чем

каротины. Среди КТ наиболее известными являются АК, лютеин, зеаксантин, фукоксантин, виолоксантин, катаксантин.

АК считается одним из самых известных, распространенных и перспективных в фармакологическом плане КТ. Высокое содержание АК обнаружено в морских организмах: водорослях, особенно в микроводорослях *Haematococcus*, и в тканях, питающихся ими, креветок, крабов, морских звезд и лососевых рыб. Интерес к АК обусловлен уникальностью структуры его молекулы, которая заключается в том, что АК имеет две дополнительные кето- и гидроки- группы на каждом из колец его молекулы. Присутствие перечисленных функциональных групп придаёт АК насыщенный красный цвет, а также обуславливает широкий спектр его медико-биологических свойств (Shah et al., 2016).

Главным образом дополнительные функциональные группы увеличивают антиоксидантный потенциал АК (Ranga et al., 2014; Capelli et al., 2013). Не случайно АК был признан одним из наиболее эффективных антиоксидантов, превосходящий по скевенджерской активности α -токоферол и многие другие КТ. Интересно то, что АК не подвергается деградации после окисления, в отличие от многих других КР. Кроме того, полярность молекулы АК (полярные гетероциклы на двух концах и неполярный изопреновый участок в центре) создает условия для его легкой интеграции и трансмембранной ориентации в липидной части плазматической мембраны клетки. Это позволяет АК выступать в качестве защитного агента мембранных липидов от перекисидации, а также стабилизировать физико-химические свойства липидного бислоя мембраны, повышая устойчивость клетки к негативным воздействиям внешних факторов (Park et al., 2010; Raposo et al., 2015).

Антиоксидантные и мембранопротекторные свойства АК переплетаются у него с различными медико-биологическими активностями. Установлено, что АК обладает высоким антиканцерогенным потенциалом и модулирует иммунный ответ организма. Многочисленные данные, полученные в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, а также результаты эпидемиологических исследований показали, что регулярное потребление, таких КТ, как АК, снижает риск развития многих типов онкологических и воспалительных заболеваний. Показано, что АК ингибирует развитие рака кишечника, печени, почек, яичников и кожи (Milani et al., 2017; Bolhassani, 2015). Иммуномодулирующая активность АК проявляется в способности смягчать проявления, как острой, так и хронической воспалительной реакции, ведущей к развитию аутоиммунных заболеваний: различные типы гиперчувствительности, ревматоидный артрит, атеросклероз, аутоиммунный гепатит, сахарный диабет 2 типа, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и другие, а также содействующей

канцерогенезу. Канцепривентивный и иммуномодулирующий эффект АК во многом достигается за счёт его способности стабилизировать редокс-баланс и регулировать активность некоторых ферментов, рецепторов и биохимических путей, которые принимают участие в развитии воспалительного и онкологического процесса (Jiang et al., 2020).

Антиканцерогенное действие АК может осуществляться, за счёт известной способности КР ингибировать пролиферацию трансформированных клеток, принимая участие в регулировании клеточного цикла и содействуя индукции апоптоза. Показано, что АК ингибирует клеточный цикл в фазе G0/G1, путём снижения активности циклина D – кофактор циклинзависимых киназ, контролирующих смену фаз клеточного цикла, предшествующей делению клетки. Одновременно с этим АК повышает экспрессию ингибиторов белков циклинзависимых киназ: p53, p21 и p27. Кроме того, через повышение уровня активности p53, который также является одним из самых главных проапоптотических белков, АК, вероятно, содействует запуску апоптоза в атипичных клетках (Niranjana et al., 2015).

Также, показано, что АК инактивирует NF- κ B, JAK/STAT3-5, AP-1 и ERK2, запускающих экспрессию генов, продукты синтеза которых вовлечены в пролиферацию, рост и выживание трансформированных клеток (Talero et al., 2015). Супрессивное действие АК на указанные факторы транскрипции может осуществляться, как прямым ингибированием их фосфорилирования, так и может быть связано и с его радикал-скевенджеровой активностью, поскольку уровень внутриклеточных АФК является одним из важнейших факторов, определяющих уровень их активности (Kowshik et al., 2014).

Отмеченная иммуномодулирующая активность АК, которая достигается за счёт влияния на функциональную активность иммунокомпетентных клеток, также содействует его антиканцерогенному действию. Показано, что АК повышает активность цитотоксических лимфоцитов (Т-киллеров и NK) – основных клеток иммунной системы, непосредственно участвующих в уничтожении трансформированных и опухолевых клеток. Важно то, что АК содействует процессу распознавания атипичных Т-киллерами и NK, путем стимуляции антигенпрезентирующей активности макрофагов и нейтрофилов и регуляторных функций Т-хелперов. АК также повышает синтез В-клетками IgM, G и A, которые обеспечивают опсонизацию атипичных клеток. Таким образом, АК препятствует уклонению опухолевых клеток от иммунного надзора. Кроме того, АК является сильным индуктором синтеза ИНФ- γ , участвующего в противоопухолевом иммунитете, что также определяет антиканцерогенный эффект АК (Lin et al., 2015; Weihong et al., 2016; Jeong and Kim, 2020).

При воспалительных процессах АК функционирует как корректор редокс-гомеостаза и регулятор уровня различных провоспалительных медиаторов. Например, АК препятствует образованию NO и PGE₂, ингибируя уровень экспрессии iNOS и COX-2. Кроме того АК снижает синтез провоспалительных цитокинов, что вероятно обусловлено способностью АК препятствовать гиперактивации NF-κB, STAT и AP-1, в том числе спровоцированной повышенным содержанием H₂O₂ (Choi et al., 2009; Yasui et al., 2011). Кроме того, показано, что АК повышает уровень экспрессии тирозиновой протеинфосфатазы SHP-1, содержащейся преимущественно в клетках миелоидного и лимфоидного ряда. Основная функция SHP-1 - снижение активности иммунных клеток, путём нарушения работы тирозиновых протеинкиназ, которые обеспечивают передачу сигнала от рецепторов иммунных клеток, стимулированных внешними воспалительными факторами (Galasso et al., 2017).

Антиканцерогенное, противовоспалительное и общеукрепляющее действие АК, также может быть связано с его способностью принимать участие в обезвреживании и элиминации ксенобиотиков, за счёт стимуляции активности AhR и Nrf2. Таким образом, АК стимулирует механизмы, действие которых направлено на защиту клеток организма от действия различных токсинов, химических канцерогенов и аллергенов, тем самым снижая риск возникновения аллергических и онкологических процессов (Kaulmann and Bohn, 2014; Yang et al., 2012).

Отдельно стоит отметить, характерную для многих КР, способность АК накапливаться в коже и оказывать протективный эффект при различных дерматологических заболеваниях. Выявлено, что АК оказывает фотопротекторное действие: препятствует индуцируемому УФ воздействием повреждению молекул коллагена и эластина, фотоокислению, выработке мелатонина и гиперпигментации. Кроме того, АК обеспечивает защиту клеток эпидермиса от токсического действия свободных радикалов аллергенов и канцерогенов, запускает репаративные процессы в коже, через стимуляцию эпителизации и синтеза белков соединительной ткани, а также поддерживает оптимальный иммунологический статус эпидермиса (Tominaga et al., 2012; Davinelli et al., 2018). Таким образом, АК способен препятствовать возрастным изменениям кожи, в частности фотостарению, и снижает риск развития различных кожных патологий, в том числе аллергических и онкологических заболеваний.

2 Материалы и методы исследования

2.1 Общая характеристика объектов исследования

Получение ТР и разработка его лекарственной формы – препарата «Коурохитин». Хиназолиновый алкалоид ТР был получен из изатина путем органического синтеза на опытном производстве ТИБОХ ДВО РАН. Для повышения растворимости и биодоступности ТР в качестве носителя ТР использовали хитозан. Так была разработана и запатентована лекарственная форма ТР, получившая название «Коурохитин». Препарат представляет собой водно-гелевую суспензию, в которой ТР равномерно распределён в хитозане. При моделировании дерматологических заболеваний «Коурохитин» использовали в виде мази следующего состава: ТР – 0,01%, хитозан – 0,1%, дистиллированная вода и ланолин-вазелиновая смесь (1:3, по весу) – всё остальное. Для интроперитонеальных инъекций ТР растворяли в водном растворе диметилсульфоксида (ДМСО) (10:1, по объёму).

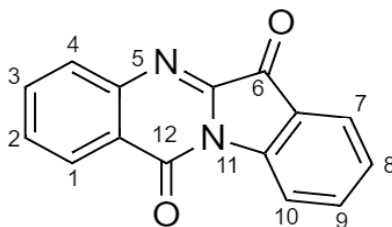


Рисунок 2. Структурная формула ТР - 6,12-дигидро -6,12-диоксоиндол (2,1)-хиназолин. Молекула ТР представляет собой хиназолиновый скелет (бензольное + пиримидиновое кольцо) конденсированный с индольным ядром (бензольное + пиррольное кольцо) с двумя атомами азота в положении 1 и 7 и двумя карбонильными группами в 6 и 12 позиции

Получение водорастворимого производного ТР мостотрина (МТ). МТ был получен путем органического синтеза сотрудниками ДВФУ под руководством доцента, к.х.н. Московкиной Т.В. при сотрудничестве с лабораторией химии морских организмов ТИБОХ ДВО РАН под руководством академика Стоника В.А. Синтез МТ проводился в

реакции ТР с реагентом Жирара в уксусной кислоте на глицериновой бане при 90°C. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* МТ использовали в виде водного раствора.

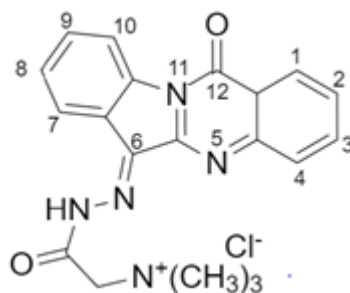


Рисунок 3. Структурная формула МТ – N,N,N-триметил-2-оксо-2-[2-(12-оксоиндоло[2,1b]-хиназолин-6(12Н-илиден)-гидразинил]-этиламмониум хлорид.

Гинзенозид Rh2 был получен в ТИБОХ ДВО РАН пятиступенчатым органическим синтезом ст. н. с. Атопкиной Л.Н. Идентичный природному гинзенозиду Rh2 был синтезирован путём конденсации 12-О-ацетилпроизводного 20 (S) -протопанаксадиола [даммар-24-ен-3β, 12β, 20 (S) -триола] с тетра-О-ацетил-α-d-глюкопиранозилбромидом в дихлорэтаноле в присутствии оксида серебра с последующим удалением защитных групп метоксидом натрия в метаноле. Протопанаксадиол, в свою очередь, получали из бетулафолиентриола с помощью 3-кето-12-О-ацетилпроизводного с последующим восстановлением борогидридом натрия. Как в экспериментах *in vivo*, так и в тестах *in vitro* гликозид Rh2 использовали в водно-спиртовом растворе (1:50) в виде опалесцирующей белой суспензии.

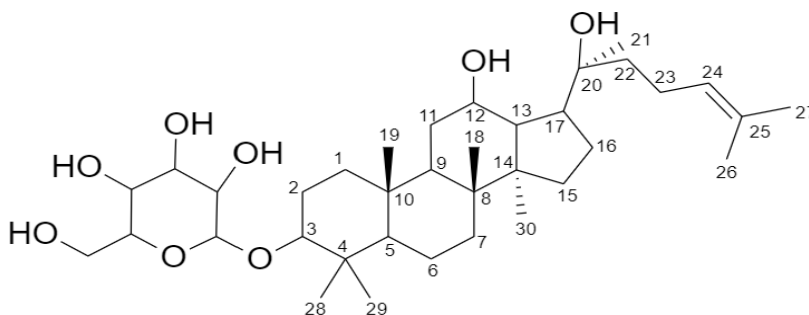


Рисунок 4. Структурная формула гинзенозида Rh2 – D-3β-О-глюкопиранозид-20(S)-протопанаксадиол.

Смесь окисгенированных каротиноидов (СОК). СОК была выделена из морской звезды *P. pectinifera* прямой экстракцией 96%-ным раствором этилового спирта и любезно предоставлена сотрудниками лаборатории биотехнологии ТИБОХ ДВО РАН (зав. лаб. – д.б.н. Артюков А.А.). Методом ВЭЖХ было установлено, что доминирующим компонентом экстракта является АК 30-50%, также в состав СОК входят лютеин и зеаксантин.

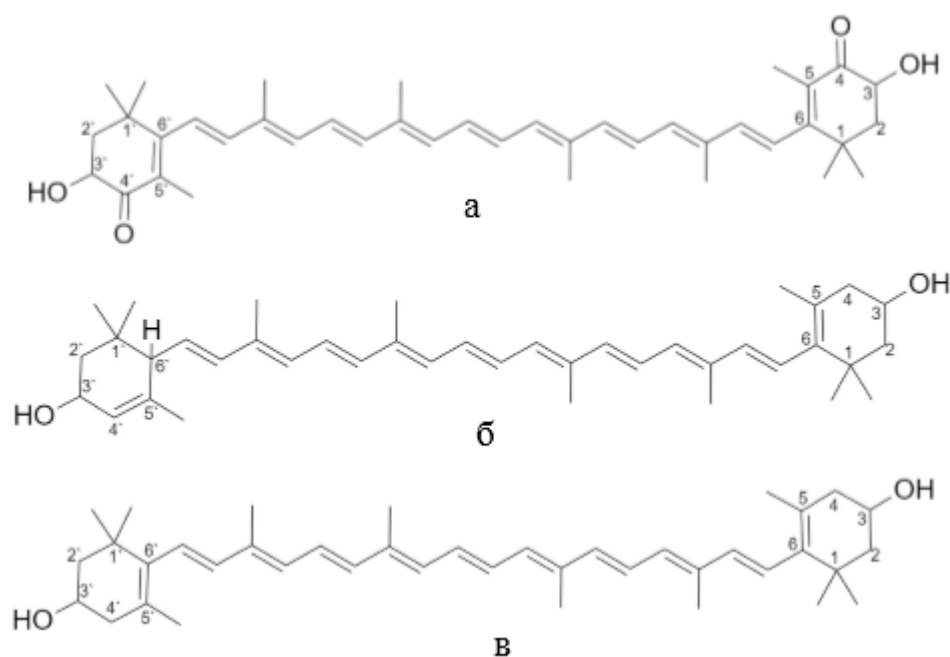


Рисунок 5. Структурные формулы, АК – (3S,3'S)-3,3'-дигидрокси-4,4'-дикето- β,β -каротин-4,4'-дион (а), Лютеина – (3S,3'S)-3,3-дигидрокси- α,β -каротин-3,3'-дион (б) и Зеаксантина – (3S,3'S)-3,3-дигидрокси- β,β -каротин-3,3'-дион (в).

Кроме того, в составе СОК были обнаружены окистероиды и свободные жирные кислоты, в наибольшем количестве содержится эйкозопентаеновая. Наружные 1%-ные мазевые препараты СОК готовили на ланолин-вазелиновой основе (1:3, по весу). При интродермальных и *per os* способах введения СОК использовали в виде водной суспензии.

2.2 Оценка медико-биологических свойств исследуемых БАВ

2.2.1 Экспериментальные животные

Все эксперименты *in vivo* выполнены на белых беспатогенных мышах линии CD-1 и BALB/c (22 ± 2 г), которые были получены из питомника лабораторных животных «Пушино» и разведены в виварии ТИБОХ ДВО РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (по ГОСТ Р 50258-92). Эвтаназию животных проводили, соблюдая "Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных", утвержденные МЗСР РФ. Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р 53434-2009).

2.2.2 Иммунологические и биохимические анализы

Функциональное состояние иммунной системы лабораторных животных при экспериментальном моделировании различных патологий, оценивали путём определения уровня цитокинов в биообразцах методом твердофазного, неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) сендвич-типа, используя диагностические наборы ELISA Mouse set (BD Bioscience, US). Оптическую плотность (абсорбцию) регистрировали на планшетном спектрофотометре ELS 808 (BioTeck, США) при длине волны 450 нм. Было измерено содержание следующих цитокинов: интерлейкины-1, 2, 4, 6, 10 и 17 (ИЛ-1, 2, 4, 6, 10, 17), интерферон-гамма (ИФН- γ), фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ).

Степень нарушения процессов кроветворения, функции печени и желчевыводящих путей определяли по содержанию общего билирубина в сыворотке крови экспериментальных животных, с помощью биохимических наборов Новоглюк-КМ («Вектор-Бест», Россия). Выраженность свободно-радикальных процессов при патологических процессах определяли по содержанию в сыворотке крови ТБК-реактивных продуктов – реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) (Sigma, США), уровень образования которых выражали в виде концентрации малонового диальдегида (МДА).

Оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре ELS 808 (BioTeck, США) при длине волны 550 нм.

2.2.3 Модель асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха

На данной модели исследовали противоопухолевое действие гинзенозида Rh2 и МТ. Химиотерапевтический эффект Rh2 и МТ оценивали в режимах монотерапии и при их комбинированном применении с коммерческим препаратом «Доксорубин-Тева» (Pharmachemie, Нидерланды) (ДР).

При моделировании асцитного варианта опухоли, использовали семидневную первичную культуру клеток аденокарциномы Эрлиха, перевиваемую на беспатогенной линии мышей CD-1. Для трансплантации опухоли, интродуперитонеально вводили по 3×10^6 опухолевых клеток на мышшь в объеме 0,5 мл 1%-ного фосфатно-солевого буфера (PBS). Лечение начинали через сутки после инокуляции опухоли. Курс лечения, который составлял 5 дней, представлял собой ежедневные интродуперитонеальные инъекции растворов Rh2 (10 мг/кг), МТ (5 и 10 мг/кг), ДР (0,25 мг/кг) и их сочетания в объеме 0,5 мл.

Противоопухолевый эффект оценивали по средней продолжительности жизни (СПЖ, дни), увеличению продолжительности жизни (УПЖ, %) и выживаемости животных опухоленосителей (% животных выживших к концу эксперимента), по сравнению с группой К(-).

УПЖ рассчитывали по формуле:

$$\text{УПЖ \%} = \frac{\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_k}{\text{СПЖ}_k} \times 100\%$$

где СПЖ₀ и СПЖ_к – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных соответственно

2.2.4 Модель солидного варианта аденокарциномы Эрлиха

На данной модели оценивали противоопухолевое действие гинзенозида Rh2, как в режиме монотерапии, так и при их комбинированном применении с ДР. При моделировании солидного варианта опухоли суспензию первичных клеток аденокарциномы Эрлиха ($1,5 \times 10^6$ кл/мышшь) в 0,2 мл 1%-ного PBS трансплантировали подкожно во внутреннюю часть бедра правой задней лапы экспериментальных животных.

Влияние указанных соединений на опухолевый процесс исследовали, как на стадии формирования, так и интенсивного роста опухоли.

В первом случае, курс лечения, который составил 5 дней, начинали через сутки после инокуляции опухоли. При этом гинзенозид Rh2, ДР и их сочетание вводили подкожно в 0,2 мл. После лечения вели наблюдение за экспериментальными животными, в период которого фиксировали изменение количества животных с опухолью и размера опухоли (средний объём опухоли) в каждой группе животных. Расчёт объёма опухоли проводили по формуле:

$$V = \pi/6 \times L \times W \times H,$$

где V – объём опухоли в контрольный срок наблюдения (5, 10, 13, 17 день после инокуляции опухоли); L, W, H – линейные размеры опухолевого узла (длина, ширина и высота).

На 17-тые сутки опухолевого роста животных подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом, после чего животных препарировали и отделяли поверхностный пласт опухолевой ткани для оценки веса опухоли. Эффективность противоопухолевой терапии исследуемыми соединениями в указанных режимах их применения оценивали по торможению роста опухоли (ТРО в %) в каждой группе животных-опухоленосителей. Расчёт ТРО проводили по формуле:

$$\text{ТРО} = \left(1 - \frac{T}{C}\right) \times 100\%$$

где T и C – средние значения (в мг) конечного веса опухоли в опытной и контрольной группах соответственно.

Также в день терминации эксперимента получали образцы цельной крови для гематологического анализа, который проводили на гематологическом анализаторе CELL-DYN 3700 (USA).

Во втором случае, лечение животных начинали спустя 5 дней после трансплантации опухолевых клеток (при объёме опухолевого узла $58 \pm 2,5 \text{ мм}^3$). При этом Rh2, ДР и их сочетания вводили интроперитонеально в объёме 0,5 мл. Курс лечения препаратами составлял 5 дней, после которого вели наблюдение за экспериментальными животными в течении 22 дней. В период наблюдения фиксировали изменение размера опухоли в каждой группе животных.

Эффективность противоопухолевой терапии исследуемыми препаратами в указанных режимах их применения оценивали по их влиянию на динамику роста опухолевого узла и ТРО. В день терминации эксперимента (22 день после трансплантации

опухоли) животных подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом, отделяли поверхностный пласт опухолевой ткани для визуальной оценки состояния опухоли.

2.2.5 Экспериментальное моделирование кожного канцерогенеза

На модели кожного канцерогенеза, индуцированного 7,12-диметилбензантрацен (ДМБА) (Sigma, США) согласно (Farnoush and Mackenzie, 1983), проводили оценку канцерпривентивной активности СОК.

Из химических канцерогенов наибольшей канцерогенной активностью обладают полициклические ароматические углеводороды, такие как ДМБА, который легко проникает в клетки кожи, и, накапливаясь, образует генотоксичные, канцерогенные продукты. При участии различных изоформ цитохрома - P450 (CYP), преимущественно CYP1A1, CYP1A2 и CYP1B1, ДМБА метаболизируется до окончательного канцерогена - 1,2-эпоксид-3,4-диол. Этот активный метаболит ДМБА обладает высокой реакционной способностью и может образовывать ДНК-аддукты, связываясь с пуриновыми основаниями (особенно гуанином), что приводит к мутациям в ДНК, запускающим опухолевую трансформацию клеток.

Для моделирования кожного канцерогенеза, ДМБА растворяли в бензоле и наносили на выбритую межлопаточную область экспериментальных животных в дозе 10 мкг на мышь, 3 раза в неделю в течение 8 недель. СОК и вещество сравнения - розмариновая кислота (Sigma, США), которая обладает выраженным антиканцерогенным, антиоксидантным и противовоспалительным эффектом при кожном канцерогенезе, индуцированном ДМБА, вводили перорально в дозе 10 мг/кг в объёме 0,2 мл одновременно с аппликацией канцерогена.

После появления опухолевых зачатков в каждой группе еженедельно фиксировали патоморфологические изменения эпидермиса: изменение количества животных с опухолью, размер опухолевых образований (диаметр, мм) и латентный период (период между появлением первых признаков онкогенеза до появления в группе 50%-ого количества животных с опухолью), который рассчитывали по формуле:

$$ЛП = \frac{\sum FX}{N}$$

где F – количество опухолей, появившихся за неделю, X – количество недель, на момент учёта, N – суммарное количество опухолей.

На терминальной стадии эксперимента (15-я неделя) получали образцы сывороток крови и биопатов кожи для биохимических (уровни билирубина и МДА) и иммунологических (ИФА) анализов.

2.2.6 Экспериментальная модель аллергического контактного дерматита

Данную модель использовали для оценки противоаллергической активности мазевых форм СОК и препарата «Коурохитин».

Аллергический контактный дерматит (АКД) – классическая форма реакции гиперчувствительности замедленного типа. Она возрастает по мере введения в бытовую практику новых химических веществ, входящих в состав лекарств, косметических продуктов, средств бытовой химии и т.д., которые легко проникают в клетки кожи, вызывая аллергическую реакцию. После контакта с аллергеном в пораженном очаге кожи антигенпрезентирующие клетки (тучные, дендритные клетки и клетки Лангерганса) передают сигнал Т-клеткам и макрофагам, играющих ключевую роль в патогенезе АКД, так как именно они оказывают цитотоксическое действие, на сенсibilизированные аллергеном клетки. В следствие этого, на коже формируются патофизиологические проявления воспаления, в виде зуда, гиперемии, отёка и уплотнения участка кожи с очагами некроза.

Экспериментальный дерматит воспроизводили согласно (Yuan et al., 2010) с помощью облигатного аллергена 2,4-динитрофторбензола (ДНФБ) (Sigma, США), который использовали в виде масло-ацетоновой смеси (соотношение ацетон : оливковое масло 4:1, по объёму). Для аллергической сенсibilизации на выбритый участок брюшины экспериментальных животных однократно наносили 0,5%-ный раствор ДНФБ, а спустя 6 дней 0,2%-ную смесь аллергена двукратно наносили на внутреннюю и внешнюю поверхность уха с интервалом в 2 дня. Через сутки после последней аппликации ДНФБ, начинали лечение тестируемыми мазями СОК и «Коурохитин», а также коммерческой мазью сравнения «Фуцидин» (Лео Лэбораторис Лимитед, Ирландия), которые применяли топикально 1 раз в сутки в течении 4-х дней.

Для анализа противоаллергической активности препаратов, проводили ежедневную оценку состояния поражённых участков кожного покрова, используя в качестве меры АКД показатель эритемы (гиперемия, лихенизация, часто с образованием поверхностной геморрагической корки и участков некроза). Выраженность эритемы определяли визуально по линейке С. В. Суворова (в баллах: 0 -отсутствие эритемы; 1 -слабая (розовый тон); 2 - умеренно выраженная (розово-красный тон); 3 - выраженная (красный тон); 4 - резко выраженная (ярко-красный тон)).

На терминальной стадии эксперимента проводили забор крови у экспериментальных животных и измеряли уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотки крови, методом ИФА, для сравнительной оценки развития воспалительного процесса в каждой группе животных.

2.2.7 Экспериментальная модель системного воспаления

При моделировании СВ в качестве индуктора использовали липополисахарид (ЛПС) из *E. coli* (Sigma, США) согласно (Dudhgaonkar et al., 2009). Бактериальный эндотоксин ЛПС при попадании в системный кровоток вызывает активацию клеток моноцитарно-макрофагальной системы, усиливая их ответ до в 1000 раз. Посредником между клеткой и ЛПС служат TLR 4-го типа. Активированный TLR4 вызывает включение ряда транскрипционных факторов, ответственных за синтез целого ряда медиаторов воспаления. Процесс обычно начинается с производства цитокинов первой линии реагирования, а именно: ИЛ-1, ФНО- α , ИЛ-6, синтез которых запускается после активации TLR4 многими типами клеток буквально через минуты. На прогрессивной стадии воспаления TLR4 стимулирует выработку ИНФ- γ , который многократно усиливает воспалительный ответ.

