

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-1-44-51  
© Коллектив авторов, 2019

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

## ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСТРАКТА КАШТАНА КОНСКОГО С 50 % СОДЕРЖАНИЕМ ЭСЦИНА И ЕГО ДЕЙСТВИЕ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И ИЗОЛИРОВАННЫЕ МИТОХОНДРИИ

<sup>1</sup> НИЛ молекулярной фармакологии МБФ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава РФ, Россия, Москва; E-mail: tfedotcheva@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБНУ Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений, Россия, Москва

<sup>3</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, Пущино, Московская обл.

Эсцин-содержащие экстракты каштана конского в различных лекарственных формах широко используются как венотонизирующие средства, механизм действия которых и внутриклеточная мишень до сих пор не установлены. При этом эсцин применяется как активная субстанция для увеличения проницаемости мембран в экспериментах, а в последнее время установлено его цитотоксическое действие на ряд опухолевых клеточных линий. С целью повышения процентного содержания активной фармацевтической субстанции эсцина в лекарственных формах и для изучения его механизма действия был получен экстракт каштана конского (ЭКК) с 50 % содержанием эсцина. При сравнении цитотоксического действия на культуру опухолевых клеток HeLa было показано, что ЭКК и препарат сравнения эсцин в одинаковых массовых концентрациях проявляют одинаковый цитотоксический эффект. В концентрации 0,003 мг/мл оба вещества ингибируют жизнеспособность клеток HeLa более чем на 80 % в течение 24 ч. При уменьшении концентрации в 4 раза цитотоксический эффект не наблюдается. В эквивалентных цитотоксических концентрациях действие эсцина и ЭКК было изучено на изолированных митохондриях. Показано, что оба вещества увеличивают проницаемость мембраны митохондрий, вызывая их набухание, снижают кальциевую емкость митохондрий и индуцируют открытие митохондриальной поры (МРТР). Открытие МРТР приводит к клеточной гибели. Эсцин вызывает медленное и необратимое набухание митохондрий, ЭКК — быстрое и обратимое. Ингибитор МРТР — циклоспорин — полностью снимает действие обоих веществ, что указывает на участие митохондрий в реализации фармакологического действия эсцина и ЭКК.

**Ключевые слова:** сапонин; экстракт каштана конского; эсцин; циклоспорин; митохондриальная пора; мембранный потенциал; HeLa; рак шейки матки.

В настоящее время для уменьшения проницаемости сосудистой стенки при венозной недостаточности широко применяется эсцин — тритерпеновый гликозид (сапонин), содержащийся в плодах (семенах) конского каштана [1]. Кроме венотропной активности, эсцин обладает противовоспалительной и противоопухолевой активностью [2, 3]. В связи с тем, что для противоопухолевого действия экстрактов эсцина желательнее увеличить его концентрацию, в работе предпринята попытка получить экстракт каштана конского (ЭКК), с содержанием эсцина на порядок большим по сравнению с существующими экстрактами, а также провести сравнительный анализ действия полученного экстракта в сравнении с эсцином на культуру клеток HeLa и на набухание, мембранный потенциал и кальциевую емкость митохондрий как возможную мишень действия препаратов этой группы.

Механизмы действия эсцина на эндотелий сосудов так же, как и механизмы противоопухолевого дейст-

вия, все еще недостаточно выяснены и включают множество факторов: индукцию NO эндотелиальными клетками, высвобождение простагландина F<sub>2α</sub>, снижение синтеза мукополисахаридов, протеомные изменения в актиновом цитоскелете клеток [4]. Молекулярные мишени действия эсцина также множественны, в том числе к ним относятся митохондриальные сигнальные пути [5].

Действие эсцина на митохондрии, в частности на регуляцию митохондриальной поры (Mitochondrial Permeability Transition Pore, МРТР), ранее не изучалось. Также не проводилось сравнение действия чистого эсцина с экстрактами, используемыми в клинической практике. В то же время содержание эсцина в используемых препаратах колеблется в пределах 3 – 10 %, что достаточно для проявления венотонизирующего действия эсцина, но недостаточно для проявления противоопухолевого действия, в связи с чем

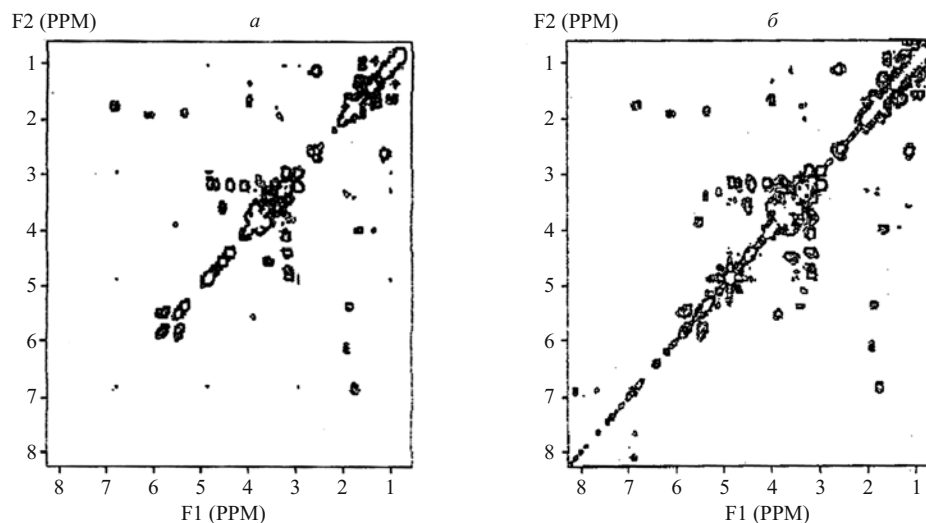


Рис. 1. Спектры  $^1\text{H}$  COSY: *a* — стандартный образец эсцина, *б* — стандартный образец ЭКК (образец 1).

изучена цитотоксическая активность полученного экстракта на опухолевых клетках.

#### Экспериментальная химическая часть

Для увеличения концентрации эсцина в экстрактах конского каштана предложен способ, описанный в патенте “Способ получения сухого экстракта семян каштана конского обыкновенного” № 2665630 от 3.09.2018. В результате из 10 кг воздушно-сухих семян каштана конского обыкновенного получают 0,7250 г сухого очищенного экстракта с содержанием суммы тритерпеновых гликозидов в пересчете на эсцин — 52,6 %. Методом ЯМР-спектроскопии в данном экстракте, кроме суммарных тритерпеновых гликозидов (52,6 %), установлено присутствие фенольных соединений (флавоноидных гликозидов) и кумаринов в минорном количестве (18 %), а также 28,5 % сахарозы и полное отсутствие жирного масла.

**Контроль качества ЭКК.** Для контроля качества сухого экстракта каштана был разработан метод анализа суммы тритерпеновых гликозидов на основе ЯМР-спектроскопии. Методом ЯМР-спектроскопии были исследованы 4 опытно-промышленные серии ЭКК, полученные в условиях производственно-экспериментального цеха ФГБНУ ВИЛАР.

**ЯМР-анализ образцов экстрактов очищенных.** Для анализа (подлинность, примеси, соотношение количеств эсцина и примесей, количественное определение) использован метод  $^1\text{H}$  ЯМР (одномерная и двумерная спектроскопия).

**Описание одномерного  $^1\text{H}$  ЯМР спектра эсцина (200 МГц,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).** В отдельных областях спектра эсцина, который является суммой ЯМР спектров всех эсцинов (тритерпеновых гликозидов), проявляются следующие фрагменты молекул. Протоны генинов, в геминальном положении к которым нет атома кислорода, дают сигналы в области спектра 0,5 – 2,2 м.д. Сигнал в области 2,4 – 2,7 м.д. относится к 2 аллильным протонам (при С-11 и С-17). Протоны генина, в геминальном положении к которым находится атом кислорода, а также гликозидные протоны дают сигналы в области 3 – 5 м.д. От 5 до 6 м.д. в спектре расположены сигналы протонов генина, в геминальном положении к которым находятся ацильные остатки (ацетильные, англоильные, тиглоильные). Интенсивный сигнал при 5,4 м.д. относится к протону генина при двойной связи (Н-12). Этот сигнал присутствует во всех спектрах тритерпенов  $\beta$ -амиринового типа. Протоны при двойной связи остатков ангеликовой и тиглиновой кислот дают сигналы при 6,1 и 6,8 м.д. соответственно.