Для индукции воспаления, ЛПС растворяли в 1%-ном растворе PBS и интроперитонеально вводили экспериментальным животным в дозе 0,1 мг/кг в объеме 0,5 мл. СОК, ТР и препарат сравнения – «Офтан-Дексаметазон» (Сантэн АО, Финляндия) вводили интроперитонеально в дозе 1 мг/кг и перорально в дозе 10 мг/кг (ТР только интроперитонеально в дозе 10 мг/кг) за 1 час до введения ЛПС. Спустя полтора часа после индукции воспаления ЛПС, проводили забор крови и получали сыворотку крови для биохимических (билирубин и МДА) и иммунологических анализов (ИФА).

2.2.8 Экспериментальная модель лоскутных и термических ран

Данную модель использовали для исследования ранозаживляющей активности препарата «Коурохитин» (Билич, Колла, 1978). Лабораторным животным удаляли волосяной покров в участке, включающего правую часть поясницы и верхнюю часть бедра. Для нанесения термической раны, медный стержень с плоским торцом диаметром 6 мм нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 сек, затем на 5-6 сек прижимали торцом к выбритому участку кожи животного. Для получения лоскутных ран анатомическим пинцетом оттягивали кожную складку, зажимая около 1 мм кожи, данный участок удаляли с помощью глазных ножниц.

Аппликации мази «Коурохитин», содержащей 0,01% ТР, и препаратов сравнения «Метилурацил» (Нижфарм АО, Россия) и «Фуцидин» начинали спустя 2 дня после нанесения ран. Курс лечения составлял 5 дней. В процессе эксперимента проводили ежедневную оценку состояния раны: формирование струпа, состояние струпа, наличие периферической эпителизации, отечность и гиперемия краев раны, заживление и степень восстановления кожного покрова.

Для измерения размера повреждённого участка, к ране прикладывали покровное стекло и переносили на него контуры раны, которые затем оцифровывали с помощью сканера в графический файл формата «BMP». Площади ран определяли с помощью программы Adobe Photoshop CS (version 8.0): устанавливали экранную решетку со стороной квадрата 0,25 мм², а затем подсчитывали количество квадратов, охватываемых контуром раны. Заживление раны рассчитывали в процентах по формуле:

$$X = 100 - (S_K \times 100/S_{ис}),$$

где S_K – конечная площадь раны, $S_{ис}$ – исходная площадь раны.

2.2.9 Оценка влияния Rh2 на редокс-статус различных клеточных культур

Оценку способности Rh2 влиять на редокс-статус первичных культур опухолевых (аденокарциномы Эрлиха), а также иммунных (спленоцитов и макрофагов) клеток проводили путем *in vitro* измерения внутриклеточного содержания АФК, с помощью селективного флуоресцентного индикатора 2',7'-дигидрохлорфлуоресцеин-диацетата (Н2ДХФДА). Н2ДХФДА проявляет селективную чувствительность к H₂O₂ и супероксид-аниону, и, окисляясь в их присутствии внутри клетки, приобретает флуоресцентные свойства (Yao and Jockusch, 2013).

Клетки аденокарциномы Эрлиха были получены из асцитной жидкости мышей носителей опухоли, а спленоциты из селезёнки здоровых белых мышей линии CD-1. Полученные первичные культуры клеток вносили в черные, плоскодонные 96-луночные планшеты (Greiner, USA) в объёме 0,2 мл полной питательной среде 199 на лунку. Плотность клеточной культуры спленоцитов составляла 1×10^4 , а аденокарциномы Эрлиха 2×10^4 клеток на лунку. Rh2 добавляли к культивируемым клеткам в концентрациях 1 и 10 мкг/мл как самостоятельно, так и в сочетании с ДР, который использовали в концентрации 10 мкг/мл поскольку было показано, что именно в данной дозе этот противоопухолевый антибиотик обладает сильной прооксидантной активностью в условиях *in vitro*. Инкубацию клеточных культур проводили в термостате в течение 3 час при 37°C.

По окончании инкубации в каждую лунку вносили раствор Н2ДХФДА, растворенного в ДМСО. Конечная концентрация флуоресцентного красителя в инкубационной среде составляла 10 мкМ. Нагрузку клеточных культур красителем проводили при постоянном встряхивании в закрытом термощейкере (ST-3L, ELM1) в течении 30 мин при 37°C. Измерение флуоресцентной активности проб проводили на планшетном ридере Fluoroscanner Ascent FL (Labsystems, USA) при экстинкции 485 и эмиссии 538 нм.

2.2.10 Оценка влияния Rh2 на активность Nrf2 и HIF-1 α в люциферазном репортерном анализе *in vitro*

Клеточные репортеры на основе экспрессии слитых белков люциферазы с доменами транскрипционных факторов представляют собой флуоресцентные индикаторы, позволяющие напрямую следить за судьбой транскрипционного фактора (или его домена), меченого люциферазой, в реальном времени. Для оценки некоторых молекулярных аспектов механизма действия Rh2 были использованы новые химерные репортерные модели транскрипционных факторов Nrf2 и HIF-1 α . Метод основан на создании генных репортерных конструкций, в качестве которых использовались ген люциферазы слитый с генами отдельных регуляторных доменов Nrf2 или HIF-1 α , ответственных за деградацию и ингибирование активности данных факторов транскрипции.

Используя ген люциферазы слитый с доменом Neh2 - фрагментом гена Nrf2, получили химерную конструкцию Neh2-luc. Neh2 один из шести доменов Nrf2, отвечающий за связывание с белком репрессором Keap1. Keap1, посредством связывания с Neh2,

выполняет функцию моста между Nrf2 и ферментативным комплексом Cul3-Rbx1 E3, называемым убиквитин-лигазой. Эта лигаза обеспечивает убиквитинирование Nrf2 с его последующей деградацией 26S протеосомами, где Cul3-E3 это Cullin-3 – участок, содержащий убиквитин-лигазный комплекс, а Rbx1 (RING-box protein 1) – стабилизирующий белок, который совместно с Cul3-E3-лигазой образует каталитический компонент ферментативного комплекса, взаимодействующий с E3-убиквитинлигазой для переноса убиквитина на Nrf2. Таким образом создаётся конструкция Neh2luc-Keap1-Cul3, которая приводит к полной деградации Neh2-luc. При действии активаторов Nrf2, происходит освобождение Neh2-luc от супрессорного комплекса, что в дальнейшем приводит к повышению люциферазной активности, по которой можно определить степень влияния того или иного вещества на активацию Nrf2 (Gazaryan and Thomas, 2016).

Для фактора транскрипции Hif1- α также использовали ген люциферазы слитый с доменом, кислородзависимой области (ODD), получив в результате химерную конструкцию ODD-luc. ODD одна из 2-х субъединиц Hif1- α , которая в физиологических условиях в присутствии молекулярного кислорода быстро деградирует в процессе убиквитинирования. Это происходит после присоединения кислорода к аспарагиновому остатку вблизи С-терминальной области HIF-1 и гидроксирования двух её пролиновых остатков, с образованием комплекса между ODD и опухолевым супрессорным протеином фон Хиппеля-Линдау (von Hippel-Lindau — VHL). Отсюда люцифераза полностью теряет свою активность. Гидроксирование этого домена HIF-1 α катализируется α -кетоглутарат-зависимыми диоксигеназами, которые называют пролилгидроксилазами (PHD). Поэтому использование ингибиторов данного фермента, предотвращает деградацию химерной конструкции ODD-luc, что приводит к повышению люциферазной активности (Smirnova et al., 2010).

В работе была использована клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y, стабильно экспрессирующая HIF1-ODD-luc или Neh2-luc конструкции. Клетки вносили в 96-луночные белые плоскодонные планшеты по 7×10^3 клеток на лунку в объёме 30 мкл среды DMEM/F12, содержащей Глутамакс (Glutamax) (Thermo Fisher Scientific) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, пенициллина и стрептомицина в равных количествах. Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение ночи. После инкубирования к клеточной культуре добавляли Rh2 в следующих диапазонах концентраций от 3 до 50 мкМ для Neh2-luc, и от 10 до 30 мкМ для ODD-luc и инкубировали в течение 3 час. При проведении процедуры тестирования с использованием химерной конструкции HIF1-ODD-luc в качестве вещества сравнения использовали синтетический

фунгицидный препарат циклопирокс - эффективный ингибитор PHD, который добавляли в тех же концентрациях, что и Rh2. При проведении тестирования с использованием химерной конструкции Neh2-luc в качестве контроля использовали активатор Nrf2 вторичный метаболит дигидрогваяретовую кислоту, содержащийся в растительных камедях и смолах и обладающей антиоксидантной активностью. Спустя 3-и часа была измерена люцеферазная активность, с помощью коммерческого набора SteadyGlo™ (Promega), содержащей субстрат для люциферазы – пигмент люциферин. После добавления аналитического реагента в планшетном ридере регистрировали относительную люминесценцию проб, по интенсивности которой оценивали эффективность действия Rh2 на активацию Nrf2 и HIF-1 α .

2.2.11 Сравнительная оценка антипролиферативной активности мостотрина и триптантрина в отношении опухолевых клеток *in vitro*

Было проведено исследование антипролиферативной активности в МТТ-тесте в отношении следующих линий опухолевых клеток: HCT-116 (аденокарцинома толстой кишки), K-562 (промиелоцитарный лейкоз), MCF-7 (инвазивная карцинома протоков молочной железы) MDA-MB-231 (клетки рака молочной железы). Все линии клеток дикого типа были приобретены в ATCC (США). В качестве контрольного препарата был использован ДР (Sigma, USA). Анализ проводился по стандартной методике, согласно (A.S. Tikhomirov, 2018).

Культивирование и инкубацию клеток проводили в модифицированной по Дальбекко среде Игла (ПанЭко, Россия) и среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 5-10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Logan, UT), 2 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C, 5% CO₂, в увлажненной атмосфере.

Для анализа культуры клеток, находящихся в логарифмической фазе роста, рассеивали в лунки 96-луночного планшета (NUNC, США) по 5×10^3 клеток на лунку в 190 мкл культуральной среды и инкубировали 24. Затем вносили по 10 мкл раствора исследуемых веществ в диапазоне конечных концентраций от 0,1 до 50 мкМ с двукратным разведением, в контрольные лунки вносили 0,1% ДМСО и ставили на инкубацию на 72 ч (каждую концентрацию изучали с трех повторностями). По окончании инкубации в лунки вносили по 10 мкл водного раствора 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия

бромид (МТТ, ПанЭко, Россия) в конечной концентрации 5 мг/мл. После окрашивания удаляли культуральную среду, клетки ресуспендировали в 100 мкл ДМСО и измеряли оптическую плотность растворов на микропланшетном фотометре ELx808™ (BioTeck, USA) (BioTek, США) при длине волны 570 нм.

Количество живых клеток в каждой пробе (N, в %) рассчитывали в процентах от контроля по формуле:

$$N = (IЭ/IK) \times 100 \%,$$

где IЭ – оптическая плотность в каждой экспериментальной лунке; IK – оптическая плотность в контрольных лунках (не обработанные препаратами пробы, значения которых приняты за 100%).

Антипролиферативный потенциал соединений определяли по IC₅₀ - концентрация полумаксимального ингибирования, которую рассчитывали на основе полученных значений N.

2.2.12 Статистическая обработка данных

Статистическую и графическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием статистического пакета Microsoft Excel 2019. Достоверность статистических различий определяли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента для зависимых и независимых выборок. За достоверные принимали различия при $P \leq 0,05$.

3 Результаты и обсуждения

3.1 Дерматопротекторное и противовоспалительное действие триптантрина

Согласно многочисленным литературным и экспериментальным данным хиназолиновый алкалоид триптантрин (ТР) обладает ярко выраженной противовоспалительной, ранозаживляющей и антимикробной активностью. Очевидно, что с этими видами биологической активности связана его способность оказывать протективное действие при различных дерматологических заболеваниях, в частности при аллергических поражениях кожи. С целью определения уровня дерматопротекторной активности мазевого препарата «Коурохитин», активным началом которого является ТР, и оптимизации способа его применения в лечении кожных патологий, была проведена серия экспериментов на моделях аллергического контактного дерматита (АКД), а также термических и лоскутных ран. В ходе этих экспериментов было установлено, что при использовании мази «Коурохитин», содержащей 1,0% и 0,1% действующего вещества – ТР в курсе лечения от 7 до 9 дней у экспериментальных животных не было выявлено тенденции к улучшению клинических проявлений аллергии или эффективному ранозаживлению. Наиболее выраженный терапевтический эффект оказывала мазь, содержащая 0,01% ТР при курсе лечения в течении 4–5 дней. В данном режиме и проводились все дальнейшие исследования. Кроме этого, был проведён отдельный анализ противовоспалительной, цитокин-ингибирующей активности ТР на модели системного воспаления (СВ) как активного начала этого препарата.

3.1.1 Противоаллергическая активность мазевого препарата «Коурохитин»

Аллергические дерматозы – распространённые воспалительные заболевания кожи, имеющие многофакторную этиологию и сложный патогенез. Наиболее известными заболеваниями являются псориаз, контактный дерматит, экзема, хроническая крапивница и другие. Патогенез включает в себя прежде всего повреждение эпидермального барьера, в следствии избыточной воспалительной реакции со стороны иммунной системы, в ответ на действие различных раздражителей (механическое повреждение кожи, контакт с химическими, пищевыми, бытовыми и другими аллергенами). Клинически это проявляется в виде зуда, шелушения, гиперимии (покраснения), лихенизации (уплотнения и утолщения

участка воспалённых тканей), геморрагии (кровоточивость при нарушении целостности и проницаемости стенок сосудов), часто с образованием некротических участков (Fonacier et al., 2010).

Широко используемые в настоящее время противоаллергические препараты (глюкокортикоиды, антигистаминные препараты, стабилизаторы тучных клеток и иммуносупрессоры) оказывают сильный противоаллергический эффект. Однако в связи с узким диапазоном фармакологического действия, не один из этих препаратов не является универсальным для лечения всех видов кожной аллергии, и зачастую они требуют длительного использования, которое может привести к ряду побочных эффектов: угнетение ЦНС, нарушение углеводного и липидно обмена, миастения, остеопороз, снижение сопротивляемости к инфекциям и других (Klimek and Sperl, 2013).

В связи с этим, необходима разработка универсальных эффективных препаратов, которые наряду с противоаллергической активностью, способны также ингибировать воспалительные реакции и стимулировать репаративные процессы в эпидермисе. Таким требованиям отвечает алкалоид ТР, который проявляет себя как дерматопротекторный агент полифункционального действия, то есть обладает противовоспалительной, ранозаживляющей и антибактериальной активностью.

При экспериментальном моделировании АКД было показано, что ТР в составе мази «Коурохитин» оказывал выраженный противоаллергический и противовоспалительный эффект. Терапевтический эффект мази «Коурохитин» проявлялся в заметном улучшении клинических и иммунологических показателей АКД: достоверное уменьшение эритемы (рисунок 6) и коррекция цитокинового профиля (рисунок 7).

Как видно из рисунка 6, лечение экспериментальных животных мазью «Коурохитин» в течении 4 дней приводил к практически полному восстановлению исходных параметров кожного покрова: в период с момента начала лечения до терминции эксперимента эритема уменьшалась приблизительно в 7 раз. При этом применение коммерческой мази «Фуцидин» способствовало двукратному снижению эритемы, что не отличалось от группы К(-). Следовательно, четырёхдневного курса лечения мазью «Фуцидин» не достаточно для достижения необходимого лечебного эффекта.

Для оценки влияния препаратов «Коурохитин» и «Фуцидин» на течение воспалительного процесса при АКД, было измерено содержание провоспалительных цитокинов, а именно: ИЛ-1, 2, 6, ГМ-КСФ, ФНО- α и ИНФ- γ , а также противовоспалительных цитокинов – ИЛ-4 и 10. Поскольку известно, что изменения уровня продукции указанных цитокинов рассматривается в качестве важного патогенетического

механизма аллергических заболеваний, в частности кожных. Указанные цитокины активно участвуют в аллергических реакциях, резко усиливая иммунный ответ, обеспечивая хемотаксис иммунных клеток в очаг поражения, их активацию и увеличение цитотоксической активности и запускающих каскад основных звеньев патогенеза АКД. Иммунологический анализ крови, полученной спустя 24 часа после последней аппликации мазей, показал, что при АКД «Коурохитин» оказывал выраженное цитокин-ингибирующее действие в отношении всех исследуемых цитокинов, уровень которых повышался в группе K(-).

Зарегистрированное действие препарата «Коурохитин» на цитокиновый профиль можно объяснить тем, что его основной действующий компонент ТР оказывает прямой иммуносупрессорный эффект за счёт влияния на функциональную активность различных рецепторов и сигнальных путей, принимающих активное участие в стимуляции синтеза провоспалительных цитокинов, как на ранней, так и на прогрессирующей стадии воспалительного процесса.

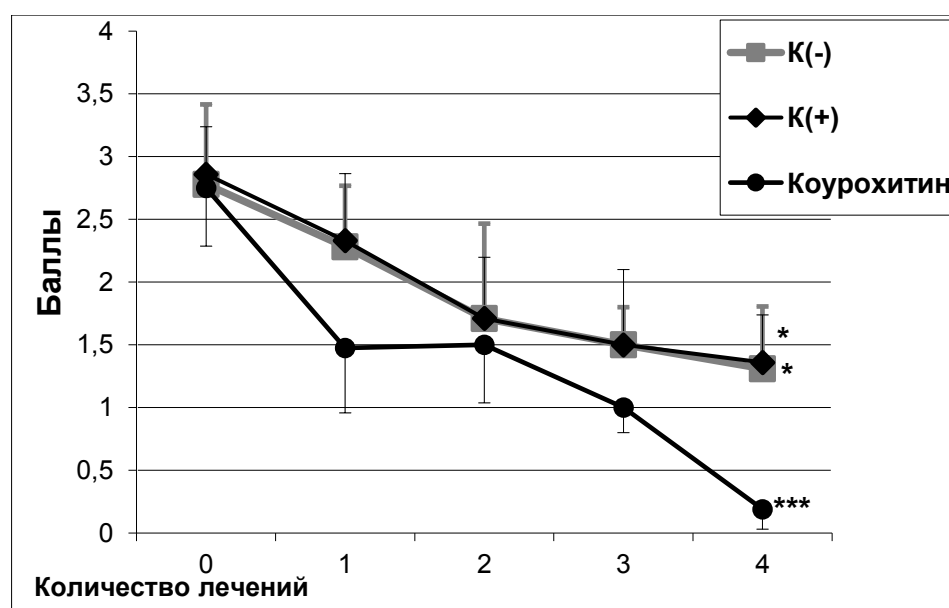


Рисунок 6. Показатели выраженности эритемы в баллах от 0 до 4 (ось ординат), вызванной ДНФБ, в разных группах животных: K(-) – отрицательный контроль (без лечения); K(+)) – положительный контроль «Фуцидин»; «Коурохитин» – мазь, содержащая 0,01% ТР, после каждого дня лечения (ось абсцисс). Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 8$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{***}$ (парный тест Стьюдента).

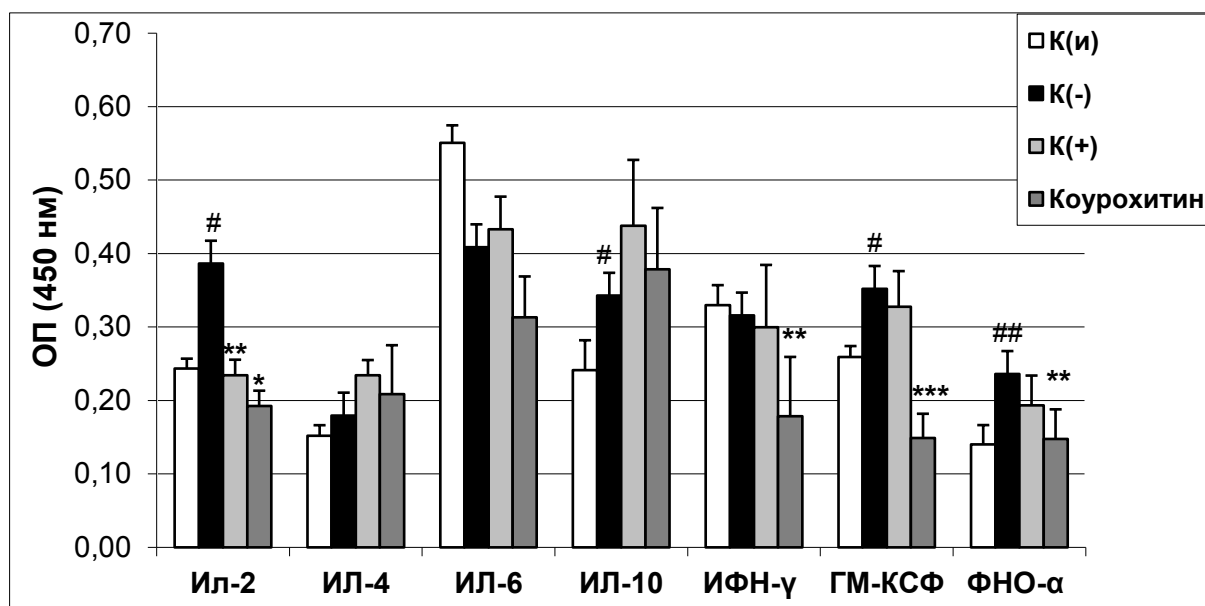


Рисунок 7. Содержание цитокинов при экспериментальном моделировании АКД, вызванном ДНФБ. Ось ординат – оптическая плотность (ОП), отражающая уровень цитокинов в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп: К(и) – интактный контроль; К(-) – отрицательный контроль (без лечения); К(+)) – положительный контроль «Фуцидин»; «Коурохитин» – мазь, содержащая 0,01% ТР. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 8$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{##}$, группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

Таким образом, при АКД, исследуемая мазь «Коурохитин», содержащая 0,01% ТР, в выбранном режиме применения оказывает выраженный терапевтический эффект, улучшая клинические проявления аллергической реакции и снижая уровень воспалительной ответа, через цитокинингибирующее действие.

3.1.2 Оценка ранозаживляющего действия препарата «Коурохитин» в отношении термических и лоскутных ран

Экспериментальные данные, полученные при моделировании раневого процесса, свидетельствуют о высокой ранозаживляющей активности мазевого препарата «Коурохитин».

Показано, что применение мази «Коурохитин» в течении 5 дней ускоряло процесс заживления, как термических, так и лоскутных ран (таблица 1). Кроме того, спустя сутки после последней аппликации мази «Коурохитин» у животных данной группы наблюдалось уменьшение выраженности воспалительного отёка и гиперемии в повреждённом участке кожи, что говорит о более быстром переходе из воспалительной фазы раневого процесса в фазы регенерации и эпителизации. Терапевтический эффект препарата наблюдался в течение всего эксперимента и достигал максимальной 100%-ной величины на 12 день после индукции раневого процесса. При этом мазь «Коурохитин» проявляла большую эффективность, чем коммерческие ранозаживляющие и противовоспалительные мазевые препараты сравнения «Фуцидин» и «Метилурацил».

Таблица 1. Сравнительная оценка действия препарата «Коурохитин» и коммерческих препаратов наружного применения на процесс заживления ожоговых и лоскутных ран

Группа	Термические раны		Лоскутные раны	
	7 день	12 день	7 день	12 день
	Заживление, %	Заживление, %	Заживление, %	Заживление, %
К(-) (без лечения)	61,2 ± 5,6	91,5 ± 4,2	66,8 ± 5,6	92,3 ± 3,7
«Фуцидин»	78,2 ± 6,2	93 ± 5,0	77,5 ± 7,2	98,5 ± 4,2
«Метилурацил»	71,6 ± 6,4	97,0 ± 4,6	78,6 ± 7,3	94,8 ± 4,0
«Коурохитин»	79,2 ± 6,7	100,0 ± 0*	80,3 ± 4,5**	100 ± 0*

Примечание. Результаты представлены как среднее ± SD (при n = 9), P ≤ 0,05*, P ≤ 0,01** в сравнении с группой К(-) (тест Стьюдента).

Следует отметить, что ранозаживляющая активность препарата «Коурохитин», обусловлена не только противовоспалительными свойствами активного начала этого препарата – ТР, но также и наличием хитозана. Хитозан помимо увеличения биодоступности ТР, обеспечивает ещё и окклюзию повреждённой поверхности эпидермиса, что способствует более пролонгированному действию ТР, а также ускоряет биосинтез коллагена, необходимого для репарации повреждённых участков.

3.1.3 Оценка противовоспалительной активности триптантрина на модели системного воспаления

При моделировании СВ, было показано, что в ответ на введение животным ЛПС (группа K(-)) наблюдалось резкое повышение сывороточного содержания анализируемых провоспалительных цитокинов: ИФН- γ , ИЛ-6 и ФНО- α (рисунок 8).