**Двумерные  $^1\text{H}$  COSY спектры. Подлинность.** На рис. 1, *a* приведен двумерный спектр  $^1\text{H}$  COSY стандартного образца эсцина, на рис. 1, *б* — спектр стандартного образца ЭКК (образец № 1).

Положение наиболее интенсивных кросс-пигов эсцина приведено в табл. 1.

Приведенные в табл. 1 кросс-пики обусловлены взаимодействием протонов генина — пентациклического тритерпена типа  $\beta$ -амирина. Кросс-пик 1,1/2,6 относится к взаимодействию протона Н-18 и одного из протонов метиленовой группы при С-11 с вициналь-

Таблица 1

Положение интенсивных кросс-пигов в ЯМР-спектре  $^1\text{H}$  COSY раствора эсцина в  $\text{CD}_3\text{OD}$

Ось	Координаты кросс-пигов, м.д.														
F1	5,5	3,9	1,8	1,95	1,9	3,6	3,1	3,2	3,2	1,7	1,98	3,0	1,1	0,9	
F2	5,8	5,5	6,8	6,1	5,3	4,55	4,8	4,4	4,1	3,95	3,3	3,2	2,6	1,6	

ными, аллильными и гомоаллильными протонами, кросс-пик 1,95/6,1; 1,8/6,8; 5,5/5,8; 1,9/5,3 относятся к взаимодействию протонов в положениях 21, 22, 17 и 12 с вицинальными. Кросс-пик 1,9/5,3 относится к взаимодействию протона Н-12 с другими и должен присутствовать в спектрах Н,Н COSY всех тритерпенов со скелетом β-амирина. Интенсивные кросс-пики в средней области спектра Н, Н COSY относятся к взаимодействию протонов углеводного фрагмента молекулы эсцина.

На рис. 1, б приведен спектр Н,Н COSY стандартного образца ЭКК (образец 1). В спектре Н,Н COSY присутствуют все кросс-пики, что и в эсцине, и дополнительно интенсивный КП 3,8/5,5 м.д., а также кросс-пик слабой интенсивности в области 6,8 – 8,2 м.д., относящиеся к фенольным соединениям. В спектрах Н,Н COSY 3 других образцов ЭКК также хорошо видны кросс-пики, относящиеся к эсцину. Таким образом, двумерные спектры Н,Н COSY являются характеристичными и могут быть использованы для установления подлинности стандартного образца ЭКК.

**Соотношение количества эсцина и сахаров.** Присутствие сахаров и фенольных соединений, содержащих сахара, приводит к увеличению интенсивности сигналов в средней области спектра. В стандартном образце эсцина соотношение интенсивностей протонов генин в геминальном положении, к которым нет атома кислорода (область 0,5 – 2,2 м.д.), и протонов сахарной области (3,5 – 4,2 м.д.) равно 3,8. В очищенных экстрактах это отношение существенно меньше и не превосходит значения 2,8. Величина интеграла от протонов сахаров экстракта может быть найдена вычитанием интеграла гликозидных протонов стандартного образца эсцина из общего значения интеграла в области спектра 3,5 – 4,2 м.д. экстрактов. Для определения соотношения количеств эсцина и сахаров необходимо найти величину протонной единицы (п. е.) стандартного образца эсцина и п. е. сахаров. В молекулах доминирующих эсцинов в области 0,5 – 2,2 м.д. дают сигналы 42 протона и, следовательно, протонная единица может быть найдена делением значения интеграла в этой области на 42. Если в спектре эсцина установить значение интеграла в этой области, равное 42 (одно значение интеграла задается произвольно), то значение п. е. эсцина будет равно единице. При пересчете на примесь — сахарозу — определенное значение интеграла в области 3,5 – 4,2 м.д. должно быть разделено на 11 (количество протонов сахарозы при атомах углерода, дающих сигналы в этой области, что

следует из спектра раствора сахарозы в метаноле). Два протона Н-2 и Н-4 глюкозного фрагмента сахарозы дают сигналы вне этой области (смещены в более сильное поле). Относительное масс-процентное содержание сахаров в пересчете на сахарозу в стандартных образцах ЭКК определяется по формуле:

$$X(\text{масс. \%})_{\text{сах}} = 100 / (I + I'_{\text{эци}} / 0,3 \cdot I'_{\text{сах}}),$$

где  $I'_{\text{эци}}$  — нормированное значение интеграла сигналов протонов эсцина;  $I'_{\text{сах}}$  — нормированное значение интеграла сигналов протонов сахарозы;  $M_{\text{эци}}$  — молярный вес эсцина (1131,3 г/моль);  $M_{\text{сах}}$  — молярный вес сахарозы (342,3 г/моль) (табл. 2).

$$0,30 = M_{\text{сах}} / M_{\text{эци}}$$

**Количественное определение содержания эсцина** в ЭКК (образцы 1 – 4) проводили методом внешнего стандарта. В качестве стандарта использовали эсцина стандартный образец (“Sigma”, США). Полагая, что в интегральную интенсивность в области 0,5 – 2,2 м.д. вносят только протоны генина, сравнивали интегральные интенсивности сигналов протонов ЭКК и эсцина. Параметры получения и обработки спектра для стандарта и ЭКК — одинаковые. Значение параметра сигнал/шум для наиболее интенсивного сигнала превосходило 200. Для одинаковой ориентации ампулы относительно приемной катушки использовали шаблон, фиксирующий положение дна ампулы относительно ротора турбинки. Использовались калиброванные ампулы, в которых при объеме 0,6 мл высота столбика раствора равна 4,5 см.

Троекратные измерения интеграла для одного и того же раствора (ампула каждый раз извлекалась и вставлялась в ротор турбинки) дали следующие значения: 171,2; 175,4; 176,1.

Расчеты проводились по формуле:

$$X(\%) = I_{\text{ЭКК}} / I_3,$$

где  $I_{\text{ЭКК}}$  — значение интеграла ЭКК в области спектра 0,5 – 2,2 м.д.;  $I_3$  — значение интеграла эсцина в области спектра 0,5 – 2,2 м.д.

Результаты количественного определения приведены в табл. 3.

Спектры получены на ЯМР-спектрометре GEMINI 200. Навеску около 0,01 г растворяли в 0,6 мл спирта метилового-D<sub>4</sub> (3,30 м.д.), фильтровали и переносили в ампулу для снятия спектров. Время регистрации одного спектра (параметр AT) — 2 с без релаксационной

Таблица 2

Относительное содержание сахаров (в пересчете на сахарозу) в образцах ЭКК

Образец ЭКК	Сахароза, п. е.	$I'_{\text{эци}} / (0,3 \cdot I'_{\text{сах}})$	Содержание сахаров, %
1	(28,0 – 10,87)/11 = 1,56	1/(1,56 · 0,3) = 2,13	31,9
2	(33,90 – 10,87)/11 = 2,09	1/(2,09 · 0,3) = 1,59	38,6
3	(23,26 – 10,87)/11 = 1,13	1/(1,13 · 0,3) = 2,95	25,3
4	(25,52 – 10,87)/11 = 1,33	1/(1,33 · 0,3) = 2,50	28,5

задержки, количество накоплений (NT) 512. Параметры для снятия спектров COSY взяты из пакета стандартных программ. Время релаксационной задержки — 0,2 с, параметры NI = 128, NT = 64. Все спектры получены и математически обработаны при одних и тех же значениях параметров.