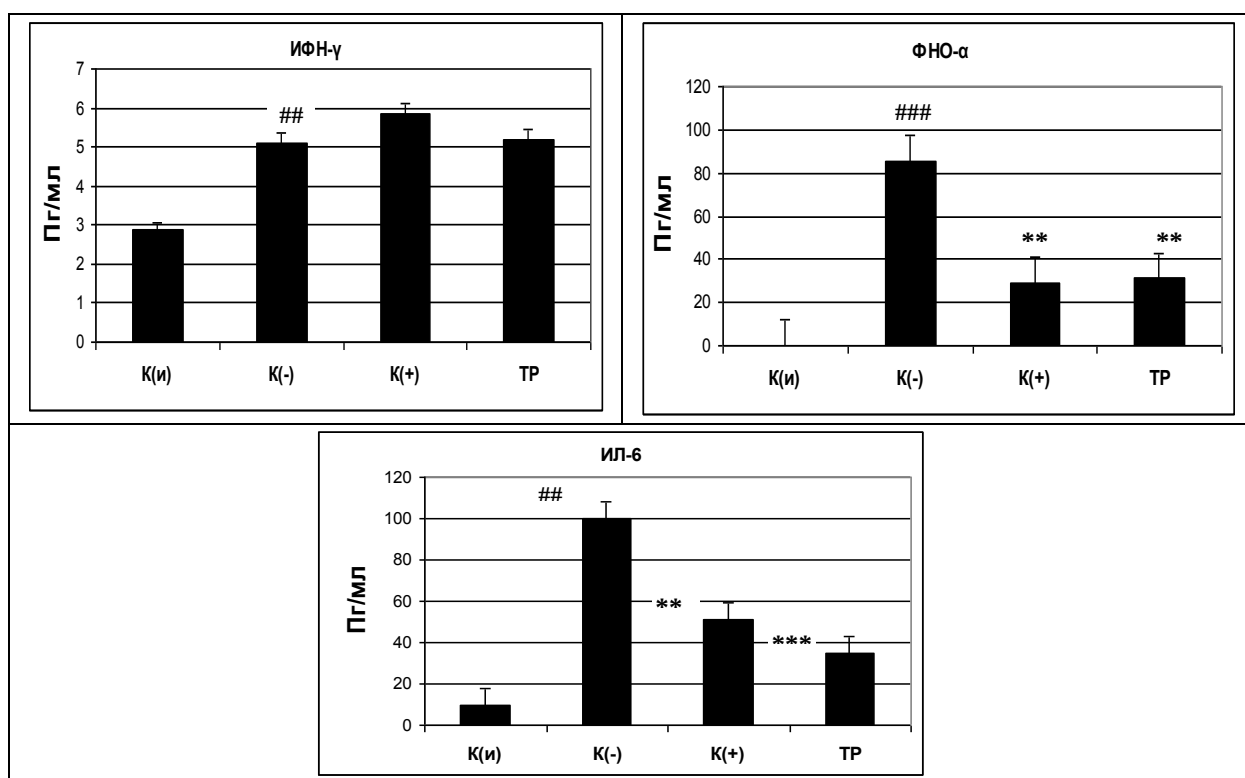


Рисунок 8. Уровень провоспалительных цитокинов, после введения ЛПС (ось ординат в пг/мл) в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп: K(i) – интактный контроль, K(-) – отрицательный контроль (без лечения), K(+), – положительный контроль «Офтан-Дексаметазон» 1 мг/кг, TP – триптантрин 1мг/кг. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 6$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой K(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#\#}$, группа K(-) в сравнении с группой K(i) (тест Стьюдента).

Оценка влияния TP на цитокиновый статус показала, что TP заметно ингибировал, стимулируемый ЛПС, избыточный синтез указанных цитокинов. При этом TP оказывал слабое влияние на содержание ИФН- γ , но более чем в 3 раза, по сравнению с группой K(-), снижал уровни ИЛ-6, ФНО- α – главных цитокинов, ответственных за развитие острой фазы воспалительной реакции.

ФНО- α и ИЛ-6 вместе с ИЛ-1 выступают как инициаторы воспалительного ответа, усиливая активность фагоцитарных, цитотоксических, эндотелиальных, кроветворных и других клеток, которые запускают каскад основных звеньев патогенеза. Что не менее важно, эти цитокины стимулируют продукцию цитокинов второй линии реагирования Т-хелперами 1 типа, переводящих воспалительную реакцию на системный уровень. Следовательно, за счёт способность снижать выработку цитокинов первой линии реагирования ФНО- α и ИЛ-6 ТР подавляет воспалительный ответ на стадии инициации. Необходимо отметить, что ЛПС является лигандом к TLR4, что и является причиной повышения уровня тестируемых цитокинов. ТР известный антагонист TLR4, с чем может быть связано его ингибирующее действие на синтез ФНО- α и ИЛ-6.

По содержанию общего билирубина и МДА в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп оценивали общее состояние и антиоксидантный статус организма животных при воспалении (рисунок 9). Показано, что в группе К(-) содержание билирубина (уровень которого в плазме крови, как известно, увеличивается вследствие разрушения гепатоцитов и эритроцитов) увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с группой К(и). Кроме того, в группе К(-) значительно возрастал уровень МДА, что говорит об окислительном стрессе, которым сопровождается воспалительный ответ. Применение ТР приводило в норму данные показатели (соответствовало группе К(и)). Следовательно, ингибируя воспалительную реакцию, ТР защищает ткани организма от повреждений, вызванным чрезмерным ответом иммунной системы на ЛПС.

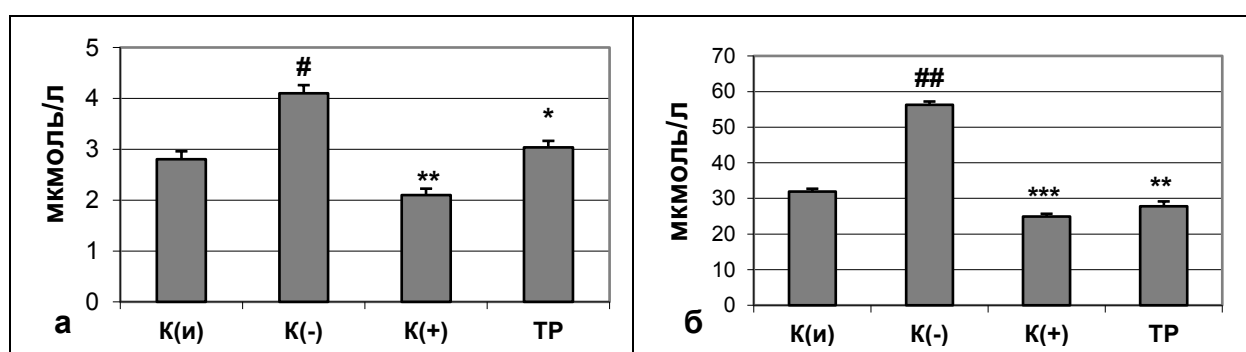


Рисунок 9. Уровни МДА (**а**) и общего билирубина (**б**) (ось ординат) в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп: К(и) – интактный контроль, К(-) – отрицательный контроль (без лечения), К(+), – положительный контроль «Офтан-Дексаметазон» 1 мг/кг, ТР – трипантрин 1мг/кг. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 6$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{##}$ группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

Исходя из полученных результатов, можно утверждать, что зарегистрированное противоаллергическое и ранозаживляющее действие мази «Коурохитин» во многом является результатом противовоспалительной, в частности цитокинингибирующей, активности его главного действующего вещества – ТР. Стоит также отметить, что хитозан как носитель ТР, является важным вспомогательным веществом препарата, который не только повышает биодоступность ТР, но также принимает участие в восстановлении эпидермиса, что ускоряет процесс заживления повреждённых участков.

3.2 Определение противоопухолевого потенциала мостотрина

Новое производное ТР – мостотрин (МТ), заявлено как потенциальное лекарственное средство, обладающее противоопухолевым действием. Модификация структуры молекулы ТР и получение МТ привели к следующим изменениям его физико-химических и биомедицинских свойств: повышение растворимости в воде, что облегчает его применение в виде водных растворов для энтерального и парантерального введения; меньшая токсичность; более низкое иммуносупрессорное действие; сдвиг терапевтической активности в сторону противоопухолевого действия. Отмеченные преимущества МТ по сравнению с его предшественником значительно повышают безопасность и эффективность его терапевтического использования, при лечении онкологических заболеваний.

3.2.1 Сравнительное исследование антипролиферативной активности мостотрина и триптантрина в отношении ряда линий опухолевых клеток

В результате оценки антипролиферативного действия МТ показано, что МТ ингибировал рост всех протестированных линий клеток, кроме В16 (таблица 2). Однако, МТ существенно уступал в эффективности доксорубину (ДР), который был использован в качестве положительного контроля.

При этом, антипролиферативная активность МТ, в отношении клеточных линий НСТ-116, К-562 и MCF-7, была от 5 до 40 раз выше, чем у ТР. Исключением являлась только линия MDA-MB-231, на которую ТР оказывал в 2 раза более высокое антипролиферативное действие, чем МТ.

Таблица 2. Антипролиферативная активность ТР и МТ *in vitro* в сравнении с ДР

Вещества	IC ₅₀ , µM				
	НСТ-116	MCF-7	B16	K-562	MDA-MB-231
МТ	5,0 ± 0,4 **	11,0 ± 0,9 **	>50	1,0 ± 0,1 **	46,0 ± 2,7
ТР	>50	>50	48,3 ± 3,9	42,4 ± 3,2	21,2 ± 1,7
ДР	0,11 ± 0,02	0,61 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,10 ± 0,01	0,52 ± 0,05

Примечание. НСТ-116 – клетки аденокарциномы толстой кишки, К-562 – клетки промиелоцитарного лейкоза, MCF-7 – клетки инвазивной карциномы протоков молочной железы, MDA-MB-231 – клетки рака молочной железы. IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования (минимальная концентрация, ингибирующая рост клеток на 50%). Результаты представлены как среднее ± S.E.M, при n=3. P ≤ 0,05*, P ≤ 0,01** МТ в сравнении с ТР (тест Стьюдента).

Таким образом, МТ проявляет большую противоопухолевую активность *in vitro*, чем его прототип ТР. Зарегистрированное антипролиферативное действие МТ в отношении различных линий опухолевых клеток, позволяет рассматривать его в качестве потенциального действующего агента противоопухолевых препаратов для лечения разных видов опухолей.

3.2.2 Определение острой токсичности мостотрина

Острая токсичность МТ была исследована в дозах от 50 до 500 мг/кг при в/б введении. Острое токсическое действие соединения МТ проявлялось в течение первых 15 – 60 мин. после введения и прослеживалось в дозах от 125 до 500 мг/кг. Были отмечены следующие внешние признаки интоксикации: понижение температуры тела, отдышка, потеря аппетита, снижение подвижности и общей физической активности. При введении дозы 500 мг/кг, в течении 30-60 мин. наступала гибель всех животных в группе. В остальных экспериментальных группах смертность не была зарегистрирована, и спустя 24 часа у животных наблюдалось восстановление нормального физического состояния.

При расчёте было выявлено, что для МТ LD₅₀ = 375 мг/кг, что позволяет по классификации токсичности веществ отнести его к классу среднетоксичных (средняя летальная доза которых составляет 200—1500 мг/кг). Следует отметить, что для ТР ранее

установленная величина LD50 составляла около 75 мг/кг. Следовательно, МТ в 5 раз менее токсичен, чем ТР, что повышает безопасность его применения в инъекционных формах.

3.2.3 Эффективность комбинированной терапии доксорубицина с мостотрином при моделировании асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха

Согласно данным, представленным в таблице 3, ДР при монотерапии оказывал выраженное химиотерапевтическое действие, замедляя опухолевый рост. МТ в используемых дозах при самостоятельном применении обладал незначительным противоопухолевым действием, проявляя максимальный терапевтический эффект в дозе 10 мг/кг. Однако совместное использование МТ и ДР значительно повышало эффективность химиотерапии. Об этом свидетельствуют более высокие СПЖ, УПЖ и выживаемость в группах ДР+МТ 5 мг/кг и ДР+МТ 10 мг/кг, по сравнению с группой, прошедшей монотерапию ДР и МТ. При этом в дозе 10 мг/кг МТ оказывал более выраженный потенцирующий эффект к ДР, чем в дозе 5 мг/кг.

Таблица 3. Расчёт СПЖ, УПЖ и выживаемости животных опухоленосителей разных экспериментальных групп

Группа	СПЖ, дни	УПЖ, %	Выживаемость, %
К(-) (без лечения)	17,0 ± 0,17	-	0
ДР (0,25 мг/кг)	57,5 ± 0,2 **	338,0 ± 0,5	67
МТ (5 мг/кг)	25,7 ± 0,47	151,2 ± 1,11	10
МТ (10 мг/кг)	29,1 ± 0,45	171,2 ± 1,06	10
ДР+МТ (0,25 мг/кг + 5 мг/кг)	58,9 ± 0,16 **	346,5 ± 0,4	78
ДР+МТ (0,25 мг/кг + 10 мг/кг)	60,0 ± 0,2 **	352,9 ± 0 #	100

Примечание: СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение средней продолжительности жизни животных; Выживаемость животных – % выживших животных к моменту терминации эксперимента (60 суток после индукции опухоли). Результаты представлены как среднее ± SD (при n =9), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$ в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$ группы ДР+МТ 5-10 мг/кг в сравнении с группой ДР (тест Стьюдента).

Кроме того, сочетанное применение ДР и МТ снижало частоту появления вторичного опухолевого роста. Так к концу эксперимента (60 суток) в группе ДР у 70%-тов выживших животных присутствовали признаки вторичного опухолевого роста, в то время как в группах ДР+МТ 10 мг/кг и ДР+МТ 5 мг/кг вторичный рост опухоли наблюдался всего у 10%-тов и у 40%-тов животных, соответственно.

Следует отметить, что при анализе противоопухолевой активности ТР в составе средства «Коурохитин» (во время скрининговых исследований), в аналогичном эксперименте, ярко-выраженного терапевтического эффекта выявлено не было.

Таким образом, в результате проведённых биоиспытаний было показано, что МТ отличается от своего прототипа ТР не только большей растворимостью в воде, биодоступностью и меньшей токсичностью, но также более выраженной противоопухолевой активностью. МТ, обладая антипролиферативной активностью в отношении опухолевых клеток *in vitro* и собственной противоопухолевой активностью *in vivo*, значительно повышает терапевтический эффект ДР. Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать МТ в качестве потенциального средства для терапии онкологических заболеваний.

3.3 Оценка перспективы применения гинзенозида Rh2 в терапии онкологических заболеваний

Многократно показано, что гинзенозид Rh2, как один из основных действующих веществ корня женьшеня *P. ginseng*, проявляет противоопухолевою активность, как *in vitro*, так и *in vivo*, в отношении многих видов опухолей. Одновременно с этим Rh2 обладает способностью оказывать положительное влияние на иммунологический статус организма, чем частично опосредовано его антиканцерогенное действие, через усиление противоопухолевого иммунного ответа, а также адаптогенной активностью, оказывая тем самым общеукрепляющее действие на организм. Поэтому Rh2 рассматривается как перспективное средство дополнительной противоопухолевой терапии, позволяющее повысить эффективность и нивелировать некоторые побочные эффекты известных противоопухолевых препаратов, например, таких как доксорубицин (ДР).

ДР – антрациклиновый антибиотик, являющийся одним из самых эффективных и популярных средств противоопухолевой терапии. Однако использование терапевтических доз ДР сопровождается рядом побочных эффектов, среди которых выделяют:

кумулятивную карди-, гепато- и нейроотоксичность, нарушение процесса кроветворения, приводящего к анемии и иммунодепрессии, алоpecia, угнетение репаративных и барьерных функций эпидермиса. В первую очередь это связано с тем, что механизм противоопухолевого действия ДР обуславливает его высокую цитотоксическую активность при довольно низкой избирательности. Цитотоксическое действие ДР распространяется не только на опухолевые, но и на нормальные активно делящиеся клетки организма: гемопоэтические стволовые клетки костного мозга, клетки слизистых оболочек ЖКТ, матрикса волосяных фолликул, базального слоя эпидермиса и т.д. Среди недостатков химиотерапии ДР также выделяют короткий период ремиссии, после которого опухолевый рост возобновляется с усилением злокачественности и приобретением лекарственной резистентности опухолевых клеток (Tasar et al., 2013).

Очень важным в практическом плане является вопрос о возможности сочетания ДР с нетоксичными препаратами, обладающими не только собственной противоопухолевой активностью, но и способностью модулировать различные физиологические системы организма, в частности иммунную. Можно предположить, что такой подход позволит снизить терапевтическую дозу основных химиотерапевтических средств без потери их противоопухолевого эффекта, при этом обеспечив более пролонгированный клинический эффект и сведя к минимуму их токсическое действие на организм.

Предполагается, что комбинированное применение ДР с Rh2 позволит повысить терапевтический индекс ДР, и, следовательно, значительно увеличить эффективность химиотерапии и снизить тяжесть побочных проявлений.

3.3.1 Эффективность комбинированной терапии доксорубицина с Rh2 при моделировании асцитного варианта аденокарциномы Эрлиха

Как показал эксперимент (таблица 4), применение ДР повышало УПЖ и СПЖ животных опухоленосителей приблизительно в 3,5 раза по сравнению с группой К(-). Водно-спиртовой раствор Rh2 увеличивал эти параметры примерно в 3 раза. Характерно то, что в группах животных, прошедших курс монотерапии ДР и Rh2, период ремиссии составлял 30-40 суток, после чего отмечалось возобновление роста опухоли, с чем связан относительно низкий уровень выживаемости экспериментальных животных данных групп.

Совместное применение ДР и Rh2 приводило к взаимному потенцированию их противоопухолевого действия, что выражалось в увеличении продолжительности жизни

экспериментальных животных более чем в 4 раза, по сравнению с группой К(-), и подавлении рецидива опухолевого роста после периода ремиссии. Кроме того, в группе животных, прошедшей курс лечения ДР совместно с Rh2, к концу эксперимента количество выживших животных, не имеющих вторичных опухолевых зачатков и признаков токсического действия ДР, было почти в 2,5 раза больше, чем в группах, прошедших монотерапию ДР или Rh2.

Таблица 4. Расчёт СПЖ, УПЖ и выживаемости животных разных экспериментальных групп

Группа	СПЖ, дни	УПЖ, %	Выживаемость, %
К(-) (без лечения)	$20,7 \pm 1,3$		0
ДР (0,25 мг/кг)	$72,2 \pm 2,9^{**}$	248	37
Rh2 (10 мг/кг)	$65,6 \pm 2,7^{**}$	216	20
Rh2 + ДР (0,25 мг/кг + 10 мг/кг)	$95,0 \pm 1,9^{***, \#}$	359 [#]	80

Примечание: СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение средней продолжительности жизни животных; Выживаемость животных – % выживших животных к моменту терминации эксперимента (100 дней после индукции опухоли). Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 7$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, группа ДР в сравнении с группой ДР+Rh2 (тест Стьюдента).

Необходимо отметить, что терапевтические дозы ДР составляют от 0,5 до 4,5 мг/кг, которые назначается в зависимости от выбранного режима лечения, возраста и физического состояния онкобольного. В данном эксперименте доза ДР была снижена до 0,25 мг/кг. Сочетание низкой дозы ДР с Rh2 оказало выраженное противоопухолевое действие, при видимом отсутствии побочных эффектов. Следовательно, Rh2 в качестве вспомогательного средства, позволит применять ДР в более низких безопасных дозах.

3.3.2 Влияния комбинированной терапии Rh2 с доксорубицином на иммунологический статус организма при опухолевом процессе

Считается, что наиболее опасным из побочных проявлений ДР является его иммунодепрессивный эффект, приводящее к угнетению естественного противоопухолевого иммунного ответа организма. ДР нарушает процесс кроветворения, что связано с его сильным цитотоксическим действием, распространяющимся на все быстроделющиеся клетки организма, в число которых входят и гемопоэтические стволовые клетки, что приводит к снижению уровня форменных элементов крови, в том числе и лейкоцитов, и угнетению активности иммунной системы.

Исходя из этого, в следующей серии экспериментов модель асцитного варианта карциномы Эрлиха была использована для оценки влияния комбинации ДР и Rh2 на иммунологический статус организма при опухолевом процессе. Индикатором иммунологических нарушений служило определение уровня содержания некоторых цитокинов в сыворотке крови животных, носителей опухоли, методом ИФА. Результаты представлены на рисунке 10.

Эксперимент был проведён в 2 этапа. На первом, у части животных каждой группы забор крови для анализа осуществляли спустя 7 суток после инокуляции опухоли. Было зарегистрировано, что в этот период у животных всех экспериментальных групп достоверных сдвигов в показателях сывороточного уровня цитокинов не наблюдалось.

На втором этапе, содержание цитокинов было измерено спустя 60 суток, с момента индукции опухоли, у животных, находящихся в периоде ремиссии опухолевого процесса после терапии препаратами. В этом случае анализ цитокинового профиля показал, что в группах ДР наблюдалось угнетение активности иммунной системы, связанное с иммуносупрессивным действием препарата. В то же время в экспериментальной группе животных ДР+Rh2 было обнаружено увеличение содержания ИФН- γ и ФНО- α - ключевых цитокинов, участвующих в противоопухолевом иммунном ответе, при одновременном снижении главного противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

Полученные результаты указывают на способность Rh2 стимулировать противоопухолевый иммунный ответ и снижать иммунодепрессивные состояния, развивающихся на фоне химиотерапии с ДР.

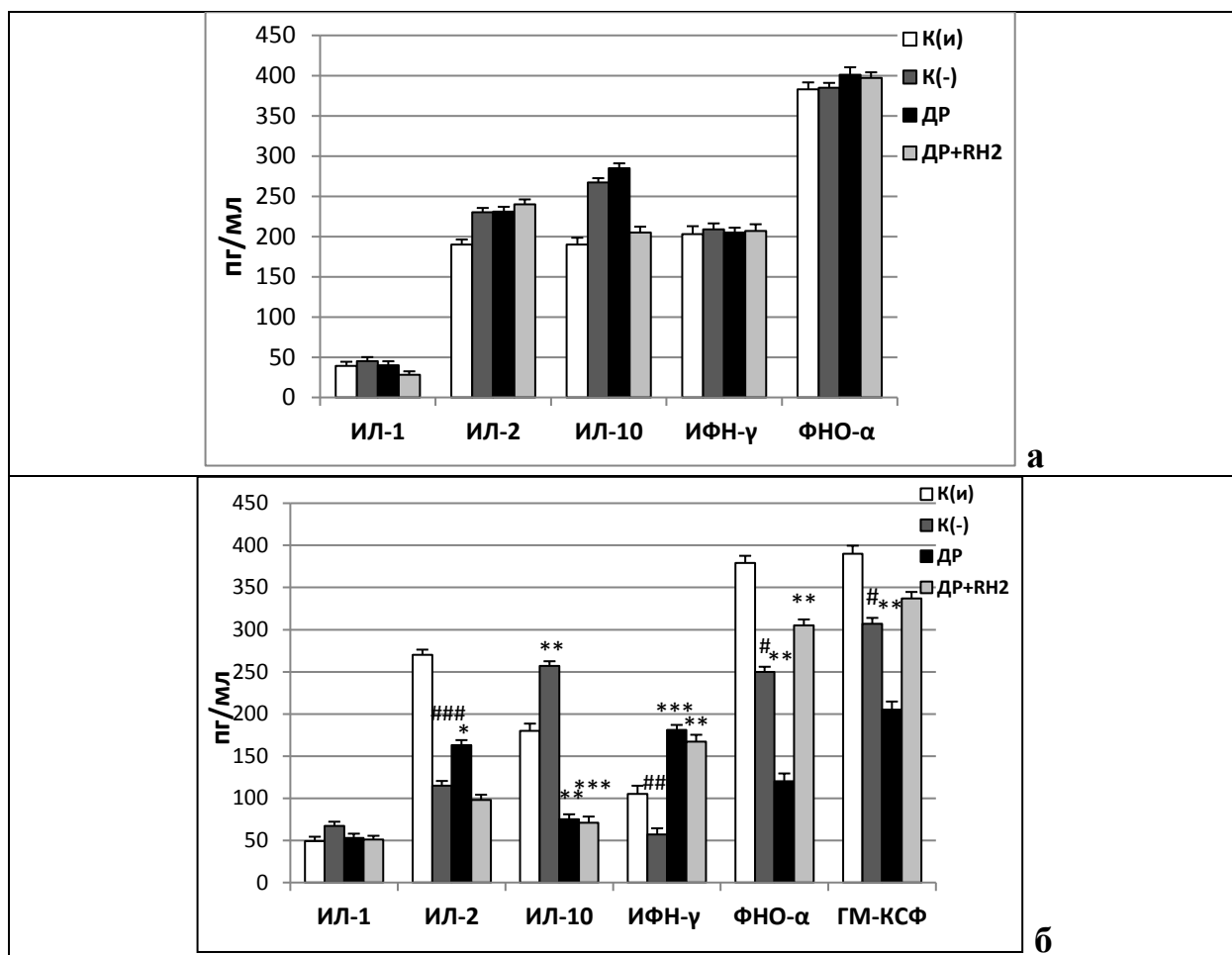


Рисунок 10. Содержание цитокинов (ось ординат, в пг/мл) в сыворотке крови мышей с асцитной карциномой Эрлиха спустя 9 суток (**а**) и 60 суток (**б**), после инокуляции опухоли. Группы животных: К(и) – интактный контроль; К(-) – отрицательный контроль (без лечения); ДР – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг); ДР+Rh2 – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг) + Rh2 (10 мг/кг). Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 6$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, опытные группы в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^\#$, $P \leq 0,01^{\#\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#\#}$ группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

3.3.3 Противоопухолевая активность Rh2 при комбинированной терапии с ДР на модели солидного варианта аденокарциномы Эрлиха

Для оценки влияния сочетанного использования ДР с Rh2 на морфологические параметры опухолевой ткани и динамику опухолевого роста использовали солидный вариант аденокарциномы Эрлиха. Влияние Rh2, ДР и их сочетания на опухолевый процесс исследовали, как на стадии формирования, так и интенсивного роста опухоли.

В первом случае лечение начинали спустя сутки после инокуляции опухолевых клеток. В результате было показано, что животные разных экспериментальных групп имели значительные отличия в скорости формирования опухолевого узла и динамике роста опухоли (рисунок 11 и таблица 5).

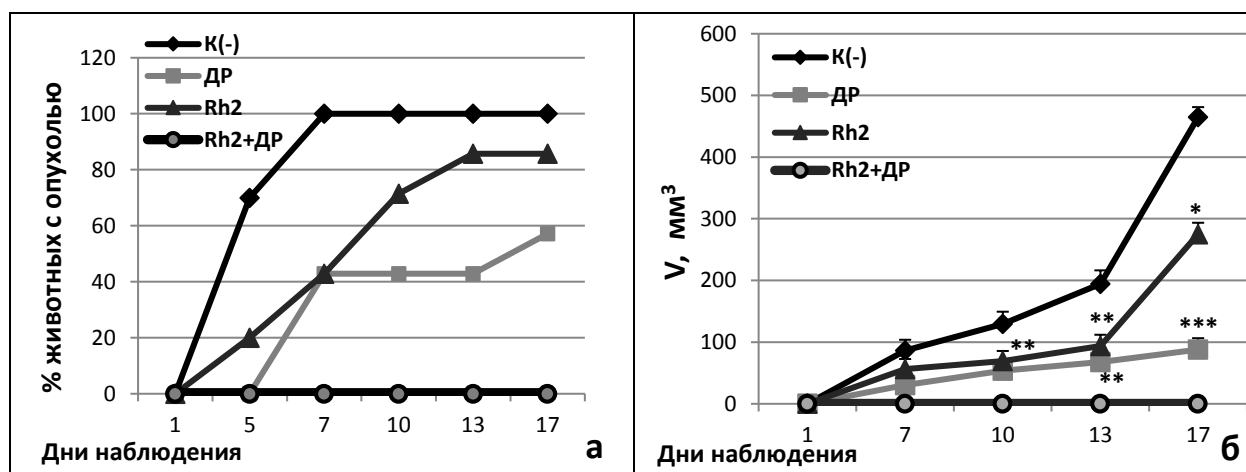


Рисунок 11. Динамика роста солидной опухоли. Ось абсцисс – срок эксперимента в сутках, ось ординат – изменение количества животных с опухолью (**а**) и объёма сформировавшейся опухоли (**б**) у животных разных экспериментальных групп: K(-) – отрицательный контроль (без лечения); ДР – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг); ДР+Rh2 – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг) + Rh2 (10 мг/кг). Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 7$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, опытные группы в сравнении с группой K(-), (тест Стьюдента).

При этом в группе K(-) на 7-е сутки после трансплантации клеток аденокарциномы Эрлиха у 100% животных было зафиксировано образование солидного опухолевого узла, достигавшего среднего объема $86 \pm 0,039 \text{ мм}^3$ и увеличивающийся до $460 \pm 0,039 \text{ мм}^3$ к концу эксперимента. В группе животных, прошедших курс монотерапии ДР и Rh2, на 7-е сутки только у 43-% особей были обнаружены опухолевые узлы размером $36 \pm 0,0032 \text{ мм}^3$ и $56 \pm 0,025 \text{ мм}^3$, соответственно. К терминальной стадии эксперимента эксперимента в группе ДР количество животных с опухолью размером $83 \pm 0,061 \text{ мм}^3$ достигало 57%, а в группе Rh2 86% с объемом опухоли $270 \pm 0,044 \text{ см}^3$. При этом расчёт ТРО показал, что монотерапия как ДР, так и Rh2, приводила к заметному уменьшению опухолевой массы и торможению роста опухоли (таблица 5).

Таблица 5. Противоопухолевое действие Rh2 и ДР

Группа	Вес опухоли, гр.	ТРО, %
К(-) (без лечения)	$0,276 \pm 0,174$	-
ДР (0,25 мг/кг)	$0,035 \pm 0,024$ ***	$89,79 \pm 0,024$
Rh2 (10 мг/кг)	$0,075 \pm 0,029$ **	$76,52 \pm 0,029$
Rh2+ДР» (0,25 + 10 мг/кг)	0	100,0

Примечание: ТРО – торможение роста опухоли у животных разных экспериментальных групп. Вес опухолевой ткани был измерен на 17 день с момента инокуляции опухоли. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 7$), $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, опытные группы в сравнении с группой К(-) (тест Стьюдента).

Комбинированная терапия ДР и Rh2 приводила к ярко-выраженному взаимному потенцированию их противоопухолевого действия, что выражалось в полном подавлении опухолевого роста. В группе ДР+Rh2 не наблюдалось формирования опухолевых образований ни в период наблюдения, ни на терминальной стадии эксперимента, следовательно, в этой группе животных ТРО составляло 100%.

При анализе гематологических параметров (17 день после инокуляции опухоли) не было выявлено достоверных различий между показателями в группах К(и), К(-) и Rh2 (таблица 6). Однако в группе К(-) имела тенденция к более низким показателям гемоглобина, и повышению процентного содержания лимфоцитов (NK, Т и В - лейкоциты) и моноцитов (предшественники макрофагов) относительно групп К(и), что говорит об активации противоопухолевого иммунитета в ответ на индукцию онкологического процесса в организме.

В то же время лейкограмма для группы ДР показала, что применение этого препарата приводило к лейко - и лимфопении, что выражалось в заметном снижении общего количества лейкоцитов, а также процентного содержания лимфоцитов относительно групп К(и) и К(-). Зарегистрированный факт, вероятно, связан с сильным миело – и лимфотоксическим действием ДР.

При этом в группе животных ДР+Rh2 содержание лимфоцитов и лейкоцитов в крови была значительно выше, чем в группе ДР. Кроме того, при анализе процентного соотношения основных видов лейкоцитов, в группе ДР+Rh2 отмечался умеренный сдвиг в сторону лимфоцитов, чье содержание заметно преобладало над нейтрофилами, моноцитами и гранулоцитами. Данный факт свидетельствуют в пользу того, что Rh2 в сочетании с ДР

способен стимулировать лимфоцитарное звено иммунного ответа, являющиеся ключевым в противоопухолевом иммунитете.

Таблица 6. Гематологические показатели животных разных экспериментальных групп

Группа	WBC X 10 ³ кл/мл	NEU, %	LIM, %	MONO, %	EOZ, %	BAZ, %	HGB
К(и)	4,1 ± 0,37	29,1 ± 5,4	54,0 ± 4,31	5,7 ± 1,41	4,2 ± 1,11	2,2 ± 1,52	148,6 ± 2,26
К(-)	4,3 ± 0,7	27,1 ± 7,5	60,3 ± 7,15	7,8 ± 1,53	4,3 ± 0,97	2,1 ± 0,85	131,3 ± 6,24
ДР	2,5 ± 0,6***	33,3 ± 5,3	44,9 ± 4,2**	7,6 ± 1,22	5,8 ± 1,82	3,1 ± 1,28	135,1 ± 5,7
Rh2	3,2 ± 0,31	32,8 ± 3,6	50,9 ± 4,6	9,7 ± 1,59	5,0 ± 1,41	2,7 ± 1,23	144,6 ± 6,8
Rh2+ДР	3,9 ± 0,9 [#]	22,2 ± 5,1	62,8 ± 8,2 ^{##}	6,3 ± 0,92	5,2 ± 3,12	2,5 ± 0,94	143,3 ± 6,7

Примечание: HGB – гемоглобин; WBC – общее количество лейкоцитов; Процентное соотношение основных видов лейкоцитов: LIM – лимфоциты; NEU – нейтрофилы; MONO – моноциты; EOZ – эозинофилы; BAZ – базофилы. К(и) – интактный контроль; К(-) – отрицательный контроль (без лечения); ДР – «Доксорубин-Тева» (0,25 мг/кг); ДР+Rh2 – «Доксорубин-Тева» (0,25 мг/кг) + Rh2 (10 мг/кг). Результаты представлены как среднее ± SD (при n = 7), P ≤ 0,05*, P ≤ 0,01**, P ≤ 0,01***, в сравнении с группой К(-); P ≤ 0,05[#], P ≤ 0,01^{##}, P ≤ 0,01^{###}, в сравнении с группой ДР (тест Стьюдента).

В следующей серии экспериментов, лечение начинали на пятый день после инокуляции опухолевых клеток (при объёме опухолевого узла 58 ± 2,5 мм³). Как видно из рисунка 12, в режиме монотерапии ДР ингибировал рост опухолевого узла, а Rh2 практически не влиял на изменение размера опухоли, относительно группы К(-).

Комбинированная терапия ДР с Rh2 приводила к заметному потенцированию их противоопухолевого действия. Было показано, что применение ДР в сочетании с Rh2 практически в 1,5 снижало скорость опухолевого роста, относительно группы К(-). Следует отметить, что терапевтический эффект сочетанного применения ДР и Rh2 отмечался на протяжении всего периода наблюдения и сохранялся до терминальной стадии эксперимента рисунок 12а,б. Так к моменту терминации эксперимента в группе К(-) средний объём опухоли достигал 633,4 ± 7,5 мм³, в группе ДР 514,1 ± 3,2 мм³ (ТРО = 18%), в группе Rh2 606,6 ± 5,03 мм³ (ТРО = 5%), а в группе ДР+Rh2 446,5 ± 7,4 мм³ (ТРО = 32%).

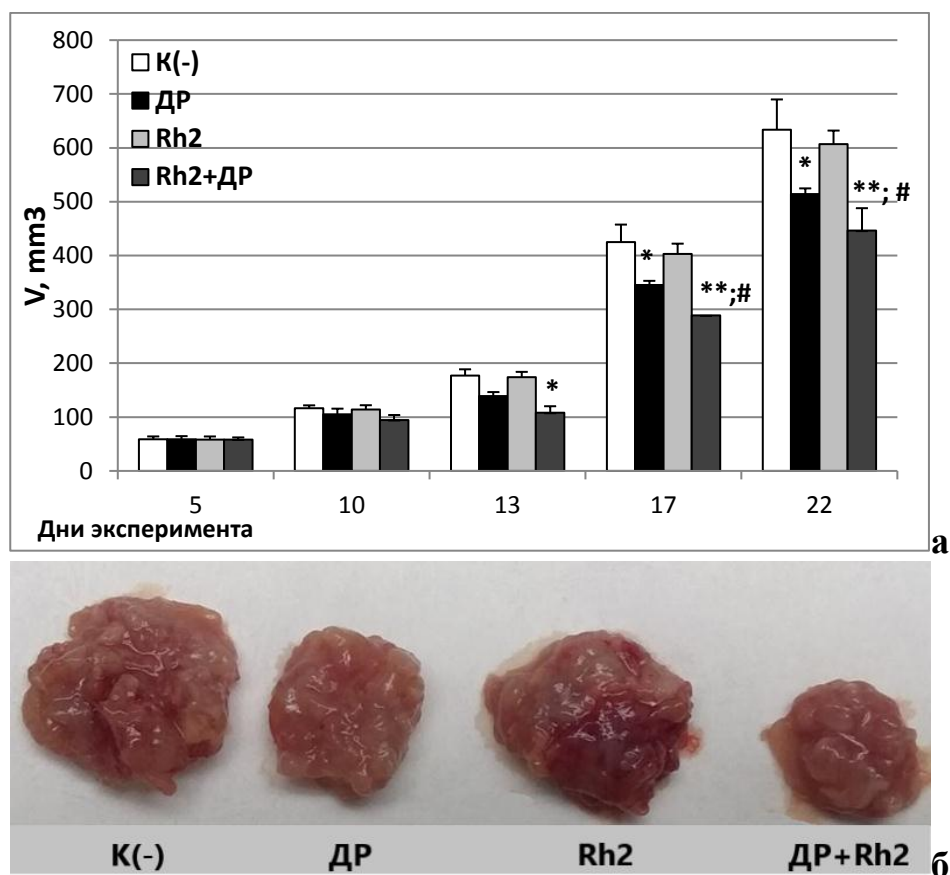


Рисунок 12. Изменение объёма опухоли (**а**) и размер опухоли на 22 день после инокуляции (**б**), у разных групп животных: K(-) – отрицательный контроль (без лечения); ДР – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг); ДР+Rh2 – «Доксорубицин-Тева» (0,25 мг/кг) + Rh2 (10 мг/кг). Результаты представлены, как среднее $\pm$ SD (при $n = 7$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$, в сравнении с группой K(-), $P < 0,05^\#$ в сравнение с группой ДР (тест Стьюдента).

Полученные данные подтверждают наличие у Rh2 способности повышать эффективность противоопухолевой терапии ДР и уменьшать тяжесть побочных эффектов, которыми сопровождается применение ДР, в том числе его иммунодепрессивное действие. Следовательно, гинзенозид Rh2 можно рассматривать в качестве вспомогательного средства, при проведении комбинированной терапии с ДР.

3.3.4 Исследование редокс-свойств Rh2 *in vitro*

В результате экспериментов было показано, что Rh2 проявляет достаточно высокое прооксидантное действие, в отношении как опухолевых, так и иммунных клеток. При этом в клеточной культуре аденокарциномы Эрлиха Rh2 вызывает более резкий редокс-сдвиг,

чем в спленоцитах (рисунок 13). Так, в концентрации 10 мкг/мл Rh2 повышал уровень АФК приблизительно в 2,5 раза в опухолевых и в 1,5 раза в иммунных клетках, по сравнению с контрольными пробами. В концентрации 1 мкг/мл Rh2 увеличивал уровень АФК в клетках Эрлиха в 2 раза, а в спленоцитах менее чем в 1,5 раза. Следует также отметить, что Rh2 превосходил по прооксидантной активности ДР, который способствовал росту АФК только в опухолевых клетках и не оказывал влияния на редокс статус спленоцитов.

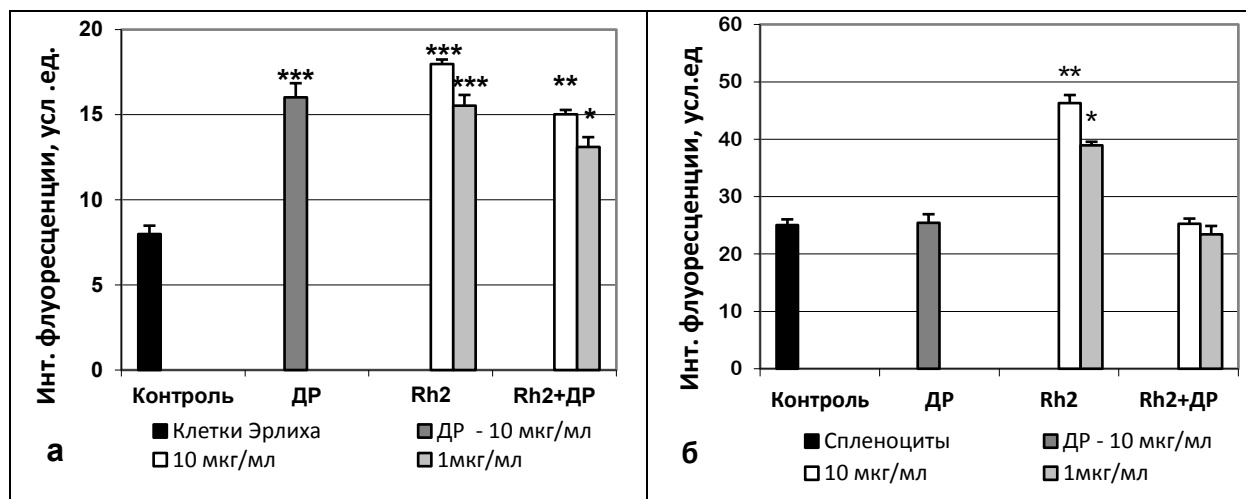


Рисунок 13. Оценка влияния Rh2 на уровень АФК, отдельно и в сочетании с ДР в первичных культурах опухолевых клетках аденокарциномы Эрлиха (а) и спленоцитов (б) по уровню флуоресценции Н2ДХФДА при 485/538 нм (ось ординат) после 3 час. инкубации. Rh2 использовали в концентрациях 1 и 10 мкг/мл. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 3$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,001^{***}$, в сравнении с контролем (H_2O) (тест Стьюдента).

Таким образом, при действии, как на опухолевые, так и иммунокомпетентные клетки, Rh2 проявляет себя как прооксидантный агент. Полученные результаты относительно редокс-активности Rh2 хорошо согласуются с концепцией «мягкого стресса», согласно которой, прооксидантные свойства Rh2 определяются первичным перфорирующим действием на липидный бислой плазматических мембран и увеличением их проницаемости для H_2O_2 , чем опосредованы многие физиологические эффекты этого гинзенозида. Это свойство, вероятно, играет важную роль в его способности оказывать противоопухолевое и иммуномодулирующее действие.

Можно предполагать, что отмеченные различия в действии Rh2 на опухолевые и нормальные клетки во многом объясняют наблюдаемый потенцирующий эффект Rh2 к ДР

при моделировании опухолевого процесса *in vivo*. Более выраженное действие Rh2 на мембраны опухолевых клеток способствует избыточному поступлению экзогенной H_2O_2 , что ведёт к повышению внутриклеточного содержания АФК и АФА до летальных концентраций. Следствием этого является прямое окислительное повреждение клеток, а также запуск различных путей апоптоза и аутофагии.

Одновременно с этим, умеренное мембранотропное и, связанное с ним, прооксидантное действие Rh2 в отношении нормальных, в частности иммунных, клеток позволяет этому гинзенозиду стимулировать иммунный ответ, включая противоопухолевый, а также содействовать включению внутриклеточных адаптивных программ, обеспечивая повышение устойчивости клеток к неблагоприятным условиям, в том числе к побочным эффектам, вызванными химиотерапией.

3.3.5 Оценка влияния Rh2 на активность Nrf2 и HIF-1 α

За счёт первичной мембранотропной и прооксидантной активности, Rh2 способен оказывать влияние на ряд молекулярных мишеней, в число которых входят сигнальные пути, например, Nrf2 и HIF-1 α , ответственные за включение клеточных адаптационно-приспособительных программ, что повышает устойчивость клетки к различным неблагоприятным условиям.

Люциферазную активность трансфекционных репортерных конструкций Neh2-luc и HIF ODD-luc (рисунок 14), которые соответствовали факторам транскрипции Nrf2 и HIF-1 α , регистрировали в клетках нейробластомы SH-SY5Y. По интенсивности люминесценции оценивали эффективность действия Rh2 на уровень активности Neh2-luc и HIF ODD-luc.

Как видно из рисунка 14а, Rh2 не оказывал достоверного влияния на активность конструкции HIF ODD-luc. Однако в тест-пробах Neh2-luc, обработанных Rh2, было зарегистрировано незначительное дозозависимое усиление люциферазной активности, рисунок 14б. Интересно, что при использовании Rh2 в дозе 25 мкМ фиксировался максимум люминесценции, а в дозе 50 мкМ наблюдалось заметное снижение люциферазной активности.

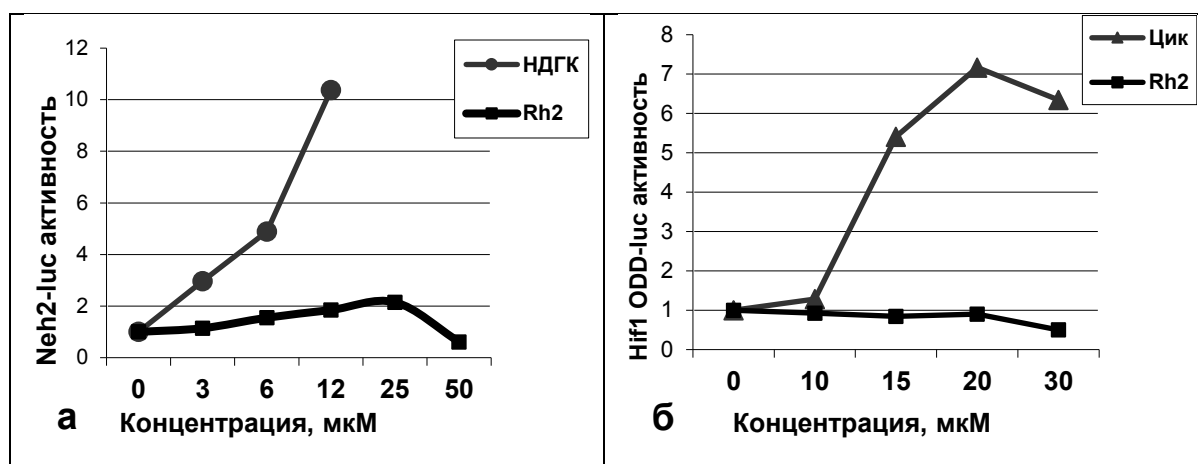


Рисунок 14. Влияние Rh2 на люциферазную активность репортерных HIF ODD-luc (а) и Neh2-luc (б) конструкций. Ось ординат – уровень люминесценции, эквивалентный уровню активности Nrf2 и HIF-1 α . НДГК - нордигидрогваяретовая кислота (максимальная концентрация НДГК была 12 мкМ, так как этой концентрации достаточно, для индукции максимальной люминесценции), Цик – циклопирокс.

Следует подчеркнуть, что по сравнению с эталонным активатором модельного репортера Neh2-luc, в качестве которого использовали нордигидрогваяретовую кислоту (НДГК), действие Rh2 было гораздо менее выраженным. Данный факт, вероятно, связан с принципиально разными молекулярными механизмами активации Neh2-luc у НДГК и Rh2. НДГК является прямым активатором Neh2-luc, которая, как алкилирующий агент, вступает во взаимодействие с цистииновыми группировками белка репрессора – Keap1, с последующим изменением его конформации и потерей связи с Neh2-luc, что переводит данную репортерную конструкцию в активную форму. Есть также сведения, что НДГК способна ингибировать ключевые ферменты убиквитин-лигазного комплекса, тем самым предотвращая деградацию Nrf2, связанного с Keap1 (Smirnova et al., 2011; Manda et al., 2020). Учитывая тот факт, что диссоциация комплекса Keap1/Nrf2 чаще всего имеет стресс-зависимый характер, можно утверждать, что Rh2 способствовал опосредованной активации конструкции Neh2-luc, через индукцию «мягкого стресса» в клетках SH-SY5Y, за счёт своей мембранотропной и прооксидантной активности.

Необходимо отметить, что, по сравнению со многими другими типами опухолевых клеток, клеточная линия SH-SY5Y характеризуется менее выраженным мембранным атипизмом и, как следствие, более низким пролиферативным потенциалом и способностью к дифференцировке в нейрон-подобный фенотип. Одной из причин этих особенностей, вероятно, является довольно высокое содержание мембранного холестерина, свойственное

клеткам опухолей нервных тканей, что поддерживает консервативность строения их плазматических мембран (Kovalevich and Langford, 2013). Учитывая обратно пропорциональную зависимость мембранотропной активности Rh2 от холестерина, можно предположить, что действие этого гинзенозида в отношении данной опухолевой модели было аналогично его влиянию на нормальные клетки.

Можно предположить, что именно по этой причине в концентрациях до 25 мкМ Rh2 не оказывал цитотоксического действия на клетки SH-SY5Y, а, напротив, повышал активность Neh2-luc. Полученные данные позволяют говорить о том, что итогом «мягкого» стрессорного воздействия Rh2 на нормальные клетки организма является стимуляция их активности и запуск адаптивных программ, что повышает их устойчивость к различным неблагоприятным воздействиям.

При этом уровня мембранотропного и прооксидантного действия Rh2 было недостаточно для активации HIF ODD-luc, что, вероятно, объясняется большей чувствительностью Nrf2 к изменению редокс-баланса, чем HIF-1 α . Стимулом для активации HIF-1 α в клетках является хроническая гипоксия (недостаточное снабжение кислородом), а также острая гипогликемия (нехватка глюкозы). Хорошо известно, что в условиях сильной гипоксии и гипогликемии прибывают клетки опухолевой ткани, находящейся на стадии прогрессивного роста, поэтому они многократно увеличивают уровень синтеза и активность HIF-1 α , который непосредственно принимает участие в адаптации опухолевых клеток к таким критическим состояниям. Данный фактор транскрипции стимулирует экспрессию генов, которые ответственны за запуск ангиогенеза и регулирование вазомоторной функции эндотелия, тем самым облегчая циркуляцию крови по сосудам опухолевой ткани и снабжение её питательными веществами и кислородом. Кроме того, продукты HIF-1 α -зависимых генов обеспечивают интенсивный транспорт глюкозы из кровяного русла к опухолевой ткани, а также способствуют переходу с анаэробного пути метаболизма глюкозы на гликолитический, что позволяет опухолевым клеткам синтезировать АТФ в условиях гипоксии (Sallais et al., 2017; Gabriely et al., 2017). Следовательно, отсутствие у Rh2 стимулирующего эффекта в отношении HIF ODD-luc, играет скорее положительную роль.

Таким образом, зарегистрированные в данном исследовании противоопухолевое, иммуномодулирующее и адаптогенное действие Rh2 связано со структурно-функциональными различиями плазматических мембран большинства опухолевых и нормальных клеток, и особенностями мембранотропного действия этого гинзенозида.

3.3.6 Роль мембранотропной и прооксидантной активности в молекулярных механизмах противоопухолевого и иммуномодулирующего действия Rh2

Гинзенозид Rh2 как противоопухолевый, иммуномодулирующий и адаптогенный агент оказывает потенцирующее действие на эффективность известных противоопухолевых препаратов и помогает нивелировать их побочное действие. На основе литературных данных и результатов исследования, представленных в данной работе, можно утверждать, что отмеченные особенности мембранного действия Rh2 являются первичным фактором определяющий молекулярный механизм его фармакологического действия. Поскольку именно воздействием Rh2 на физико-химические свойства плазматической мембраны опосредовано его влияние на редокс-статус клеток и на активность различных ферментов, рецепторов, транспортных и сигнальных белков, участвующих в во многих клеточных процессах, таких как пролиферация, рост, апоптоз, иммунный ответ, адаптация и другие.