### Экспериментальная биологическая часть

**Определение цитотоксической активности соединений на опухолевых клетках.** Клеточная культура HeLa (эпителиоидный рак шейки матки человека) и культура фибробластов кожи крыс (ФКК) получены из биоколлекции ФГБНУ ВИЛАР (<https://pm.cytogen.ru>). Культивирование клеток осуществляли в стерильных условиях с использованием ламинарбокса ЛБ-В (Россия). Клетки инкубировали при 37 °С в условиях 5 % CO<sub>2</sub>. При культивировании клеток использовали стандартную среду DMEM с глутамином (Dulbecco's Modified Eagle medium, ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), антибиотиков гентамицина сульфата и стрептомицина сульфата (ООО “БиоХим-Фарм”, Россия). Жизнеспособность клеток определяли как описано в работе [6]. Клетки выращивали в 25 см<sup>2</sup> флаконах после достижения монослоя проводили трипсинизацию и вносили по 200 мкл клеточной суспензии 10 тыс клеток на 1 мл в лунки плоскодонного планшета “COSTAR” и добавляли исследуемые вещества — ЭКК и эсцин (“Sigma”, США) на 24 ч. После инкубации в культуральную среду на 3 ч вносили 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (МТТ) до конечной концентрации 0,5 мг/мл. Общий объем лунки составлял 200 мкл, по 2 тыс клеток на 1 лунку. Затем жидкость из лунок удаляли пипетированием и вносили по 150 мкл диметилсульфоксида на 30 мин. МТТ восстанавливается за счет действия дегидрогеназ живых клеток до водонерастворимых кристаллов формазана. Оптическую плотность образцов регистрировали при длине волны 530 нм на планшетном анализаторе иммуноферментных реакций “УНИПЛАН” АИФР-01 (Россия). Оптическую плотность контрольных образцов (без тестируемого препарата) принимали за 100 % выживаемость клеток, равную единице. Представлены данные 3 экспериментов ( $n = 3$ ).

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью програм-

мы GraphPadPrism 6. Достоверность отличий ( $p$ ) оценивали по критерию Стьюдента — Фишера.

**Выделение митохондрий.** Митохондрии получали из печени взрослых крыс-самцов линии Вистар (ИТЭБ РАН г. Пущино) стандартным методом дифференциального центрифугирования [7]. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного обращения с животными. Крыс подвергали декапитации, печень извлекали и гомогенизировали в 10 мл ледяного 10 мМ HEPES-Tris (pH 7,4) буфере, содержащем 300 мМ сахарозы, 1 мМ ЭГТА. Гомогенат центрифугировали при 600 g в течение 7 мин и 4 °С, затем супернатант центрифугировали при 9,000 g в течение 10 мин для получения осадка с митохондриями (центрифуга РС-6, Россия). Митохондриальную фракцию затем дважды промывали 10-кратным объемом холодного вышеуказанного буфера без ЭГТА. Конечный митохондриальный осадок суспендировали в промывочном буфере до получения 60–80 мг белка/мл. Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 120 мМ KCl, 1,5 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ HEPES (pH 7,25). Контрольные пробы с растворителем (96 % этиловый спирт) в каждой серии экспериментов. Представлены средние значения 3 экспериментов ± стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