Как было сказано выше, отличительной чертой Rh2 является его селективное, прямое цитотоксическое и цитостатическое (запуск различных путей апоптоза и аутофагии, антипролиферативная и антиметастатическая активность) действие в отношении клеток различных видов опухолей. Данный эффект, прежде всего, является результатом сильного перфорирующего действия Rh2 на плазматическую мембрану опухолевых клеток и избыточного поступления экзогенной H_2O_2 в цитоплазму. Учитывая факт того, что опухолевые клетки более чувствительны к изменению окислительного гомеостаза, можно предположить, что механизмы их гибели под действием Rh2 развивается параллельно с ростом уровня внутриклеточных АФК и АФА. При этом H_2O_2 и, образованные в её присутствии, OH^- , $HClO$, NO и $ONOO^-$, оказывают окислительное повреждение клеточных жизненно важных макромолекул, что часто приводит к некрозу или к запуску летальных программ: апоптоза и аутофагии (Lv et al., 2016). Схематично механизм действия Rh2 на опухолевые клетки изображён на рисунке 15

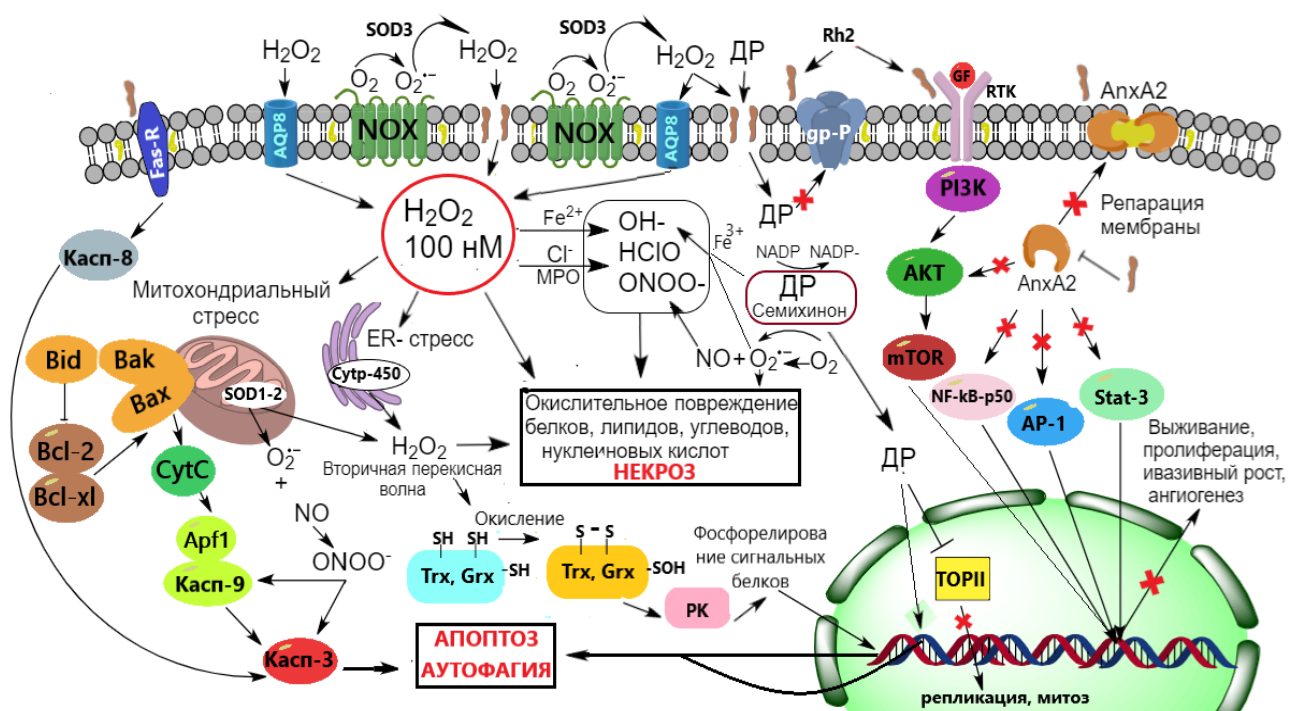


Рисунок 15. Особенности мембранотропного действия Rh2 на опухолевые клетки.

За счёт повышенной экспрессии NOX и формирования под действием Rh2 дополнительных каналов диффузии в плазматической мембране опухолевой клетки происходит нарастание патофизиологического уровня H_2O_2 (>100 нМ), приводящего к митохондриальному и ER-стрессу, и, как следствие, к активации аутофагии и апоптоза. Образованные в присутствии H_2O_2 , $OH\cdot$, $HOCl$, NO и $ONOO\cdot$, вызывают некротическую гибель клеток, $ONOO\cdot$ также принимает участие в активации каспаз содействуя апоптозу. Избыточное количество H_2O_2 окисляет тиоловые группы на редокс сенсорах, таких как тиоредоксин и глутаредоксин (Trx, Grx), и, тем самым, активирует, связанные с ними сигнальные пути, которые запускает апоптоз и аутофагию (например, JNK и др.). ДР оказывает цитотоксический эффект путем индукции окислительного стресса при образовании семихиноновой формы с участием ферментов группы оксидоредуктаз (P-450-редуктаза, NADH-оксидаза, NADPH-цитохром и ксантинооксидаза), а также интеркаляции между ГЦ-парами азотистых оснований цепи ДНК и взаимодействием с ДНК-топоизомеразой II, что приводит к нарушению ее пространственной ДНК и нарушению процесса репликации, предшествующий делению клетки.

В качестве одного из механизмов, содействующих противоопухолевому действию Rh2, рассматривается также стимулирование аутофагии. Процесс аутофагии служит для утилизации повреждённого цитоплазматического содержимого эукариот путём

лизосомальной деградации, что нормализует работу клетки. Однако вызванный Rh2 сильный окислительный стресс, сопровождающийся гипоксией в опухолевых клетках, являются стимулом для усиления аутофагии, при которой деградации подвергаются практически все составляющие цитоплазмы. Оставшийся при этом клеточный дебрис, в дальнейшем утилизируется макрофагами (Ouyang et al., 2012; Qingqing et al., 2020).

Дополнительным механизмом противоопухолевого действия Rh2 является его недавно установленная способность связывать и блокировать работу белка AnxA2, который рассматривается в качестве важной молекулярной мишени для этого гинзенозида (рисунок 15). AnxA2 активно экспрессируется в опухолевых клетках и играет важную роль в их выживаемости и метастазировании (Wang et al., 2020). Прежде всего, AnxA2 является коактиватором перечисленных выше факторов транскрипции. В результате селективного взаимодействия Rh2 с AnxA2 очевидно происходит ингибирование этих сигнальных белков в опухолевых клетках (Grindheim et al., 2017).

Кроме того, AnxA2 – важный компонент системы восстановления плазматических мембран опухолевых клеток и поддержания их редокс-гомеостаза. Известно, что AnxA2 связывается с отрицательно-заряженными фосфолипидами плазматических мембран и мембранных органелл. Тем самым AnxA2 обеспечивает транспорт внутриклеточных везикул и их агрегацию в повреждённом участке плазматической мембраны, с их последующим слиянием и восстановлением мембранной целостности (Lauritzen et al., 2015). AnxA2 также препятствует избыточному образованию АФК, поскольку его молекула имеет реактивный цистеиновый остаток (Cys-8), который легко окисляется двумя молекулами H_2O_2 , а затем восстанавливается тиоредоксиновой системой, с образованием двух молекул H_2O и одной молекулы O_2 (Madureira et al., 2013). Следовательно, Rh2, помимо нарушения целостности плазматических мембран и индукции окислительного стресса в опухолевых клетках, через ингибирование AnxA2 одновременно блокирует репарацию плазматической мембраны и активность тиоредоксиновой редокс-систем, тем самым препятствуя выживанию опухолевых клеток. Следовательно, Rh2 посредством связывания и блокирования работы AnxA2 ингибирует репаративные процессы в опухолевой клетке и снижает активность сигнальных путей, обеспечивающих выживание, рост, пролиферацию, метастазирование и ангиогенез.

Вероятно, образованные Rh2 дополнительные каналы диффузии в липидном бислое мембран опухолевых клеток, могут также содействовать поступлению молекул противоопухолевых агентов внутрь клетки, например, ДР (рисунок 15). Таким образом, увеличивается концентрация противоопухолевых веществ внутри опухолевой клетки и

повышается их цитотоксичность. Одновременно с этим уменьшается и выброс противоопухолевых агентов из клеток во внеклеточное пространство с помощью мембранных переносчиков, ответственных за элиминацию ксенобиотиков, таких как гликопротеин-р – белка играющего центральную роль в развитии МЛУ. При этом считается, что Rh2 сам по себе способствует супрессии активности гликопротеина-р, вероятно посредством взаимодействия с липидными рафтами (Zhang et al., 2012). Следовательно, направленное мембраноперфорирующее и прооксидантное действие Rh2 в отношении именно опухолевых клеток, вероятно, повышает цитотоксический потенциал противоопухолевых агентов, таких как ДР, и препятствует развитию МЛУ.

Как указано выше, противоопухолевый эффект Rh2 также опосредован его иммуномодулирующей активностью. Вероятно, индуцированный Rh2 «мягкий стресс» в иммунокомпетентных клетках способствует стимуляции их функциональной активности (рисунок 16).

В силу меньшей перфорирующей активности Rh2 на плазматические мембраны нормальных клеток, при поступлении экзогенной H_2O_2 , её внутриклеточное содержание не превышает физиологических концентраций. Кроме того, иммунные клетки обладают большей устойчивостью к окислительному стрессу и сами производят большое количество H_2O_2 , OH^- , $HClO$ и NO , используя их в качестве токсических агентов в борьбе с различными патогенами и атипичными клетками собственного организма. Также H_2O_2 в физиологических наномолярных концентрациях от 1 до 10 нМ функционирует в качестве универсальной ко-стимулирующей молекулы, участвуя в работе многих сигнальных путей (рисунок 16). Таким образом, активация НАДФН-оксидаз с последующим умеренным окислительным стрессом приводит в иммунных клетках к экспрессии генов, ответственных за повышение активности основных звеньев гуморального и клеточного иммунного ответа, в частности за усиление цитотоксичности фагоцитарных и киллерных клеток (Sies, 2017). Кроме того, «Мягкий» митохондриальный и ER-стресс, вызванный H_2O_2 , приводит к активации работы дыхательной цепи, окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ в митохондриях, и регуляции белкового фолдинга в ЭПР.

В условиях окислительного стресса так же повышается активность H_2O_2 -зависимого неселективного катионного канала меластатина 2 (TRPM2), широко экспрессированного в различных иммунных клетках (рисунок 16). В результате увеличения внутриклеточной H_2O_2 , через TRPM2 обеспечивается дополнительное поступление Ca^{2+} внутрь клеток. Повышенная концентрация Ca^{2+} внутри клетки, как известно, усиливает иммунный ответ, принимая непосредственное участие в функционировании универсальных кальций

зависимых протеин киназ – кальмодулин-зависимая протеин киназа и протеинкиназа C. Последние, в свою очередь, запускают сигнальные пути, стимулирующие экспрессию различных цитокинов и других модуляторов иммунного ответа (Mortadza et al., 2015).

Специфика влияния Rh2 на функциональные свойства мембраны иммунных клеток, может иметь значение и для процесса иммуногенеза. Например, показано, что Rh2 содействует дифференцировке клеток моноцитарного ряда в макрофаги классического типа M1, и препятствует образованию опухоли-ассоциированного типа M2. В отличие от M1, которые обеспечивают гибель опухолевых клеток, путём гиперпродукции АФК и АФА и активации Т и В – лимфоцитов, M2, созревание которых спровоцирует сама опухолевая ткань, обеспечивает защиту опухолевых клеток от иммунного надзора. При этом M2 блокируют активацию Т-киллеров и повышает активность Т-супрессоров, которые секретируют большое количество противовоспалительных цитокинов, например, ИЛ-10, 4 и 13. Также M2 содействуют злокачественному опухолевому росту, стимулируя клеточную пролиферацию, инвазию и метастазирование, через усиленный синтез трансформирующий фактора роста, MMP, разрушающих внеклеточный матрикс и VEGF, стимулирующих ангиогенез (Li et al., 2018; Karnevi et al., 2014; Goswami et al., 2017).

Предполагается, что молекулярный механизм дифференцировки моноцитов в классический M1 фенотип, под действием Rh2 может быть напрямую связан с его влиянием на поверхностно-клеточные пуриnergические рецепторы. Клетки солидных опухолей, в следствии гипоксии, выделяют большое количество аденозина во внеклеточное пространство. При этом аденозин является лигандом пуриnergических рецепторов, в частности P2X7, экспрессируемого преимущественно в иммунокомпетентных клетках. Активация P2X7 в следствии избыточного накопления аденозина и АТР ингибирует эффективные функций цитотоксических Т-лимфоцитов и NK и способствует образованию M2 фенотипа. Недавно была обнаружена способностью Rh2 к аллостерической регуляции P2X7 (рисунок 16). Тем самым Rh2 препятствуя аденозин-опосредованной иммуносупрессии и предотвращает образование M2 (Savio et al., 2018; Virgilio et al., 2017; Helliwell et al., 2015).

Кроме того, индуцированный Rh2 «мягкий стресс» стимулирует запуск адаптационно приспособительных механизмов в нормальных и иммунокомпетентных клетках, через активацию редок-зависимого Nrf2 (рисунок 16). Активная форма Nrf2, усиливая транскрипцию генов в участках ARE и XRE, обеспечивает адаптацию клеток к окислительному стрессу и токсическому действию различных ксенобиотиков, в том числе химиотерапевтических средств (Ge et al., 2017).

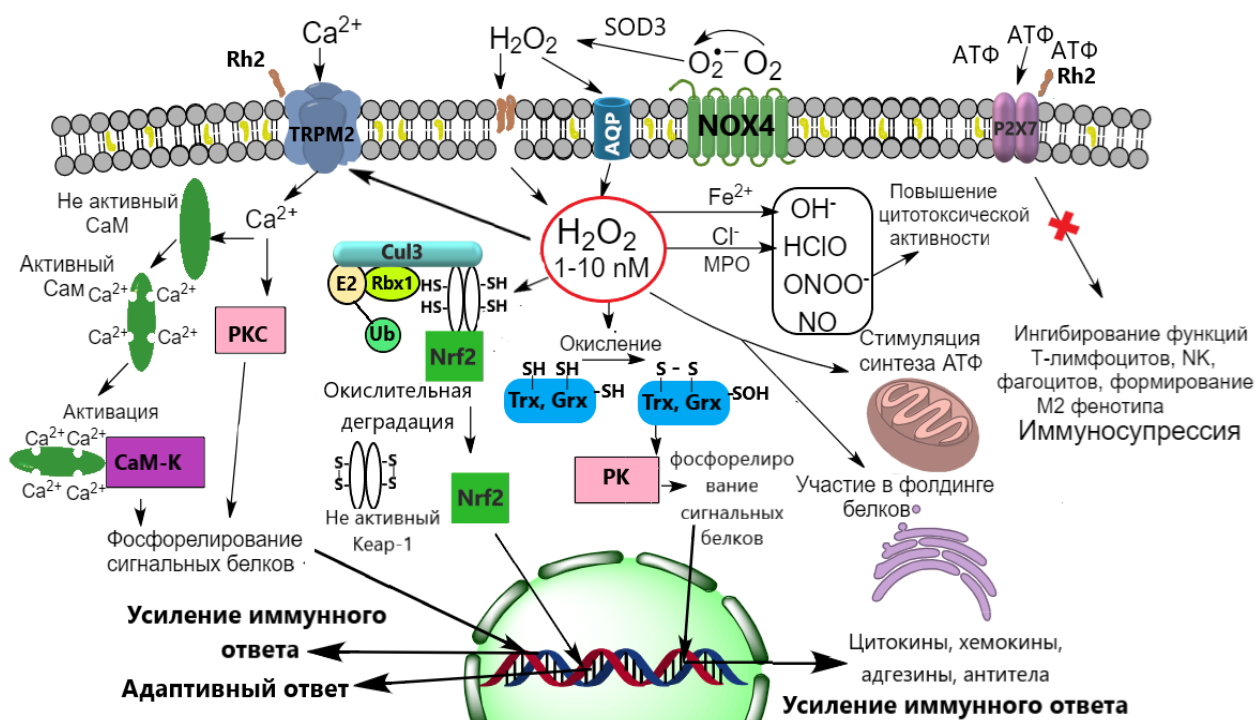


Рисунок 16. Особенности мембранотропного действия Rh2 на нормальные клетки.

Экзогенная H_2O_2 попадает в клетку посредством облегченной диффузии через различные AQP и сформированные под действием Rh2 дополнительные каналы диффузии в плазматической мембране, не превышая физиологического уровня ($\sim 1,0 - 10$ nM). «Мягкий стресс» приводит к активации работы дыхательной цепи, окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ в митохондриях, и регуляции белкового фолдинга в ЭПР. Умеренные концентрации H_2O_2 приводят к модуляции работы сигнальных путей, активность которых контролируется редокс-балансом с последующей активизацией связанных с ними протеинкиназ. Поступивший Ca^{2+} принимает участие в фосфорелировании сигнальных белков протенкизой C, а также переводит в активную форму белок кальмодулин, который при связывании четырёх Ca^{2+} активирует кальмодулин-зависимую протеин киназу. Всё это приводит к транскрипции генов, усиливающих иммунный ответ. Окисление тиоловых групп на супрессорном белке Keap1 ведет к распаду комплекса Nrf2-Keap1-Cul3, освобождению и активации Nrf2, что приводит запуску адаптационно-приспособительных путей.

Таким образом, особенности мембранотропного и прооксидантного действия Rh2 на опухолевые и нормальные клетки, обеспечивают направленное цитотоксическое действие этого гинзенозида на опухолевые клетки с одновременной стимуляцией функциональной

активности и защитных механизмов в нормальных клетках. Данный факт позволяет говорить о Rh2 как об эффективном и безопасном агенте для лечения онкологических заболеваний.

3.4 Применение смеси оксигенированных каротиноидов из морской звезды *P. pectinifera* в профилактике и лечении онкологических и воспалительных заболеваний

Каротиноиды (КР) группы ксантофиллов (КТ) занимают особое место среди низкомолекулярных природных соединений и характеризуются очень высоким потенциалом защиты организма от широкого круга заболеваний. Сотрудниками ТИБОХ ДВО РАН был найден доступный источник КТ – морская звезда *P. pectinifera*, которая является широко распространенным видом, обитающим в морской прибрежной зоне Дальнего Востока России. Из *P. pectinifera* была получена смесь оксигенированных каротиноидов (СОК), основными составляющими которой являются астаксантин (АК), зеаксантин и лютеин, при этом доминирующим компонентом и основным действующим агентом считается АК. СОК заявлено как средство лечения и профилактики онкологических, аллергических и воспалительных патологий, в частности кожных. Предполагается, что протективная активность КТ входящих в состав СОК в отношении указанных патологий определяется их способностью поддерживать редокс баланс, усиливать барьерные свойства клеток и модулировать иммунный ответ.

Стоит также отметить, что было решено исследовать именно суммарный экстракт СОК, содержащий помимо КТ свободные жирные кислоты. Показано, что зачастую при использовании комплексов из нескольких КР, удаётся достичь более высокого терапевтического эффекта. Кроме того, в силу своей липофильности КР проявляют минимальное физиологическое действие при бедной жирами диете, поскольку важным фактором, для эффективной реабсорбции КР в кишечнике, является наличие липидного окружения. Очевидно, что АК, лютеин и зеаксантин в составе СОК находятся в этерифицированном состоянии, за счёт присутствия жирных кислот, в такой форме КР легче абсорбируются энтероцитами кишечника и быстрее распределяются по организму оказывая своё физиологическое действие.

3.4.1 Оценка канцерпревентивной активности смеси оксигенированных каротиноидов

Рак кожи один из самых распространённых видов онкологических заболеваний. Помимо врожденных генетических дефектов, являющихся причиной наследственных опухолей, этиологическими факторами онкологических заболеваний также являются: механические повреждения – частая и повторяющаяся травматизация тканей с последующей регенерацией; химические канцерогены: полициклические ароматические углеводороды, ароматические аминсоединения, тяжёлые металлы и другие; физические канцерогены: УФ излучение, рентгеновские лучи, ионизирующее облучение; онкогенные вирусы (вирус Эпштейна-Барра, вирус герпеса). Поскольку кожа человека находится в постоянном прямом контакте с внешней средой, она наиболее подвержена постоянному влиянию различных канцерогенных факторов. При этом часто повторяющееся воздействие химических канцерогенных веществ считается наиболее частой причиной опухолевой трансформации клеток кожи.

Одной из наиболее перспективных стратегий в контроле заболеваемости онкологическими патологиями является превентивная химиотерапия, которая заключается в систематическом потреблении БАД и функциональных элементов питания, обладающих онкопротекторным действием. Такие КТ, как АК, лютеин и зеаксантин, часто рассматриваются в качестве потенциальных канцерпривентивных агентов. Не случайно была установлена прямая корреляция между потреблением данных КТ и снижением риска развития различных онкологических заболеваний (Маока, 2011; Heinen et al., 2007).

При моделировании кожного канцерогенеза *in vivo*, вызванного ДМБА, было установлено выраженное канцерпривентивное действие СОК (рисунок 17 и таблица 7). Показано, что в период активного развития онкологического процесса, после частых аппликаций ДМБА, в группах животных, получивших профилактический пероральный приём СОК (по 10 мг/кг 3 раза в неделю в течении 8 недель), наблюдалось снижение частоты появления новых опухолевых очагов и интенсивности роста новообразований.

Следует подчеркнуть, что СОК эффективнее, чем вещество сравнения – розмариновая кислота, ингибировала формирование новых папиллом. Так, в группе СОК к 11-ой неделе эксперимента образование новых опухолевых очагов практически полностью прекращалось, а к 15-й неделе количество и размер папиллом были более чем в 1,5 раза меньше, чем в группе К(-).

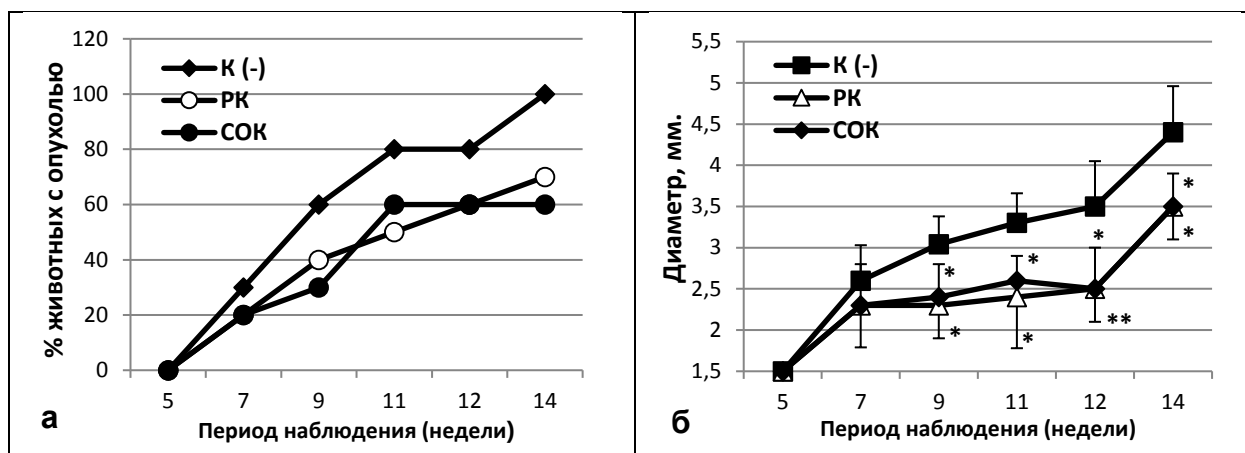


Рисунок 17. Динамика частоты заболеваемости раком кожи (а) и изменения размера папиллом (б) (ось ординат) в экспериментальных группах животных: К(-) – отрицательный контроль (без лечения); РК – розмариновая кислота (положительный контроль), СОК – смесь оксигенированных каротиноидов. Данные представлены с момента появления первых изменений на обработанных ДМБА участках кожи животных (через 5 недель после начала эксперимента). Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 10$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-) (тест Стьюдента).

Таблица 7. Канцерепревентивное действие СОК при экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза *in vivo*

Группа	Количество животных с опухолью, %	Количество опухолей	Средний диаметр опухоли, мм	Латентный период, недели
К(-) (без лечения)	100	27	$4,4 \pm 1,6$	$4,2 \pm 2,9$
РК (10 мг/кг)	70	15	$3,5 \pm 0,9^*$	$4,6 \pm 1,1$
СОК (10 мг/кг)	60	13	$3,5 \pm 1,01^*$	$4,3 \pm 2,7$

Примечание: Патоморфологические показатели разных экспериментальных групп животных, зафиксированных на 15-й неделе эксперимента. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 10$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-) (тест Стьюдента).

При оценке функциональной активности иммунной системы разных экспериментальных групп животных было показано, что на стадии прогрессивного роста опухоли в группе К(-) наблюдалась онкозависимая иммуносупрессия, что выражалось в

снижении уровня ИЛ-1, ИЛ-17, ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-10, как системно (сыворотка крови), так и локально (гомогенат кожи) (рисунок 18 а и б).

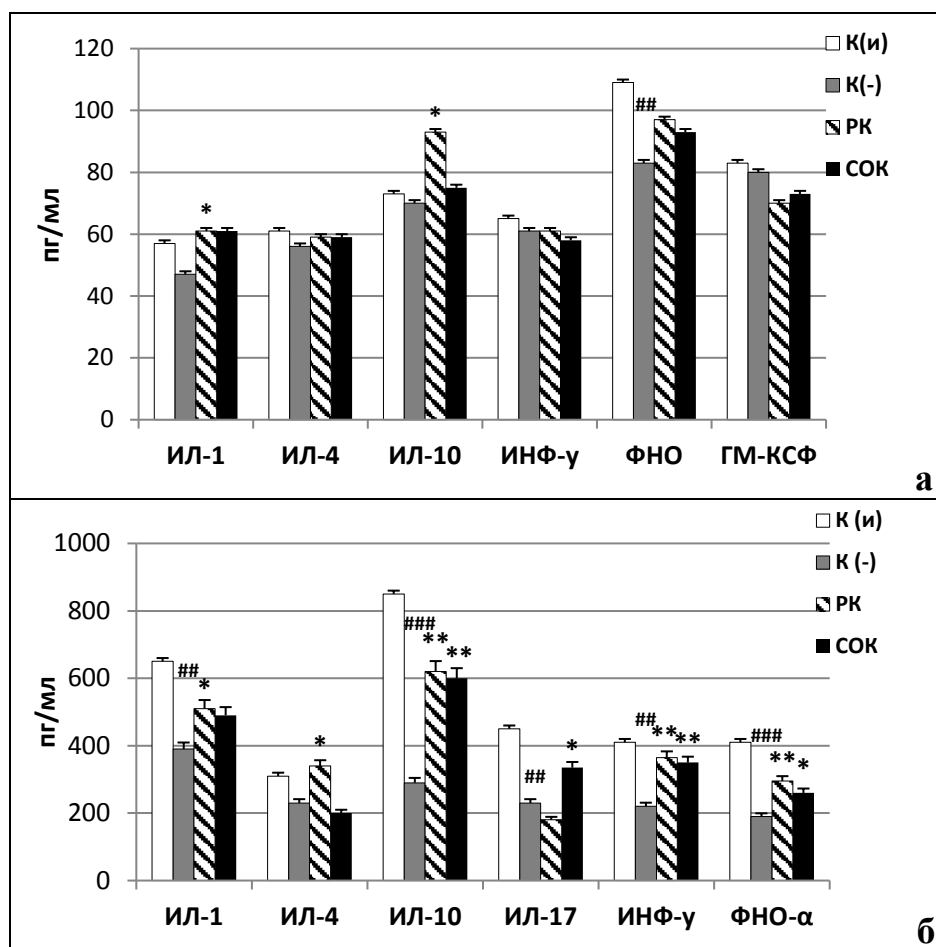


Рисунок 18. Содержание цитокинов (ось ординат, Пг в 1 мл биообразца) в сыворотке крови (а) и гомогенате кожи (б) животных разных групп при экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза, индуцированного ДМБА. Группы: К(и) – интактный контроль К(-) – отрицательный контроль (без лечения); РК – розмариновая кислота; СОК – смесь оксигенированных каротиноидов. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 10$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#\#}$, группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

Профилактический курс применения СОК способствовал стимуляции иммунологического надзора, повышая выработку всех вышеперечисленных цитокинов до уровня близкого к интактной группе, за исключением ИЛ-4. Полученные данные свидетельствуют о способности СОК модулировать иммунологические реакции при поражениях кожи, вызванных ДМБА, и усиливать иммунный противоопухолевый ответ.