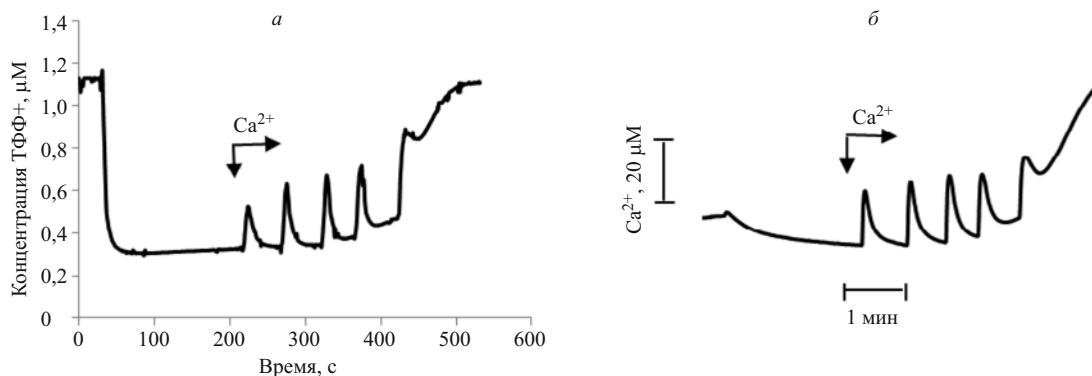
**Определение индукции митохондриальной поры (МРТР).** Для экспериментов с митохондриями эсцин был приготовлен в концентрации 10 мМ в воде для инъекций. Экстракт также хорошо растворим в воде и был приготовлен в концентрации 10 мМ, ориентируясь на молекулярную массу эсцина (м. м. 1131), и считая, что в ЭКК присутствует 50 % эсцин, что удобно для сравнения их действия.

Влияние эсцина и ЭКК на индукцию митохондриальной поры (МРТР) ионами кальция определяли с помощью измерения кальциевой емкости митохондрий как описано ранее [7]. Определение кальциевой емкости основано на измерении минимальной пороговой концентрации Ca<sup>2+</sup>, требуемой для необратимого снижения мембранного потенциала при последовательных добавках Ca<sup>2+</sup> в концентрациях 20 мкМ. Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 120 мМ KCl, 1,5 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 мМ HEPES (pH 7,25). Концентрация тетрафенилфосфония (TPP<sup>+</sup>) в кювете составляла 1 мМ. Одновременно проводили регистрацию изменений концентрации ионов кальция Ca<sup>2+</sup>-селективным электродом. Все измерения проводили при постоянном перемешивании в термостатируемой кювете объемом 1 мл при 26 °С. Набухание митохондрий

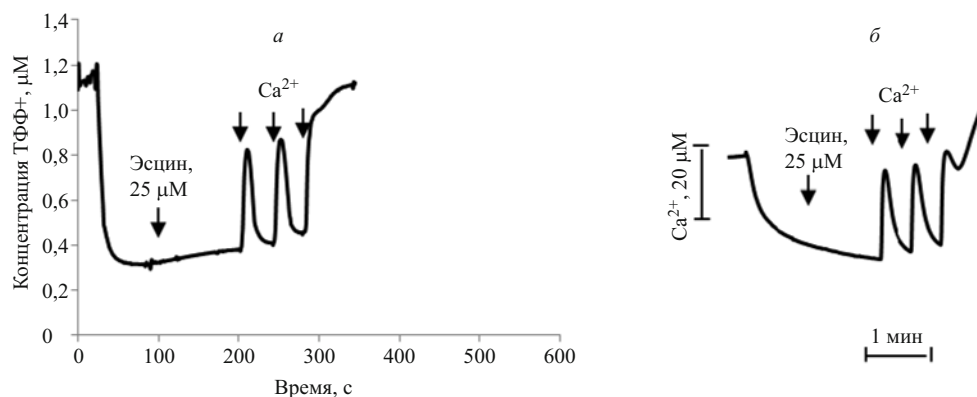
Таблица 3

### Содержание эсцина в образцах ЭКК

Образец ЭКК	Интеграл	Навеска, мг	Содержание, %
Эсцин	168,2	5,4	
1	185,8	10,9	54,7
2	189,2	10,4	58,3
3	171,1	10,4	54,0
4	174,2	10,6	52,6



**Рис. 2.** Изменение мембранного потенциала и индукция МРТР ионами кальция: *а* — изменения мембранного потенциала в ответ на добавки ионов кальция ( $\text{CaCl}_2$ ,  $20 \mu\text{M}$  каждая) в контроле, измеряемые ТФФ-селективным электродом; *б* — транспорт ионов кальция в митохондрии, измеряемый  $\text{Ca}^{2+}$ -селективным электродом.