Кроме того, по концентрации МДА в сыворотке крови был оценён редокс-статус, а по уровню билирубина общее состояние экспериментальных животных (рисунок 19 а, б). Показано, что в группе К(-) уровень МДА увеличивался в 1,5 раза по сравнению с группой интактных животных. СОК при этом оказался эффективным корректором данного параметра. Это вероятно достигается способностью АК, лютеин и зеаксантина защищать клетки кожи от АФК, образованных под действием химических канцерогенов. Тем самым эти КТ препятствуют окислительному повреждению ДНК, ведущего к злокачественной трансформации клетки (Vijayaradma et al., 2014). Анализ на общий билирубин показал, что его уровень в группах животных, принимавших СОК и розмариновую кислоту, был в пределах нормы. Следовательно, продолжительный приём СОК (8 недель) не оказывали токсического действия на организм животных.

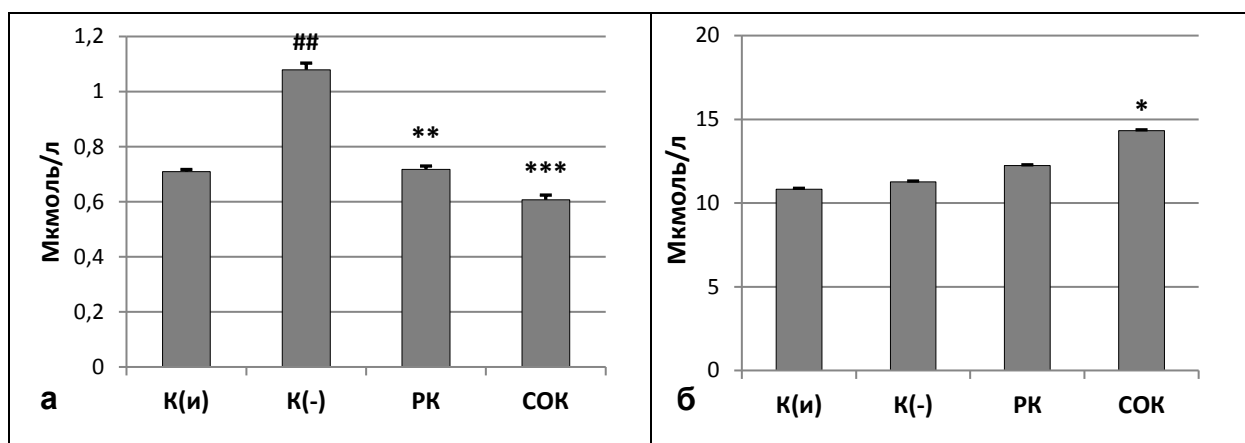


Рисунок 19. Уровень МДА (а) общего билирубина (б) (ось ординат) в сыворотке крови животных при экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза, индуцированного ДМБА. Группы: К(и) – интактный контроль К(-) – отрицательный контроль (без лечения); РК – розмариновая кислота; СОК – смесь оксигенированных каротиноидов; Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 10$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#\#}$, группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

Таким образом, в группах экспериментальных животных, прошедших курс лечения СОК, наблюдался выраженный канцерпревентивный эффект. СОК также эффективно, как розмариновая кислота, улучшает клиническую картину течения болезни, при этом нормализуя цитокиновый профиль и поддерживая редокс баланс организма экспериментальных животных.

Исходя из полученных экспериментальных данных, можно предположить, что канцепривентивный эффект СОК обусловлен, высоким содержанием АК, лютеина и зеаксантина в её составе. Данные КТ, обладая высокой биодоступностью и способностью накапливаться в коже, способны оказывать протективное действие на эпителиальные клетки от действия химических канцерогенов, а также нормализовать местный иммунологический статус кожи.

Ингибирование формирования и роста кожных новообразований, наблюдаемое при использовании СОК, может являться результатом способности КТ нейтрализовать канцерогенное действие ДМБА на клетки эпидермиса, через активацию AhR. Стимулируя активность AhR, КТ способствуют стимуляции экспрессии генов ферментов биотрансформации, детоксикации и элиминации ксенобиотиков, снижая риск аккумуляции канцерогенов в клетках эпителия и тем самым ингибируя начальные стадии канцерогенеза. Неслучайно, было показано, что агонисты AhR способны сдерживать неопластические процессы в клетке, индуцированных химическими канцерогенами, в том числе ДМБА (Vorontsova et al., 2019). Вероятно, механизм протективного действия АК, лютеина и зеаксантина осуществляется также посредством модулирования активности ряда сигнальных путей, регулирующих иммунный ответ и участвующих в онкологических процессах таких как NF- κ B, STAT3-5, AP-1 и ERK2, активация которых является неотъемлемой частью индукции и промоции канцерогенеза (Wang et al., 2011).

Анализируя результаты иммунологического теста, следует отметить, что роль воспалительного процесса в развитии рака не однозначна и проявляет себя по-разному на каждой из трёх стадий развития кожного канцерогенеза: индукции, промоции и прогрессии. Считается, что в месте аппликации такие канцерогены, как ДМБА, провоцирует локальный воспалительный ответ, при котором различными клетками запускается избыточный синтез ростовых факторов, цитокинов и хемокинов, активирующих ряд сигнальных путей с онкогенными эффектами, например, NF- κ B, STAT3-5, ERK, AP-1. Однако, на стадии прогрессивного роста кожных новообразований часто наблюдается феномен опухолезависимой иммуносупрессии, что приводит к нарушению противоопухолевого иммунного надзора (Surac et al, 2015).

При этом, действие отдельных цитокинов при опухолевых процессах имеет двойственный характер. В повреждённом химическим канцерогеном участке ткани ИЛ-1 и ФНО- α могут стимулировать активность онкогенных сигнальных путей (Lee and Kim, 2011). Однако установлено, что активация рецепторов к ИЛ-1 и особенно к ФНО может запускать каспазный каскад, который неизбежно приводит клетку к апоптозу (Rundhaug and

Fischer, 2010). Вместе с этим ФНО- α служит одним из главных медиаторов цитотоксичности, в частности, макрофагов. ФНО- α самостоятельно или вместе с ИФН- γ может индуцировать экспрессию адгезивных молекул межклеточного взаимодействия на кератиноцитах что немаловажно, так как потеря межклеточных контактов способствует преобразованию неопластических клеток в опухолевые. ИЛ-17, в свою очередь, усиливает действие многих цитокинов таких как ФНО- α , ИЛ-1, ИФН- γ (Воронова и др., 2012). Следовательно, недостаточная продукция этих цитокинов, ослабляет противоопухолевый иммунный ответ со стороны защитных систем организма, что создает благоприятный фон для развития опухоли.

ИФН- γ при этом имеет наиважнейшее значение в противоопухолевом иммунном ответе. Противоопухолевое действие ИФН- β заключается в подавлении синтеза опухолевых ростовых факторов, с одновременным увеличением экспрессии мембранных антигенов, рецепторов лимфотоксина на поверхности опухолевых клеток, наличие которых необходимо для усиления антител-зависимой цитотоксичности и формирования специфического противоопухолевого иммунного ответа лимфоцитов. К опосредованным противоопухолевым эффектам ИФН- γ относится его способность подавлять ангиогенез, в результате чего новообразование лишается притока питательных веществ и кислорода и замедляет свой рост. Следует выделить установленную способность ИФН- γ стимулировать недифференцированные клетки к созреванию, «нормализуя» фенотип опухолевых клеток, что может привести к реверсии трансформированного или злокачественного фенотипа к более «нормальному».

Следовательно, зарегистрированная способность СОК нормализовать цитокиновый профиль содействует поддержанию оптимальной функциональной активности иммунной системы при онкологических процессах. При этом часто отмечают факт того, что АК является сильным индуктором синтеза ИФН- γ , что было показано и в данном эксперименте, тем самым АК повышает эффективность противоопухолевого иммунного надзора организма.

Можно заключить, что применение КТ, в качестве профилактических средств и функциональных элементов питания, способно предупредить неблагоприятное воздействие канцерогенных факторов, поддерживать оптимальный иммунологический статус организма и, тем самым, снизить риск заболеваемости онкологическими патологиями.

3.4.2 Оценка противоаллергической эффективности мазевой формы смеси оксигенированных каротиноидов на модели аллергического контактного дерматита

Многие КТ рассматриваются не только как функциональные компоненты пищи, но и как действующие вещества различных косметических, космецевтических средств и дерматопротекторных препаратов. Поэтому важной задачей представляется оценка терапевтического действия КР при кожных заболеваниях, в частности, аллергических, в составе терапевтических средств наружного применения.

При моделировании АКД, в случае использования мази, содержащей в качестве активного начала 1%-ный СОК, наблюдалось существенное восстановление исходных параметров кожного покрова и уменьшение тяжести внешних патоморфологических проявлений АКД (рисунок 20).

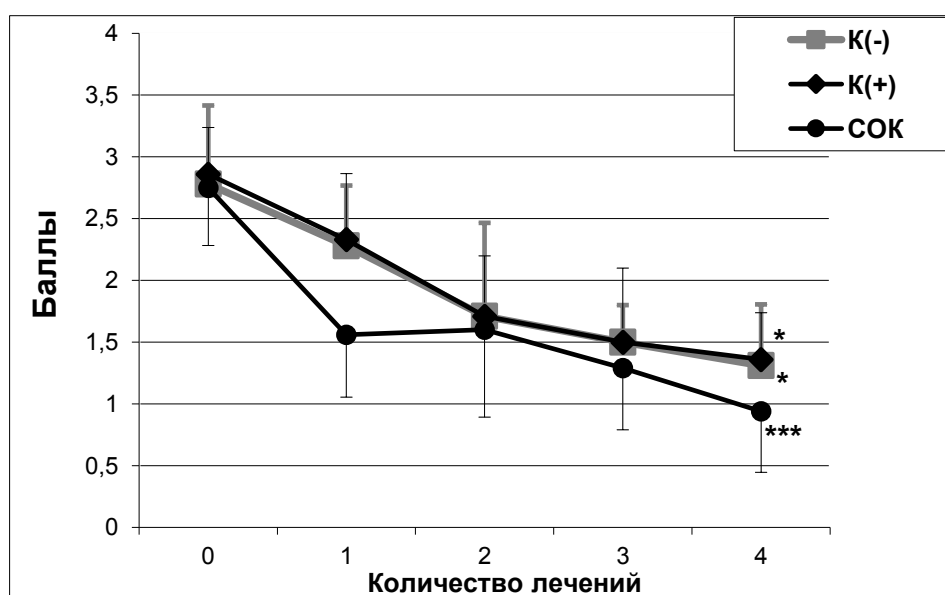


Рисунок 20. Показатели выраженности эритемы в баллах от 0 до 4 (ось ординат), вызванной ДНФБ, в разных группах животных: K(-) – отрицательный контроль (без лечения); K(+) – положительный контроль «Фуцидин»; СОК – мазь, содержащая 1% СОК, после каждого дня лечения (ось абсцисс). Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 8$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{***}$ (парный тест Стьюдента).

В группе, пролеченной мазью СОК, эритема уменьшалась приблизительно в 3 раза по сравнению с группой K(-) (рисунок 20). Следует отметить, что исследованная мазь СОК

по эффективности фармакологического действия превосходила коммерческий противовоспалительный препарат «Фуцидин».

Иммунологический анализ крови, показал, что СОК действует как эффективный корректор воспалительного процесса при АКД, тяжесть которого оценивали по уровню провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови методом ИФА (рисунок 21). Установлено, что применение СОК приводило к снижению уровня основных провоспалительных цитокинов, участвующих в патогенезе АКД: ИЛ-2, ФНО- α и ГМ-КСФ. При этом следует отметить, что под действием СОК резко увеличивалось содержания основных противовоспалительных цитокинов: ИЛ-10 – ключевой иммуносупрессорный фактор, являющийся антагонистом ряда провоспалительных цитокинов, и ИЛ-4, который часто выступает в качестве антагониста к ИЛ-2 и уменьшает его синтез. Данный факт может свидетельствовать о способности компонентов СОК усиливать противовоспалительный ответ при АКД.

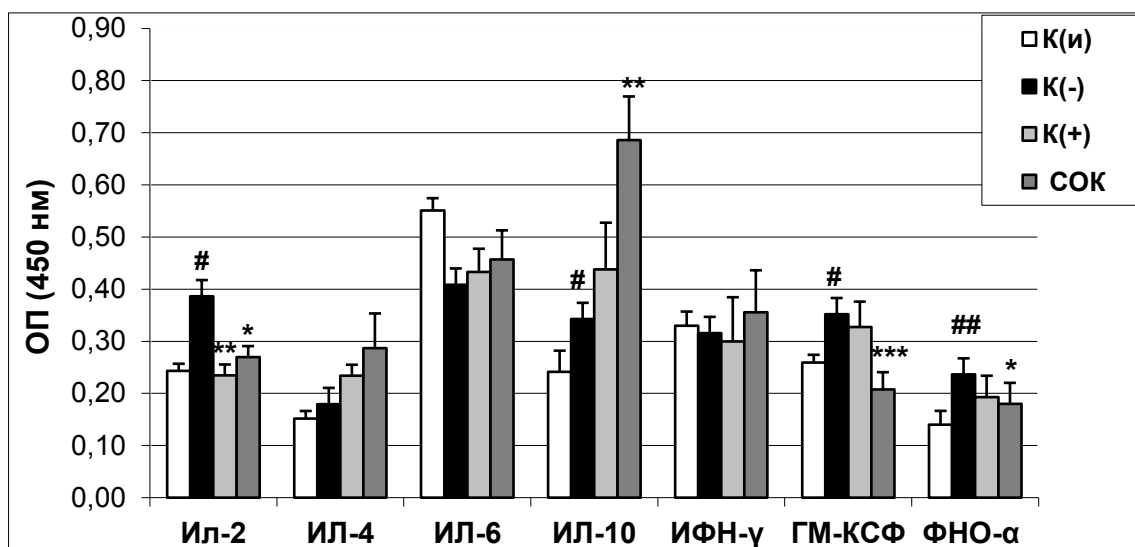


Рисунок 21. Содержание цитокинов при экспериментальном моделировании АКД, вызванном ДНФБ. Ось ординат – оптическая плотность, отражающая уровень цитокинов в сыворотке крови разных групп животных: K(i) – интактный контроль; K(-) – отрицательный контроль (без лечения); K(+)) – положительный контроль «Фуцидин»; СОК – 1% мазь, содержащая смесь оксигенированных каротиноидов. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 8$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой K(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{##}$, $P \leq 0,01^{###}$, группа K(-) в сравнении с группой K(i) (тест Стьюдента).

На основе полученных результатов можно заключить, что мазевая форма СОК является эффективным средством для лечения аллергических заболеваний кожи, таких как АКД. Данный факт создает предпосылки для всестороннего изучения полезных биофармацевтических свойств СОК и оптимизации его применения в медицинской и косметической практике.

3.4.3 Противовоспалительная активность смеси оксигенированных каротиноидов при моделировании системного воспаления

Экспериментальная модель СВ была выбрана для детального исследования иммуномодулирующей активности СОК. Результаты иммунологических и биохимических анализов крови разных групп животных представлены на рисунках 22 и 23.

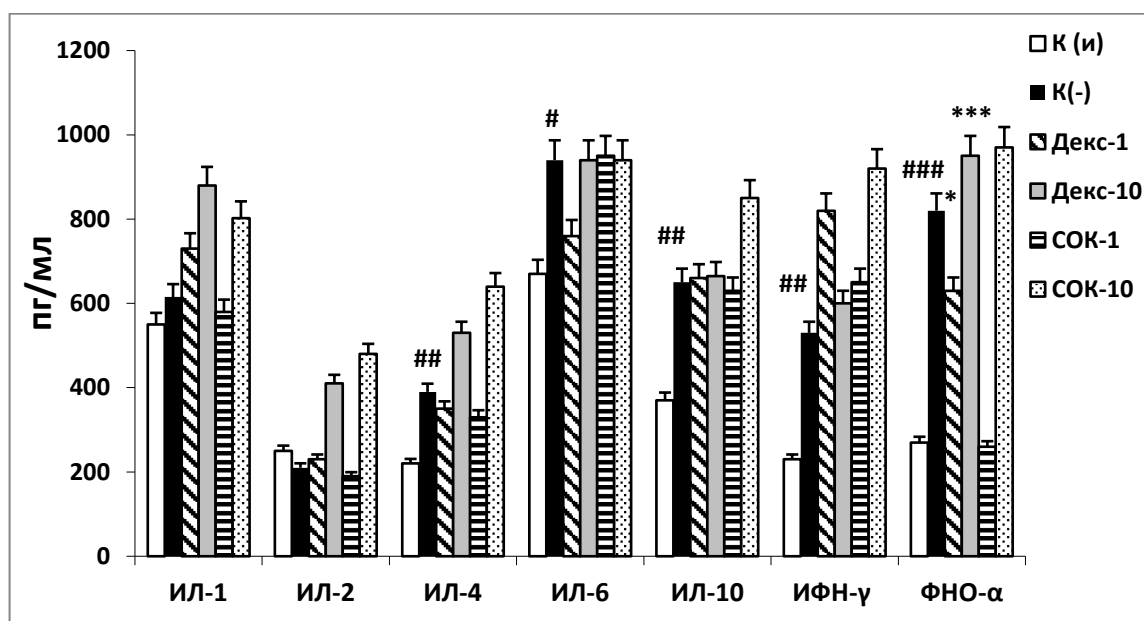


Рисунок 22. Содержание цитокинов (ось ординат, в пг/мл) после введения ЛПС в сыворотке крови животных в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп: K(i) – интактный контроль; K(-) – отрицательный контроль (без лечения); Декс-1, Декс-10 – «Офтан-Дексаметазон» в дозах 1 и 10 мг/кг, соответственно; СОК-1, СОК-10 – смесь оксигенированных каротиноидов в дозах 1 и 10 мг/кг, соответственно. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD (при $n = 6$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, в сравнении с группой K(-); $P \leq 0,05^{\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#\#}$, группа K(-) в сравнении с группой K(i) (тест Стьюдента).

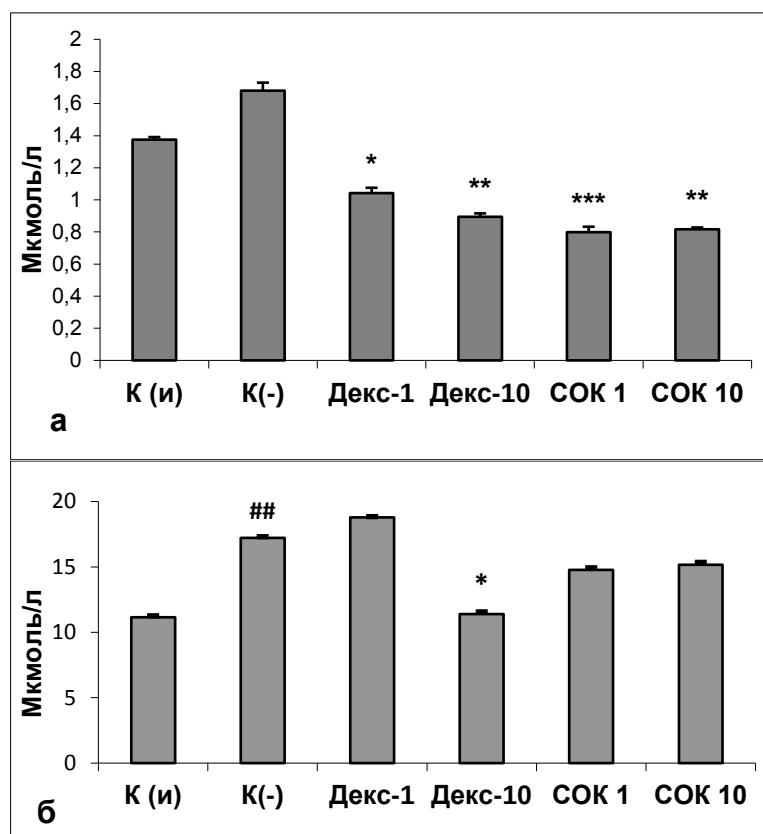


Рисунок 23. Уровни МДА (а) общего и билирубина (б) (ось ординат) в сыворотке крови животных разных экспериментальных групп: К(и) – интактный контроль; К(-) – отрицательный контроль (без лечения); Декс-1, Декс-10 – «Офтан-Дексаметазон» в дозах 1 и 10 мг/кг, соответственно; СОК-1, СОК-10 – смесь оксигенированных каротиноидов в дозах 1 и 10 мг/кг, соответственно. Результаты представлены, как среднее $\pm$ SD (при $n = 6$), $P \leq 0,05^*$, $P \leq 0,01^{**}$, $P \leq 0,01^{***}$, опытные группы в сравнении с группой К(-); $P \leq 0,05^\#$, $P \leq 0,01^{\#\#}$, $P \leq 0,01^{\#\#\#}$, группа К(-) в сравнении с группой К(и) (тест Стьюдента).

В результате эксперимента было показано, что при введении ЛПС в экспериментальной группе К(-) значительно повышалось сывороточное содержание основных провоспалительных цитокинов, а именно ИЛ-1, -6, ИФН- γ и ФНО- α (рисунок 22). Весьма характерно, что влияние СОК и препарата сравнения «Офтан-Дексаметазон» на уровень цитокинов в значительной степени зависело от используемой дозы и маршрута введения препаратов. Интересно, что при пероральном способе введения СОК и «Офтан-Дексаметазон» способствовали резкому повышению уровня всех тестируемых цитокинов по сравнению с группой К(и) и К(-). Однако при внутрибрюшинном введении СОК эффективнее, чем «Офтан-Дексаметазон», способствовала подавлению выработки

ключевых провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 и ФНО- α , доводя их содержание до уровня интактных животных.

Оценка функциональной активности антиоксидантной системы защиты и общего состояния организма экспериментальных животных, при моделировании СВ, показала, что в группе К(-) повышалось содержание МДА и общего билирубина в крови (рисунок 23). При этом СОК не зависимо от дозы и маршрута введения являлась эффективным корректором уровня МДА и общего билирубина. Результаты указывают на то, что применение СОК в условиях СВ оказывало защитное действие на редокс-гомеостаз и на функциональную активность печени, желчевыводящих путей и процесс кроветворения.

Результаты, касаемые влияния СОК на иммунологический статус животных, при моделировании различных патологий, свидетельствуют в пользу того, что СОК проявляет себя в качестве местного, но не перорального противовоспалительного средства. Установлено, что СОК снижает чрезмерную иммунную реакцию при непосредственном действии на очаг воспаления (в/б введение при СВ, аппликации на воспалённый участок кожи при АКД) и в то же время оказывает иммуностимулирующий эффект при энтеральных маршрутах введения (пероральный приём при кожном канцерогенезе и СВ). Следовательно, выбранный способ применения средств на основе КТ во многом определяет их физиологическое действие на организм.

Анализируя все полученные результаты, можно предположить, что зарегистрированная канцепривентивная противоаллергическая и иммуномодулирующая активность СОК, очевидно, обусловлена преимущественным содержанием КТ в его составе. При этом АК, как доминирующий компонент СОК, является основным действующим агентом данного средства, а зеаксантин и лютеин, обладающие высокой антиоксидантной, противовоспалительной и антиканцерогенной активностью, содействуют терапевтическому действию АК. Следует отметить, что лютеин и зеаксантин, так же как и АК, способны запасаться в эпидермисе и предотвращать развитие воспалительных и онкологических заболеваний кожи, защищая клетки эпидермиса от повреждающего действия различных физических и химических факторов и свободно-радикальных процессов, а также снижая экспрессию COX-2, Bcl-2, NF- κ B и MMP-9, одновременно увеличивая экспрессию p53 и Bax (Chew et al, 2013; Andersen, 2015). Следовательно, при комплексном применении КР взаимно усиливают своё терапевтическое действие на организм.

4 Заключение

Полученные результаты указывают на наличие высокого терапевтического потенциала у каждого из исследованных соединений и специфических особенностей в механизмах их фармакологического действия. Приведённые данные свидетельствуют о способности мазевого препарата «Коурохитин», содержащего 0,01% ТР, выступать в качестве универсального дерматопротекторного средства, обладающего выраженными противовоспалительными, противоаллергическими и ранозаживляющими свойствами. МТ, как водорастворимое производное ТР, обладает не только цитотоксической активностью в отношении различных опухолевых клеток *in vitro*, но и повышает противоопухолевый эффект ДР при их сочетанном применении *in vivo*. Таким образом, МТ расширяет арсенал фармацевтических средств, обладающих противоопухолевым действием. Применение Rh2 в качестве средства комбинированной терапии с противоопухолевыми препаратом ДР, позволяет повысить эффективность химиотерапевтического курса, снизить риск развития опухолевой резистентности и нивелировать побочные эффекты химиотерапии. При этом очевидно, что отмеченные выше особенности мембранного действия Rh2 определяют молекулярные механизмы его противоопухолевой, иммуномодулирующей и адаптогенной активности. Результатом мембранотропного и связанного с ним прооксидантного действия Rh2 является индукция гибели опухолевых клеток по механизмам некроза, апоптоза и аутофагии при одновременной стимуляции в нормальных, в частности в иммунных, клетках запуска адаптивных программ, через стресс-индуцированную активацию сигнального пути Nrf2. Регулярное употребление СОК в качестве функциональных элементов пищи способно предупредить неблагоприятное воздействие канцерогенных факторов и снизить риск заболеваемости онкологическими патологиями. Кроме того, СОК может использоваться как эффективное средство наружного применения для лечения аллергических дерматозов и улучшения состояния кожных покровов.

5 Выводы

1. При экспериментальном моделировании различных патологий человека было определено, что изученные лечебные средства на основе ТР, МТ, Rh2 и СОК обладают высоким терапевтическим потенциалом, индивидуальной направленностью и специфическими особенностями в механизмах их фармакологического действия.

2. Показано, что экспериментальный мазевой препарат «Коурохитин», разработанный на основе ТР, является перспективным дерматопротекторным средством с ранозаживляющим и противоаллергическим действием. Терапевтический эффект препарата «Коурохитин», во многом определяется выраженной противовоспалительной активностью ТР, тесно связанной с его ингибирующим действием на синтез провоспалительных цитокинов.

3. Установлено, что терапевтический эффект МТ – нового водорастворимого и менее токсичного производного ТР, направлен в сторону противоопухолевого действия. МТ оказывает выраженное антипролиферативное действие на опухолевые клетки *in vitro* и повышает противоопухолевую эффективность ДР при их совместном применении *in vivo*.

4. Определенно, что гинзенозид Rh2 обладает высоким химиотерапевтическим потенциалом. Комбинированная противоопухолевая терапия ДР и Rh2 значительно эффективнее, чем монотерапия ДР, что свидетельствует в пользу взаимного потенцирующего действия данных препаратов. При этом Rh2, за счёт иммуномодулирующей и адаптогенной активности, способен обеспечить защиту организма от токсичных побочных действий ДР.

5. При экспериментальном моделировании кожного канцерогенеза, СВ и АКД препараты на основе СОК проявляют себя как эффективные корректоры клинических симптомов указанных патологий, способствует поддержанию оптимального баланса уровней про- и противовоспалительных цитокинов, а также редокс гомеостаза в организме экспериментальных животных.

6. Список литературы

1. Билич Г.Л. Регуляция регенерации клетка, ткань, организм. Г.Л. Билич, В.Э. Колла // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в эксперименте и клинике. Горький. 1978. С. 14-70.
2. Евдокимова О.В. Содержание генинозидов культивируемого женьшеня и установление диапазонов функциональности его экстрактов // Техника и технология пищевых производств. 2011. Т. 21, № 2. С. 27-29.
3. Кочкин Д. В., Глаголева Е. С., Галишев Б. А., Спиридович Е. В., Носов А. М., Решетников В. Н. Анализ гинзенозидов в корнях женьшеня настоящего (*Panax ginseng*), интродуцированного в центральном ботаническом саду нан Беларуси // Доклады Национальной академии наук Беларуси. 2018. Т. 62, № 4. С. 447-454.
4. Лихацкая Г.Н., Попов А.М., Одиноква Л.Э., Атопкина Л.И., Уварова Н.И., Кузнецова Т.А., Анисимов М.М. Влияние свободных тритерпеноидов на свойства модельных липидных мембран // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1990. № 6. С. 942-946
5. Московкина Т.В., Калиновский А.И., Маханьков В.В. Получение производных триптантрина (коуропитина) по реакции замещенных изатинов с ROCL // Журнал органической химии. 2012. Т. 48, № 1. Р. 128 – 131.
6. Попов А.М., Агафонова И.Г., Шенцова Е.Б., Атопкина Л.Н., Самошина Н.Ф., Уварова Н.И. Сравнительное изучение противоопухолевой активности моногликозидов протопанаксадиола и бетулафолиентриола // Антибиотики и химиотерапия. 1994. Т. 39, № 7. С.24-29.
7. Попов А.М., Малиновская Г.В., Уварова Н.И., Атопкина Л.Н., Ю. Н. Лоечко, Артюков А.А., Еляков Г.Б. Характеристика нейтропротекторной активности тритерпеновых гликозидов и разработанной на их основе композиции "Женсолар"// Докл. РАН. 1998. Т. 358, № 3. С. 413-415.
8. Попов А.М., Атопкина Л.Н., Уварова Н.И., Еляков Г.Б. Антиметастатическая и иммуномодулирующая активности минорных гликозидов женьшеня // Докл. РАН (Россия). 2001. Т. 380, № 1. С. 412-416.
9. Попов А.М. Сравнительное изучение цитотоксического и гемолитического действия тритерпеноидов женьшеня и голотурий // Изв. РАН. Сер. биол. 2002. № 2. С. 155-164.
10. Попов А.М. Механизмы биологической активности гликозидов женьшеня: сравнение с гликозидами голотурий // Вестник ДВО РАН. 2006. №.6. С. 92-104.

11. Попов А.М., Недашковская О.И., Гафуров Ю.М., Московкина Т.В. Противомикробная активность препарата «Коурохитин» // Биофармацевтический журнал. 2011. Т. 3, № 3. С. 3–5.
12. Попов А.М. Противоопухолевая и антиметастатическая активность моногликозидов женьшеня: современные представления // Биофармацевтический журнал. 2011. Т. 3, № 5. С. 3–8.
13. Попов А.М., Штода Ю.П., Кривошапко О.Н., Гафуров Ю.М., Московкина Т.В. Ранозаживляющая активность разных мазевых форм хиназолинового алкалоида триптантрина // Биофармацевтический журнал. 2012. Т. 4, № 2. С. 21–24.
14. Воронова О.С., Генинг Т.П., Абакумова Т.В., Долгова Д.Р., Генинг С.О. Паранеопластические процессы в эритроцитах и плазме крови в динамике рака шейки матки (в эксперименте) // Фундаментальные исследования. 2012. Т. 1, № 9. С. 22–25.
15. Alos E., Rodrigo M.J., Zacarias L. Manipulation of carotenoid content in plants to improve human health // Subcell. Biochem. 2016. V. 79. P. 311–343.
16. Andersen C.J. Bioactive egg components and inflammation // Nutrients. 2015. V. 7, № 9. P. 7889–7913.
17. Antony J., Saikia M., Vinod V., Nath L.R., Katiki M.R., Murty M.S.R., Paul A., Shabna A., Chandran H., Joseph S.M., Kumar N.S., Panakkal E.J., Sriramya I.V., Sridivya I.V., Ran S., Rajan E., Sankar S., Anto R.J. DW-F5: A novel formulation against malignant melanoma from *Wrightia tinctorial* // Sci. Rep. 2015. V. 5. e11107.
18. Aniszewski T. Edition alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role // In Alkaloids - Secrets of Life. 1st edition Elsevier Science. 2007. pp. 334.
29. Babin A., Moreau J., Moret Y. Storage of carotenoids in crustaceans as an adaptation to modulate Immunopathology and optimize immunological and life-History strategies // Bioessays. 2019. V. 41, № 11. e1800254.
20. Bae E.A., Han M.J., Kim E.J. Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants // Arch. Pharm. Res. 2004. V. 27, № 1. P. 61–67.
21. Bertolotti M., Faarinelli G., Galli M., Aiuti A., Sitia R. AQP8 transports NOX2-generated H₂O₂ across the plasma membrane to promote signaling in B cells // J. Leukocyte Biol. 2016. V. 100, № 5. P. 1071–1079.
22. Baswan S.M., Marini A., Klosner A.E., Jaenicke T., Leverett J., Murray M., Gellenbeck K.W., Krutmann J. Orally administered mixed carotenoids protect human skin against ultraviolet

A-induced skin pigmentation: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2020. V. 36, № 3. P. 219-225.

23. Bienert G.P., Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide // *Biochim Biophys Acta.* 2014. V. 40, № 5. P. 1596-1604.

24. Britton G. Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 2020. V. 1865, № 11. 158699.

25. Bhaskarachary K., Naveena N., Kalpagam P. Potential Benefits of Plant Metabolites for Human Health // *The Indian Journal of Nutrition and Dietetics.* 2015, V.52, № 2, P. 213-225.

26. Bolhassani A. Cancer chemoprevention by natural carotenoids as an efficient strategy // *Anticancer agents in medicinal chemistry.* 2015. V. 15 № 8. P. 1026-1031.

27. Bose S., Banerjee S., Mondal A., Chakraborty U., Pumarol J., Croley C.R., Bishayee A. Targeting the JAK/STAT signaling pathway using phytochemicals for cancer prevention and therapy // *Cells.* 2020, V. 9, № 6. 1451.

28. Chew E.Y., San Giovanni J.P., Ferris F.L., Wong W.T., Agron E., Clemons T.E., Sperduto R., Danis R., Chandra S.R., Blodi B.A., Domalpally A., Elman M.J., Antoszyk A.N., Ruby A.J., Orth D., Bressler S.B., Fish G.E., Hubbard G.B., Klein M.L., Friberg T.R., Rosenfeld P.J., Toth C.A., Bernstein P. Lutein/zeaxanthin for the treatment of age-related cataract: AREDS2 randomized trial report // *JAMA Ophthalmol.* 2013. V. 131, № 7. P. 843–850.

29. Capelli B., Bagchi D., Cysewski G.R. Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal- based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement // *Nutrafoods.* 2013. V. 12. P. 145–152.

30. Chang H.N., Yeha Y.C., Chueh H.Y., S Pang J.H. The anti-angiogenic effect of tryptanthrin is mediated by the inhibition of apelin promoter activity and shortened mRNA half-life in human vascular endothelial cells // *Phytomedicine.* 2019. V. 58. 152879.

31. Cheng C.C., Yang S.M., Huang C.Y., Chen J.C., Chang W.M., Hsu S.L. Molecular Mechanisms of ginsenoside Rh2-mediated G1 growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells // *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005. V. 55, № 6. P. 531-540.

32. Cheng H.M., Kuo Y.Z., Chang C.Y., Chang C.H., Fang W.Y., Chang C.N., Pan S.C., Lin J.Y., Wud L.W. The anti-TH17 polarization effect of Indigo naturalis and tryptanthrin by differentially inhibiting cytokine expression // *Ethnopharmacology.* 2020. V. 255, 112760.

33. Chen Y., Zhang Y., Song W., Zhang Y., Dong X., Tan M. Ginsenoside Rh2 improves the cisplatin anti-tumor effect in lung adenocarcinoma A549 cells via superoxide and PD-L1 // *Anticancer agents in medicinal chemistry.* 2020. V. 20, № 4. P. 495-503.

34. Chang H.N., Huang S.T., Yeh Y.C., Wang H.S., Wang T.H., Wu Y.H., S Pang J.H. Indigo naturalis and its component tryptanthrin exert anti-angiogenic effect by arresting cell cycle and inhibiting Akt and FAK signaling in human vascular endothelial cells // *Ethnopharmacology*. 2015. V. 174, P. 474-481.
35. Christensen L.P. Ginsenosides: chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects // *Adv. Food Nutr. Res.* 2009. V. 55, P. 1-99.
36. Choi S., Oh J. Y., Kim S. J. Ginsenoside Rh2 induces Bcl-2 family proteins-mediated apoptosis in vitro and in xenografts in vivo models // *Cell Biochem*. 2011. V. 112, № 1. P. 330-340.
37. Choi K., Kim M., Ryu J., Choi C. Ginsenosides compound K and Rh2 inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced activation of the NF-kappaB and JNK pathways in human astroglial cells // *Neurosci. Lett.* 2007. V. 421, № 1. P. 37-41.
38. Chuyen H.V., Eun J.B. Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017. V. 57, № 12. P. 2600-2610.
39. Choi Y., Lee M.K., Lim S.Y., Sung S.H., Kim Y.C. Inhibition of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and interleukin-1 by torilin is mediated by mitogen-activated protein kinases in microglial BV2 cells // *Br. J. Pharmacol.* 2009. V. 156, № 6. P. 933-940.
40. Crozier A., Yokota T., Jaganath I.B., Marks S., Saltmarsh M., Clifford M.N. Secondary Metabolites in Fruits, Vegetables, Beverages and Other Plant- based Dietary Components // In: Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. 2006 Chapter 7. P. 208-302.
41. Davinelli S., Nielsen M.E., Scapagnini G. Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review // *Nutrients*. 2018. V. 10, № 4. pii: E522.
42. Darvin M.E., Sterry W., Lademann J., Vergou T. The role of carotenoids in human skin // *Molecules*. 2011. V. 16, № 12. P. 10491-10506.
43. Dalla V., Segal F., Prata C., Zamboni L., Angeloni C., Rizzo B., Hrelia S., Fiorentini D. Intracellular cysteine oxidation is modulated by aquaporin-8-mediated hydrogen peroxide channeling in leukaemia cells // *Biofactors*. 2017. V. 43, № 2. P. 232-242.
44. Danz H., Stoyanova S., Thomet O., Simon H.U., Dannhardt G., Ulbrich H., Hamburger M. Inhibitory activity of tryptanthrin on prostaglandin and leukotriene synthesis // *Planta Med.* 2002. V. 68, № 10. P. 875-880.
45. Dennis E.A. and Norris P.C. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation // *Nat Rev Immunol.* 2015. V. 15, № 8. P. 511-523.

46. De Nicola G.M., Karreth F.A., Humpton T.J., Gopinathan A., Wei C., Frese K., Mangal D., Yu K.H., Yeo C.J., Calhoun E.S., Scrimieri F., Winter J.M., Hruban R.H., Iacobuzio-Donahue C., Kern S.E., Blair I.A., Tuveson D.A. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis // *Nature*. 2011. V. 475, № 7354. P. 106–109.
47. Dey P., Kundu A., Kumar A., Gupta M., Lee B.M., Bhakta T., Dash S., Kima H.S. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids // In *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier. 2020. Chapter 15. P. 505–567.
48. Di Virgilio F., Adinolfi E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth // *Oncogene*. 2017. V. 36, № 3. P. 293–303.
49. Dudhgaonkar S., Thyagarajan A., Sliva D. Suppression of the inflammatory response by triterpenes isolated from the mushroom *Ganoderma lucidum* // *Int. Immunopharmacol.* 2009. V. 9, № 11. P. 1272 – 1280
50. Fiedor J. and Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease // *Nutrients*. 2014. V. 6, № 2. P. 466–488.
51. Farnoush A. and Mackenzie I.C. Sequential histological changes and mast cell response in skin during chemically-induced carcinogenesis // *J. Oral Pathology and Medicine* July. 1983. V. 12, № 14. P. 300-306.
52. Fonacier L.S., Dreskin S.C., Leung D.Y. Allergic skin diseases // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010. V. 125, № 2. P. 138-S149.
53. Gazaryan I.G., Thomas B. The status of Nrf2-based therapeutics: current perspectives and future prospects // *Neural Regeneration Research*. 2016, V. 11, № 11. P. 1708-1711.
54. Gambhir L. 1,4-Naphthoquinone, a pro-oxidant, ameliorated radiation induced gastrointestinal injury through perturbation of cellular redox and activation of Nrf2 pathway // *Drug discoveries and therapeutics*. 2016. V. 10, № 2. P. 93-102.
55. Gaitanis G., Magiatis P., Hantschke M., Bassukas I.D., Velegraki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases // *Clin. Microbiol. Rev.* 2012. V. 25, № 1. P. 106–141.
56. Garcia-de Blas E., Mateo R., Alonso-Alvarez C. Specific carotenoid pigments in the diet and a bit of oxidative stress in the recipe for producing red carotenoid-based signals // *Peer J*. 2016. V. 4. e2237.
57. Galasso C., Corinaldesi C., Sansone C. Carotenoids from marine organisms: biological functions and industrial applications // *Antioxidants*. 2017. V. 6, № 4. p. 96.
58. Gabriely G., Wheeler M.A., Takenaka M.C., Quintana F.J. Role of AHR and HIF-1 α in Glioblastoma Metabolism // *Trends Endocrinol Metab*. 2017. V. 28, № 6. P. 428-436.

59. Ge G., Yan Y., Cai H. Ginsenoside Rh2 inhibited proliferation by inducing ROS mediated ER stress dependent apoptosis in lung cancer cells // *Biological and pharmaceutical bulletin*. 2017. V. 40, № 12. P. 117-2124.
60. Grindheim A.K., Saraste J., Vedeler A. Protein phosphorylation and its role in the regulation of Annexin A2 function // *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects* 2017. V. 1861, № 11, Part A. P. 2515-2529.
61. Goswami K.K., Ghosh T., Ghosh S., Sarkar M., Bose A., Baral R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment // *Cell. Immunol.* 2017. V. 316, P. 1-10.
62. Guo X.X., Guo Q., Li Y., Lee S.K., Wei X.N., Jin Y.H. Ginsenoside Rh2 induces human hepatoma cell apoptosis via bax/bak triggered cytochrome C release and caspase-9/caspase-8 activation // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. V. 13, № 12. P. 15523–15535.
63. Han Q., Han L., Tie F., Wang Z., Ma C., Li J., Wang H., Li G. 20(S)-protopanaxadiol ginsenosides induced cytotoxicity via blockade of autophagic flux in HGC-27 cells // *Chem. Biodivers.* 2020. doi: 10.1002/cbdv.202000187
64. Han S., Jeong A.J., Yang H., Kang K.B., Lee H., Yi E.H., Kim B.H., Cho C.H., Chung J.W., Sung S.H., Ye S.K. Ginsenoside 20(S)-Rh2 exerts anti-cancer activity through targeting IL-6-induced JAK2/STAT3 pathway in human colorectal cancer cells // *Ethnopharmacology*. 2016. V. 194. P. 83–90.
65. Hay R.J. Malassezia, dandruff and seborrhoeic dermatitis: an overview // *Br. J. Dermatol.* 2011. V. 165, № 2. P. 2–8.
66. Han N.R., Moon P.D., Kim H.M., Jeong H.J. Tryptanthrin ameliorates atopic dermatitis through down-regulation of TSLP. // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014. V. 542. P. 14-20
67. Helliwell R.M., ShioukHuey C.O., Dhuna K., Molero J.C., Ye J.-M., Xue C.C., Stokes L. Selected ginsenosides of the protopanaxadiol series are novel positive allosteric modulators of P2X7 receptors // *Br. J. Pharmacol.* 2015. V. 172, № 13. P. 3326–3340.
68. Hesse-Macabata J., Morgner B., Elsner P., Hipler U.C., Wiegand C. Tryptanthrin promotes keratinocyte and fibroblast responses in vitro after infection with *Trichophyton benhamiae* DSM6916 // *Sci. Rep.* 2020. V. 10, № 1:1863.
69. Hers I., Vincent E.E., Tavaré J.M. Akt signalling in health and disease // *Cell Signal.* 2011. V. 23, №. 10. P. 1515-1527.

70. Heinen M.M., Hughes M.C., Ibiebele T.I., Marks G.C., Green A.C., Pols J.C. Intake of antioxidant nutrients and the risk of skin cancer // *Eur. J. Cancer*. 2007. V. 43, № 18. P. 2707-2716.
71. Hientz K., Mohr A., Bhakta-Guha D., Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy // *Oncotarget*. 2017. V. 8, № 5. P. 8921–8946.
72. Hubbard T.D., Murray I.A., Perdew G.H. Indole and Tryptophan metabolism: endogenous and dietary routes to Ah receptor activation // *Drug metabolism and disposition*. 2015. V. 43, № 10. P. 1522-1535.
73. Huang G., Shi L.Z., Chi H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: Signal integration, propagation and termination // *Cytokine*. 2009. V. 48, № 3. P. 161–169.
74. Hou J., Yun Y., Xue J., Jeon B., Kim S. Doxorubicin-induced normal breast epithelial cellular aging and its related breast cancer growth through mitochondrial autophagy and oxidative stress mitigated by ginsenoside Rh2 // *Phytother. Res.* 2020. V. 34, № 7. P. 1659-1669.
75. Ishihara T., Kohno K., Ushio S., Iwaki K., Ikeda M., Kurimoto M. Tryptanthrin inhibits nitric oxide and prostaglandin E (2) synthesis by murine macrophages // *Eur. J. Pharmacol.* 2000. 407 № 1-2. P. 197-204.
76. Ito W., Takeda M., Ueki S., Tanigai T., Kayaba H., Chihara J. Effect of the hepatocyte growth factor on allergic inflammatory cells // *International archives of allergy and immunology*. 2010. V. 152, № 1. P. 96-100.
77. Iwaki K., Ohashi E., Arai N., Kohno K., Ushio S., Taniguchi M., Fukuda S. Tryptanthrin inhibits Th2 development, and IgE-mediated degranulation and IL-4 production by rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells // *Ethnopharmacol.* 2011. V. 134, № 2. P. 450-459.
78. Jayakumar K., Murugan K. Solanum Alkaloids and their Pharmaceutical Roles // *Analytical and pharmaceutical research*. 2016. V. 3, № 6. 00075.
79. Jaswir I., Noviendri D., Hasrini R.F., Octavianti F. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry // *Medicinal plants research*. 2011. V. 5, № 33. P. 7119-7131.
80. Jao C.W., Lin W.C., Wu Y.T., Wu P.L. Isolation, Structure Elucidation, and Synthesis of Cytotoxic Tryptanthrin Analogues from *Phaius mishmensis* // *Nat. Prod.* 2008. V. 71. P. 1275–1279.
81. Jeong S.M., Kim Y.J. Astaxanthin treatment induces maturation and functional change of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice // *Antioxidants (Basel)*. 2020. V. 9, № 4. pii: E350.

82. Juric S, Stracenski K.S., Krol-Kilińska Z, Zutić I., Uher S.F., Dermic E., Topolovec-Pintarić S., Vinceković M. The enhancement of plant secondary metabolites content in *Lactuca sativa* L. by encapsulated bioactive agents // *Sci. Rep.* 2020. V. 10, № 1. 3737.
83. Jin Z.H., Qiu W., Liu H., Jiang X.H., Wang L. Enhancement of oral bioavailability and immune response of Ginsenoside Rh2 by co-administration with piperin // *Chin. J. Nat. Med.* 2018. V. 16, № 2. P. 143-149.
84. Jiang X., Zu L., Wang Z., Cheng Y., Yang Y., Wu X. Micro-algal astaxanthin could improve the antioxidant capability, immunity and ammonia resistance of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. // *Fish Shellfish Immunol.* 2020. V. 102. P. 499-510.
85. Jun K.Y., Park S.E., Liang J.L., Jahng Y., Kwon Y. Benzo[b]tryptanthrin Inhibits MDR1, topoisomerase activity, and reverses adriamycin resistance in breast cancer cells // *Chem. Med. Chem.* 2015. V. 10, № 5. P. 827-835.
86. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms // *Redox Biology.* 2013. V. 1, № 1. P. 244–257.
87. Karnevi E., Andersson R., Rosendahl A.H. Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion // *Immunol. Cell Biol.* 2014, V. 92, № 6. P. 543–52.
88. Kaur R., Kaur-Manjal S., Rawal R.K., Kumar K. Recent synthetic and medicinal perspectives of tryptanthrin // *Bioorganic and medicinal chemistry.* 2017. V. 25, № 17. P. 254533–4552.
89. Kaulmann A., Bohn T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention // *Nutr Res.* 2014. V. 34, № 11. P. 907-929.
90. Eldahshan O.A., Singab A.N.B. Carotenoids // *Pharmacognosy and phytochemistry.* 2013. V. 2, № 1. P 225-234.
91. Kim J., Kim J., Bae J. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy // *Experimental and molecular medicine.* 2016. V. 48, № 11. e269.
92. Kimoto T., Hino K., Koya-Miyata S., Yamamoto Y., Takeuchi M., Nishizaki Y., Micallef M.J., Ushio S., Iwaki K., Ikeda M., Kurimoto M. Cell differentiation and apoptosis of monocytic and promyelocytic leukemia cells (U-937 and HL-60) by tryptanthrin, an active ingredient of *Polygonum tinctorium* Lour // *Pathol. Int.* 2001. V. 51, № 5. P. 315-325.
93. Klimek L., Sperl A. Evidence-based treatment options for allergic diseases in otolaryngology: an update // *HNO.* 2013. V. 61, № 6. P. 525- 538.

94. Ko H.C., Wang Y.H., Liou K.T., Chen C.M., Chen C.H., Wang W.Y., Chang S., Hou Y.C., Chen K.T., Chen C.F., Shen Y.C. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells // *Eur. J. Pharmacol.* 2007. V. 555, № 2-3. P. 211–217.
95. Kovalevich J. and Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology // *Methods Mol Biol.* 2013. V. 1078. 9–21.
96. Kowshik J., Baba A.B., Giri H., Reddy G D., Dixit M., Nagini S. Astaxanthin inhibits JAK/STAT-3 Signaling to abrogate cell proliferation, invasion and angiogenesis in a hamster model of oral cancer // *PLoS One.* 2014. V. 9, № 10. e109114.
97. Labbozzetta M., Notarbartolo M., Poma P. Can NF- κ B be considered a valid drug target in neoplastic diseases? Our point of view // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21, № 9. 3070.
98. Lauritzen S.P., Boye T.L., Nylandsted J. Annexins are instrumental for efficient plasma membrane repair in cancer cells // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2015. V. 45 P. 32-38.
99. Leoncini E., Nedovic D., Panic N., Pastorino R., Edefonti V., Boccia S. Carotenoid intake from natural sources and head and neck cancer: A systematic review and meta- analysis of epidemiological studies // *Cancer epidemiol biomarkers and prevention.* 2015. V. 24, № 7. P. 1003–1011.
100. Lee S. and Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy // *Cancers.* 2011. V. 3, № 4. P. 3856-3893.
101. Lee S., Kim D.C., Baek H.Y., Lee K.D., Kim Y.C., Oh H. Anti-neuroinflammatory effects of tryptanthrin from *Polygonum tinctorium* Lour in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells // *Arch. Pharm. Res.* 2018. V. 41, № 4. P. 419-430.
102. Liao X., Zhou X., Mak N., Leung K. Tryptanthrin inhibits angiogenesis by targeting the VEGFR2-mediated ERK1/2 signalling pathway. // *PLoS One.* 2013. V. 8, № 12. e82294.
103. Lin Y., Bai L., Chen W., Xu S. The NF- κ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy // *Expert. Opin. Ther. Targets.* 2010. V. 14, № 1. P. 45–55.
104. Lin Y.K., Chen H.W., Leu Y.L., Yang Y.L., Fang Y., Su Pang J.H., Hwang T.L. Indigo naturalis upregulates claudin-1 expression in human keratinocytes and psoriatic lesions // *Ethnopharmacol.* 2013. V. 145, № 2. P. 614-620.
105. Li B., Zhao J., Wang C.Z., Searle J., He T.C., Yuan C.S., Du.W. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis and paraptosis-like cell death in colorectal cancer cells through activation of p53 // *Cancer Lett.* 2011. V. 301, №2. P. 185–92.