**Рис. 3.** Влияние эсцина ( $25 \mu\text{M}$ ) на мембранный потенциал и индукцию МРТР ионами кальция: *а* — изменения мембранного потенциала в ответ на добавки ионов кальция ( $\text{CaCl}_2$ ,  $20 \mu\text{M}$  каждая), измеряемые ТФФ-селективным электродом; *б* — транспорт ионов кальция в митохондрии, измеряемый  $\text{Ca}^{2+}$ -селективным электродом.

измеряли спектрофотометрически при 540 нм. Представлены средние значения 3–5 экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

### Результаты и их обсуждение

**Цитотоксическое действие ЭКК и эсцина на клетки HeLa.** На клетки рака шейки матки человека HeLa эсцин и ЭКК оказывали одинаковое цитотоксическое действие, зависимое от концентрации (табл. 4). При инкубации 24 ч и начальной концентрации эсцина и ЭКК 1,8 и 7,5 мкг/мл соответственно заметного влияния на жизнеспособность клеток не наблюдалось.

Таблица 4  
Влияние эсцина и ЭКК на жизнеспособность клеток HeLa при инкубации в течение 24 ч

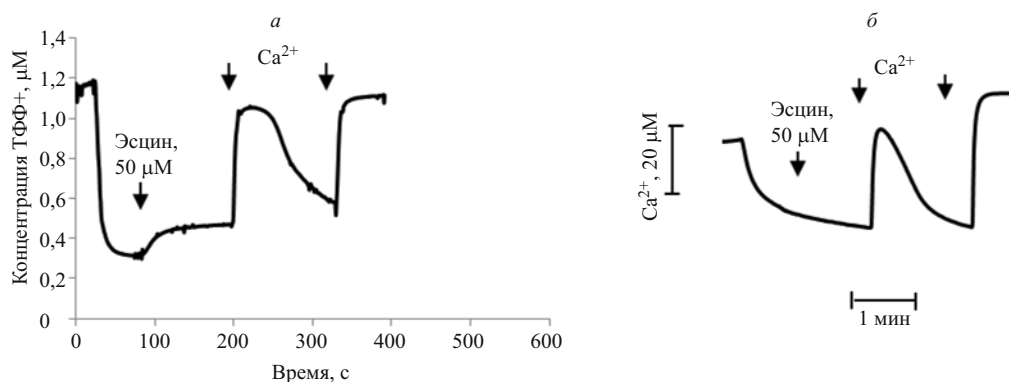
Концентрация, мкг/мл	Эсцин	ЭКК
0	$100 \pm 15,3$	$100 \pm 1,26$
1,8	$113,3 \pm 17,3$	$98,01 \pm 5,4$
7,5	$95,8 \pm 10,8$	$102,7 \pm 3,4$
30	$15,18 \pm 4,3^*$	$17,11 \pm 1,26^*$

\* Антипролиферативный эффект при  $p < 0,01$ .

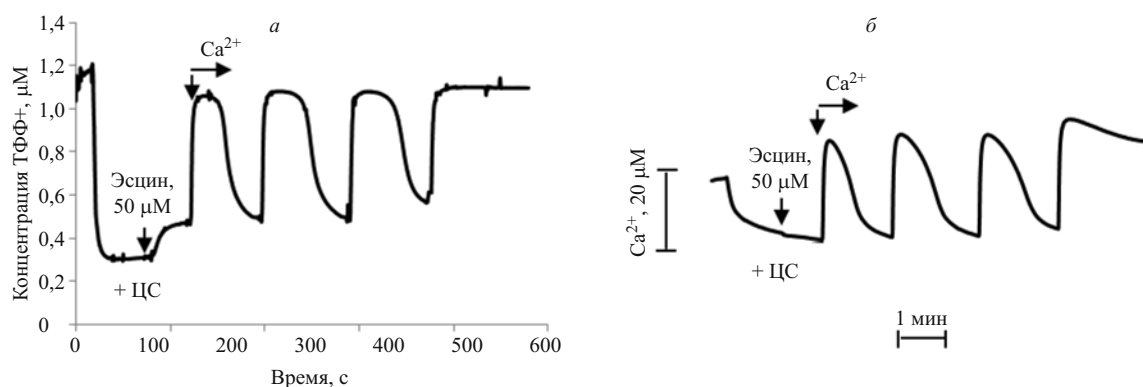
При дальнейшем увеличении концентрации в 4 раза до 30 мкг/мл ЭКК и эсцин ингибировали рост и жизнеспособность клеток более чем на 80 %, данные представлены в табл. 4. Статистически достоверной разницы между ЭКК и эсцином не выявлено.