106. Lintig J., Moon J., Lee J., Ramkumar S. Carotenoid metabolism at the intestinal barrier. // *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*. 2019. V. 185, №11. 158580.
107. Lin K.H., Lin K.C., Lu W.J., Thomas P.A., Jayakumar T., Sheu J.R. Astaxanthin, a carotenoid, stimulates immune responses by enhancing IFN- γ and IL-2 secretion in primary cultured lymphocytes in vitro and ex vivo // *Int. J. Mol. Sci*. 2015. V. 17, № 1. pii: E44.
108. Li J., Gu D., Lee S.S., Song B., Bandyopadhyay S., Chen S., Konieczny S.F., Ratliff T.L., Liu X., Xie J., Cheng J.X. Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer // *Oncogene*. 2016. V. 35, № 50. P. 6378-6388.
109. Li H., Huang N., Zhu W., Wu J., Yang X., Teng W., Tian J., Fang Z., Luo Y., Chen M., Li Y. Modulation the crosstalk between tumor-associated macrophages and non-small cell lung cancer to inhibit tumor migration and invasion by ginsenoside Rh2 // *BMC Cancer*. 2018. V. 18, № 1. 579.
110. Li K.F., Kang C.M., Yin X.F., Li H.X., Chen Z.Y., Li Y., Zhang Q., Qiu Y.R. Ginsenoside Rh2 inhibits human A172 glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest status via modulating Akt signaling pathway // *Mol. Med. Rep*. 2018. V. 17, № 2. P. 3062-3068.
111. Lv Q., Rong N., Liu L.J., Xu X.L., Liu J.T., Jin F.X., Wang C.M. Antitumoral activity of (20R)- and (20S)-Ginsenoside Rh2 on transplanted hepatocellular carcinoma in mice // *Planta Med*. 2016. V. 82, № 8. P. 705-711.
112. Lubbe A., Verpoorte R. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials // *Ind. Crops Prod*. 2011. V. 34, № 1. P. 785–801.
113. Manda G., Rojo A.I., Martinez-Klimova E., Pedraza-Chaverri J., Cuadrado A. Nordihydroguaiaretic Acid: From Herbal Medicine to Clinical Development for Cancer and Chronic Diseases // *Front Pharmacol*. 2020. V. 1, № 151. eCollection 2020.
114. Madureira P.A., Waisman D.M. Annexin A2: the importance of being redox sensitive // *Int. J. Mol. Sci*. 2013. V. 14, № 2. P. 3568-3594.
115. Mancuso C., Santangelo R. *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*: From pharmacology to toxicology // *Food Chem. Toxicol*. 2017. V. 107, № A. P. 362-372.
116. Maoka T. Carotenoids in marine animals // *Mar. Drugs*. 2011. V. 9, № 2. P. 278-293.
117. Mexia N., Koutrakis S., He G., Skaltsounis A.L., Denison M.S., Magiatis P. A Biomimetic, One-Step Transformation of Simple Indolic Compounds to *Malassezia*-Related Alkaloids with High AhR Potency and Efficacy // *Chem. Res. Toxicol*. 2019. V. 32, № 11. P. 2238-2249.

118. Mendoza M.C., Er E.E., Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation // Trends Biochem. Sci. 2011. V. 36, № 6. P. 320—328.
119. Mohiuddin A.K. Chemistry of secondary metabolites // Annals of Clinical Toxicology. 2019. V. 2, № 1. 1014.
120. Milani A., Basirnejad M., Shahbazi S., Bolhassani A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment // Br. J. Pharmacol. 2017. V. 174, № 11. P. 1290-1324.
121. Miller S.C., Huang R., Sakamuru S., Shukla S.J., Attene-Ramos M.S., Shinn P., Leer D.V., Leister W., Austin C.P., Xia M. Identification of Known Drugs that Act as Inhibitors of NF- κ B Signaling and their Mechanism of Action // Biochem Pharmacol. 2010. V. 79, № 9. P. 1272–1280.
122. Mortadza S.A., Wang L., Li D., Jiang L.H. TRPM2 channel-mediated ROS-sensitive Ca(2+) signaling mechanisms in immune cells // Front. Immunol. 2015. V. 6. 407.
123. Murai T., Maruyama Y., Mio K., Nishiyama H., Suga M., Sato C. Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration // Biol. Chem. 2011. V. 286, № 3. P. 1999–2007.
124. Naganum M. Treatment with indigo naturalis for inflammatory bowel disease and other immune diseases // Immunological Medicine. 2019. V. 42, № 1 P. 16-21.
125. Niranjana R., Gayathri R., Nimish Mol S., Sugawara T., Hirata T., Miyashita K., Ganesan P. Carotenoids modulate the hallmarks of cancer cells // Functional Foods. 2015. V. 18, № B. P. 968–985.
126. Noh K.H., Oh D.K. Production of the rare ginsenosides compound K, compound Y, and compound Mc by a thermostable β -glycosidase from *Sulfolobus acidocaldarius* // Biol. Pharm. Bull. 2009. V. 32, № 11. P. 1830–1835.
127. O'Connor S.E. Alkaloids // In: Mander L. and Lui H.W. Comprehensive natural products II. Elsevier. 2010.V. 1. P. 977–1007.
128. Panic N., Nedovic D., Pastorino R., Boccia S., Leoncini E. Carotenoid intake from natural sources and colorectal cancer: a systematic review and meta- analysis of epidemiological studies // Eur. J. Cancer Prev. 2017. V. 26, № 1. P. 27-37.
129. Park B., Lee Y.M., Kim J.S., Her Y., Kang J.H., Oh S.H., Kim H.M. Neutral sphingomyelinase 2 modulates cytotoxic effects of protopanaxadiol on different human cancer cells // BMC Complementary and alternative medicine. 2013. V. 13, № 194.
130. Park J.S., Chyun J.H., Kim Y.K., Line L.L., Chew B.P. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans // Nutr. Metab. (Lond). 2010. V. 7. 18.

131. Park H.M., Kim S.J., Kim J.S., Kang H.S. Reactive oxygen species mediated ginsenoside Rg3-and Rh2-induced apoptosis in hepatoma cells through mitochondrial signaling pathways // *Food and chemical toxicology*. 2012. V. 50, № 8. P. 2736–2741.
132. Park E.K., Lee E.J., Lee S.H., Koo K.H., Sung J.Y., Hwang E.H., Park J.H., Kim C.W., Jeong K.C., Park B.K., Kim Y.N. Induction of apoptosis by the ginsenoside Rh2 by internalization of lipid rafts and caveolae and inactivation of Akt // *Br. J. Pharmacol.* 2010. V. 160, № 5. 1212–1223.
133. Patra M.C., Choi S. Recent progress in the development of Toll-like receptor (TLR) antagonists // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2016. V. 26, № 6. P. 719-730.
134. Pathania A.S., Kumar S., Guru S.K., Bhushan S., Sharma P.R., Aithagani S.K., Singh P.P., Vishwakarma R.A., Kumar A., Malik F. The synthetic tryptanthrin analogue suppresses STAT3 signaling and induces caspase dependent apoptosis via ERK Up regulation in human leukemia HL-60 Cells // *PLoS One*. 2014. V. 9, № 11. e110411.
135. Pergola C., Jazzar B., Rossi A., Northoff H., Hamburger M., Sautebin L., Werz O. On the inhibition of 5-lipoxygenase product formation by tryptanthrin: mechanistic studies and efficacy *in vivo* // *Br. J. Pharmacol.* 2012. V. 165, № 3. P. 765-76.
136. Peng J., Zheng T.T., Li X., Lian Y., Wang L.J., Huang Y.C., Xiao H.T. Plant-derived alkaloids: the promising disease-modifying agents for Inflammatory bowel disease // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10, № 351. eCollection 2019.
137. Pott D. M., Osorio S., Vallarino J. G. From central to specialized metabolism: an overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10, № 835. eCollection 2019.
138. Qin Q.P., Zou B.Q., Hu F.L., Huang G.B., Wang S.L., Gu Y.Q., Tan M.X. Platinum (II) complexes with rutaecarpine and tryptanthrin derivatives induce apoptosis by inhibiting telomerase activity and disrupting mitochondrial function // *Med. Chem. Commun.* 2018. V. 9, № 10. P. 1639-1648.
139. Qi Z., Chen L., Li Z., Shao Z., Qi Y., Gao K., Liu S., Sun Y., Li P., Liu J. Immunomodulatory Effects of (24R)-Pseudo-Ginsenoside HQ and (24S)-Pseudo-Ginsenoside HQ on Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression and Their Anti-Tumor Effects Study // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20, № 4. pii: E836.
140. Ouyang L., Shi Z., Zhao S., Wang F.T., Zhou T.T., Liu B., Bao J.K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis // *Cell Prolif.* 2012. V. 45, № 6. P. 487–498.

141. Rajabian A., Rameshrad M., Hosseinzadeh H. Therapeutic potential of Panax ginseng and its constituents, ginsenosides and gintonin, in neurological and neurodegenerative disorders: a patent review // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2019. V. 29, № 1. P. 55-72.
142. Razina T.G., Krylova S.G., Amosova E.N., Zueva E.P., Lopatina K.A., Popov A.M., Atopkina L.N., Kozlovskaya E.P. Effect of ginsenoside Rh2 on the development of transferred tumors and chemotherapy efficiency // *Eksp. Klin. Farmakol.* 2010. V. 73, № 4. P. 27–30.
143. Ranga R.A., Phang S.M., Sarada R., Ravishankar G.A. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications // *Mar. Drugs*. 2014. V. 12, № 1. P. 128–152.
144. Raposo M.F.D.J., Morais A.M.M.B.D., Morais R.M.S.C.D. Carotenoids from marine microalgae: A valuable natural source for the prevention of chronic diseases // *Mar. Drugs*. 2015. V. 13, № 8. P. 5128–5155.
145. Roy M., Datta A. Cancer genetics and therapeutics: focus on phytochemicals // In *Springer Nature*. 2019. pp. 250.
146. Rogers S., de Souza A.R., Zago M., Iu M., Guerrina N., Gomez A., Matthews J., Baglole C.J. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent regulation of pulmonary miRNA by chronic cigarette smoke exposure // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. 40539.
147. Rosas-Saavedra C., Stange C. Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color // *Subcell. Biochem.* 2016. V. 79. P. 35–69.
148. Rundhaug J.E. and Fischer S.M. Molecular mechanisms of mouse skin tumor promotion // *Cancers*. 2010. V. 2, № 2. P. 436-482.
149. Rutz J.K., Borges C.D., Zambiazzi R.C., da Rosa C.G., da Silva M.M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food // *Food Chem.* 2016. V. 202. P. 324–333.
150. Savio L.E.B., de Andrade Mello P., da Silva C.G., Coutinho-Silva R. The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9, № 52.
151. Saini R.K., Nile S.H., Park S.W. Carotenoids from fruits and vegetables. Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities // *Food Res. Int.* 2015. V. 76, № 3. P. 735-750.
152. Saini R.K., Nile S.H., Park W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities // *Food Res Int.* 2015. V. 76, № 3, P. 735–750.

153. Sathasivam R. and Ki J.S. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries // *Mar. Drugs*. 2018. V. 16, № 1. pii: E26.
154. Sallais J., Alahari S., Tagliaferro A., Bhattacharjee J., Post M., Caniggia I. Factor inhibiting HIF1-A novel target of SUMOylation in the human placenta // *Oncotarget*. 2017. V. 8, № 69. P. 114002-114018.
155. Schenone M., Dancík V., Wagner B.K., Clemons P.A. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9, № 4. P. 232–240.
156. Seya K., Yamaya A., Kamachi S., Murakami M., Kitahara H., Kawakami J., Okumura K., Murakami M., Motomura S., Furukawa K. 8-Methyltryptanthrin-induced differentiation of P19CL6 embryonal carcinoma cells into spontaneously beating cardiomyocyte-like cells // *J. Nat. Prod.* 2014. V. 77, № 6. P. 1413-1419
157. Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A. Biological potential and medical use of secondary metabolites // *Medicines (Basel)*. 2019. V. 6, № 2. 66.
158. Seif F., Khoshmirsafa M., Aazami H., Mohsenzadegan M., Sedighi G., Baha M. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells // *Cell Commun. Signal.* 2017. V. 15, № 1. 23.
159. Smirnova N.A., Rakhman I., Moroz N., Basso M., Payappilly J., Kazakov S., Hernandez-Guzman F., Gaisina I.N., Kozikowski A.P., Ratan R.R., Gazaryan I.G. Utilization of an in vivo reporter for high throughput identification of branched small molecule regulators of hypoxic adaptation // *Chem Biol.* 2010. V. 17, № 4. P. 380–391.
160. Smirnova N.A., Haskew-Layton R.E., Basso M., Hushpulian D.M., Payappilly J.B., Speer R.E., Ahn Y.H., Rakhman I., Cole P.A., Pinto J.T., Ratan R.R., Gazaryan I.G. Development of Neh2-Luciferase reporter and its application for high throughput screening and real-time monitoring of Nrf2 activators // *Chem Biol.* 2011. V. 18, № 6. P. 752–765.
161. Shamloo B., Usluer S. p21 in cancer research // *Cancers (Basel)*. 2019. V. 11, № 8. 1178.
162. Shah M.M., Liang Y., Cheng J.J., Daroch M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products // *Front Plant Sci.* 2016. V. 7, № 531. eCollection 2016.
163. Shankar G.M., Alex V.V., Nisthul A.A., Bava S.V., Sundaram S., Retnakumari A.P., Chittalakkottu S., Anto R.J. Pre-clinical evidences for the efficacy of tryptanthrin as a potent suppressor of skin cancer // *Cell Prolif.* 2020. V. 53, № 1. e12710.

164. Shergis J.L., Zhang A.L., Zhou W., Xue C.C. Panax ginseng in randomized controlled trials: A systematic review // *Phytother. Res.* 2013. V. 27, № 7. P. 949–965
165. Shi Q., Li J., 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. V. 10, № 4. P. 1779–1785.
166. Shin K.C., Oh D.K. Classification of glycosidases that hydrolyze the specific positions and types of sugar moieties in ginsenosides // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016. V. 36, № 6. P. 1036–1049.
167. Sodrul I.M.D., Wang C., Chen X., Du J., Sun H. Role of ginsenosides in reactive oxygen species-mediated anticancer therapy // *Oncotarget.* 2018. V. 9, № 2. P. 2931–2950.
168. Souto A.L., Tavares J.F., da Silva M.S., Diniz M.F., de Athayde-Filho P.F., Barbosa Filho J.M. Anti-inflammatory activity of alkaloids: an update from 2000 to 2010 // *Molecules.* 2011. V. 16, № 10. P. 8515–8534.
169. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress // *Redox Biol.* 2017. V. 11. P. 613–619.
170. Sung S.K., Batbayar S., Lee D.H., Kim H.W. Activation of NADPH Oxidase by β -Glucan from *Phellinus baumii* (Agaricomycetes) in RAW 264.7 Cells // *Int. J. Med. Mushrooms.* 2017. V. 19, № 11. P. 957–965.
171. Surace L., Scheifinger N.A., Gupta A., van den Broek M. Radiotherapy supports tumor-specific immunity by acute inflammation // *Oncoimmunology.* 2015. V. 5, № 1. e1060391
172. Talero E., Garcia-Maurino S., Avila-Roman J., Rodríguez-Luna A., Alcaide A., Motilva V. Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13, № 10. P. 6152–6209.
173. Tacar O., Sriamornsak P., Dass C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems // *Pharmacy and Pharmacology.* 2013. V. 65, № 2. P. 157–170.
174. Takaichi S. Carotenoids in algae: Distributions, biosynthesis and functions // *Mar. Drugs.* 2011. V. 9, № 6. P. 1101–1118
175. Tsuji G., Hashimoto-Hachiya A., Kiyomatsu-Oda M., Takemura M., Ohno F., Ito T., Morino-Koga S., Mitoma C., Nakahara T., Uchi H., Furue M. Aryl hydrocarbon receptor activation restores filaggrin expression via OVOL1 in atopic dermatitis // *Cell Death Discovery.* 2017. V. 8, № 7. e2931

176. Tucker A. M., Grundt P. The chemistry of tryptanthrin and its derivatives // *Archive for organic chemistry*. 2012. V. 2012, № 1. P. 546-569.
177. Tominaga K., Hongo N., Karato M., Yamashita E. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects // *Acta Biochim. Pol.* 2012. V. 59, № 1. P. 43–47.
178. Vazquez C.G. and Quintana F.J. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor // *Immunity*. 2018. V. 48, № 1. P. 19–33.
179. Velegraki A., Cafarchia C., Gaitanis G., Iatta R., Boekhout T. *Malassezia* Infections in Humans and Animals: Pathophysiology, Detection, and Treatment // *PLOS Pathogens*. 2015. V. 11, № 1. e1004523.
180. Verstraeten S.L., Albert M., Paquot A., Muccioli G.G., Tyteca D., Mingeot-Leclercq M.P., Membrane cholesterol delays cellular apoptosis induced by ginsenoside Rh2, a steroid saponin // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018. V. 352 P. 59–67.
181. Verstraeten S.L., Role of membrane cholesterol in the apoptosis induced by ginsenoside Rh2, A steroid saponin // *Biophys.* 2018. V. 114, № 3. 271a.
182. Velu G., Palanichamy V., Rajan A. P. Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine // In: Roopan S., Madhumitha G. *Bioorganic Phase in Natural Food: An Overview*. Springer, Cham. 2018. P. 135-156.
183. Vijayapadma V., Ramyaa P., Pavithra D., Krishnaswamy R. Protective effect of lutein against benzo(a)pyrene- induced oxidative stress in human erythrocytes // *Toxicol and health*. 2014. V. 30, № 3. P. 284–293.
184. Vieceli F., Segal D., Zamboni L., Fiorentini D., Rizzo B. Caliceti C., Landi L., Hrelia S., Prata C. Specific aquaporins facilitate Nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014. V. 1843, № 4. P. 806–814
185. Vlachos C., Schulte B.M., Magiatis P., Adema G.J., Gaitanis G. *Malassezia*-derived indoles activate the aryl hydrocarbon receptor and inhibit Toll-like receptor-induced maturation in monocyte-derived dendritic cells // *Br. Assoc. Dermatol.* 2012. V. 167, № 3. P. 496–505.
186. Vorontsova J.E., Cherezov R.O., Kuzin B.A., Simonova O.B. Aryl-hydrocarbon receptor as a potential target for anticancer therapy. // *Biomedical chemistry*. 2019. V. 13, № 1. P. 36–54.
187. Wang Y.S., Li H., Li Y., Zhang S., Jin Y.H. (20S) G-Rh2 Inhibits NF- κ B regulated epithelial-mesenchymal transition by targeting annexin A2 // *Biomolecules*. 2020. V. 10, № 4. pii: E528.

188. Wang Z., Zheng Q., Liu K., Li G., Zheng R. Ginsenoside Rh2 enhances antitumour activity and decreases genotoxic effect of cyclophosphamide // *Basic and clinical pharmacology and toxicology*. 2006. V. 98, №4. P. 411–415.
189. Wang Z., Wu X., Wang C.L., Wang L., Sun C., Zhang D.B., Liu J.L., Liang Y.N., Tang D.X., Tang Z.S. Tryptanthrin protects mice against dextran sulfate sodium-Induced colitis through inhibition of TNF- α /NF- κ B and IL-6/STAT3 pathways // *Molecules*. 2018. V. 23, №5. pii: E1062.
190. Wagner-Dobler I., Rheims H., Felske A., El-Ghezal A., Flade-Schroder D., Laatsch H., Lang S., Pukall R., Tindall B.J. *Oceanibulbus indolifex* gen. nov., sp. nov., a North Sea alphaproteobacterium that produces bioactive metabolites // *Int. J. System. Evol. Microbial.* 2004. V. 54, № 4. P. 1177-1184.
191. Wang M., Yan S.J., Zhang H.T., Li N., Liu T., Zhang Y.L., Li X. X., Ma Q., Qiu X.C., Fan Q.Y., Ma B.A. Ginsenoside Rh2 enhances the antitumor immunological response of a melanoma mice model // *Oncology Lett.* 2017. V. 13, № 2. P. 681-685.
192. Wang T., Gavin H.M., Arlt V.M., Lawrence B.P., Fenton S.E., Medina D., Vorderstrasse B.A. Aryl hydrocarbon receptor activation during pregnancy, and in adult nulliparous mice, delays the subsequent development of DMBA-induced mammary tumors // *Int. J. Cancer*. 2011. V. 128, № 7. P. 1509–1523.
193. Weihong S., Lihong X., Hong L., Kailiang L., Yuxiu Z., Xiaofang L. Assessment and comparison of in vitro immunoregulatory activity of three astaxanthin stereoisomers // *Ocean Univ. China (Oceanic and Coastal Sea Research)*. 2016. V. 15. P. 283–287.
194. Wink, M. Biochemistry of plant secondary metabolism // *Annual Plant Reviews*. 2010. V. 40. – 464 p. - ISBN: 978-1-4051-8397-0
195. Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites // *Medicines*. 2015. V. 2, № 3. P. 251–286.
196. Xia T., Wang Y.N., Zhou C.X., Wu L.M., Liu Y., Zeng Q.H., Zhang X.L., Yao J.H., Wang M., Fang J.P. Ginsenoside Rh2 and Rg3 inhibit cell proliferation and induce apoptosis by increasing mitochondrial reactive oxygen species in human leukemia Jurkat cells // *Mol. Med. Rep.* 2017. V. 15, № 6. P. 3591-3598.
197. Xue Z., Li D., Yu W., Zhang Q., Hou X., He Y., Kou X. Mechanisms and therapeutic prospects of polyphenols as modulators of the aryl hydrocarbon receptor // *Food and Function*, 2017. V. 8, № 4. P. 1414–1437.

198. Yasui Y., Hosokawa M., Mikami N., Miyashita K., Tanaka T. Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines // *Chem. Biol. Interact.* 2011. V. 193, № 1. P. 79-87.
199. Yang Y., Bazhin A., Werner J., Karakhanova S. Reactive oxygen species in the immune system // *Int. Rev. Immunol.* 2013. V. 32, № 3. P. 249-270.
200. Yang C.M., Huang S.M., Liu C.L., Hu M.L. Apo-8'-lycopenal induces expression of HO-1 and NQO-1 via the ERK/p38-Nrf2-ARE pathway in human HepG2 cells // *Agric. Food Chem.* 2012. V. 60, № 6. P. 1576-1585.
201. Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation // *Gene.* 2013. V. 513, № 1. P. 1-13.
202. Yang H., Lee D.Y., Kang K.B., Kim J.Y., Kim S.O., Yoo Y.H., Sung S.H. Identification of ginsenoside markers from dry purified extract of *Panax ginseng* by a dereplication approach and UPLC-QTOF/MS analysis // *Pharm. Biomed Anal.* 201. V. 109. P. 91–104.
203. Yang Z., Zhao T., Liu H., Zhang L. Ginsenoside Rh2 inhibits hepatocellular carcinoma through β -catenin and autophagy // *Sci. Rep.* 2016. V. 19, № 6. 19383.
204. Yang S., Li X., Hu F., Li Y., Yang Y., Yan J., Kuang C., Yang Q. Discovery of tryptanthrin derivatives as potent inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase with therapeutic activity in lewis lung cancer (LLC) tumor-bearing mice // *Med. Chem.* 2013. V. 56, № 21. P. 8321-8331.
205. Yao H., Jockusch R.A. Fluorescence and electronic action spectroscopy of mass-selected gas-phase fluorescein, 2',7'-dichlorofluorescein, and 2',7'-difluorofluorescein ions // *J Phys Chem A.* 2013. V. 117, № 6. P. 1351 – 1359.
206. Ye N., Ding Y., Wild C., Shen Q., Zhou J. Small molecule inhibitors targeting activator protein 1 (AP-1) // *Med. Chem.* 2014. V. 57, № 16. P. 6930–6948.
207. Yu S.T., Chern J.W., Chen T.M., Chiu Y.F., Chen H.T., Chen Y.H. Cytotoxicity and reversal of multidrug resistance by tryptanthrin-derived indoloquinazolines // *Acta Pharmacol Sin.* 2010. V. 31, №2. P. 259-264.
208. Yurngdong J. Progress in the studies on tryptanthrin, an alkaloid of history // *Arch. Pharm. Res.* 2013. V. 36, № 5. P. 517-535.
209. Yuan X.Y., Liu W., Zhang P., Wang R.Y., Guo J.Y. Effects and mechanisms of aloperine on 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced allergic contact dermatitis in BALB/c mice // *Eur. J. Pharm.* 2010. V. 629, № 1-3. P. 147-152

210. Yi J.S., Choo H.J., Cho B.R., Kim H.M., Kim Y.N., Ham Y.M., Ko Y.G. Ginsenoside Rh₂ induces ligand-independent Fas activation via lipid raft disruption // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 385. P. 154–159.
211. Yu S.T., Chen T.M., Tseng S.Y., Chen Y.H. Tryptanthrin inhibits MDR1 and reverses doxorubicin resistance in breast cancer cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 358. P. 79–84.
213. Zhou B., Xiao X., Xu L., Zhu L., Tan L., Tang H., Zhang Y., Xie Q., Yao S. A dynamic study on reversal of multidrug resistance by ginsenoside Rh₂ in adriamycin-resistant human breast cancer MCF-7 cells // *Talanta*. 2012. V. 88. P. 345-51.