Таким образом, в концентрации  $25 \mu\text{M}$  эсцин подавляет жизнеспособность опухолевых клеток на 85 %, а ЭКК не менее эффективен — подавляет жизнеспособность на 83 %, несмотря на то, что содержит 50 % эсцина.

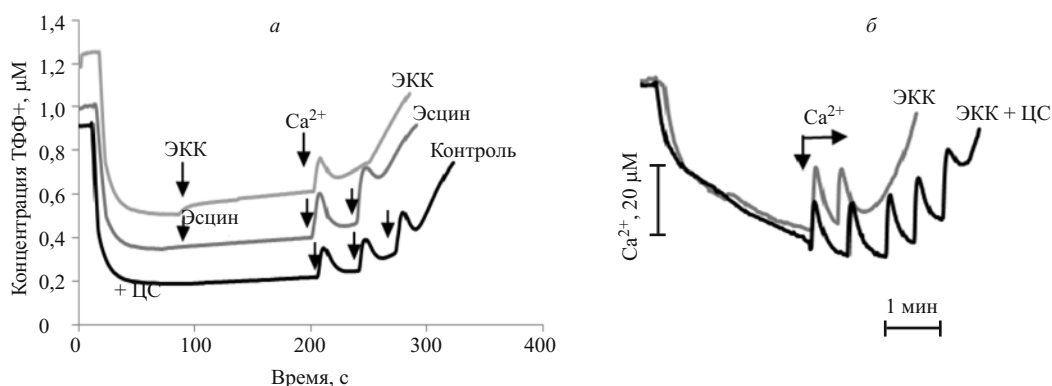
**Влияние ЭКК и эсцина на мембранный потенциал и индукцию МРТР ионами кальция.** На изолированных митохондриях печени крыс показано, что эсцин в зависимости от концентрации снижает мембранный потенциал, активирует индукцию митохондриальной поры ионами кальция, снижает скорость транспорта ионов кальция в митохондрии. Рис. 2–4 демонстрируют влияние эсцина на мембранный потенциал и индукцию МРТР ионами кальция. На рис. 2 и 3 показано влияние эсцина в 2 концентрациях — 25 и  $50 \mu\text{M}$  на мембранный потенциал и транспорт ионов кальция в митохондрии при последовательных добавках  $20 \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . При увеличении концентрации эсцина кальциевая емкость митохондрий снижается: при добавлении  $50 \mu\text{M}$  эсцина для открытия поры требуется



**Рис. 4.** Влияние эсцина (50  $\mu\text{M}$ ) на мембранный потенциал и индукцию МРТР ионами кальция: *a* – изменения мембранного потенциала в ответ на добавки ионов кальция ( $\text{CaCl}_2$ , 20  $\mu\text{M}$  каждая), измеряемые ТФФ-селективным электродом; *b* – транспорт ионов кальция в митохондрии, измеряемый  $\text{Ca}^{2+}$ -селективным электродом.



**Рис. 5.** Влияние циклоспорина А на активированную эсцином (50  $\mu\text{M}$ ) индукцию митохондриальной поры ионами кальция: *a* – мембранный потенциал; *b* – транспорт ионов кальция в митохондрии. Здесь и на рис. 6, 7: ЦС – циклоспорин.

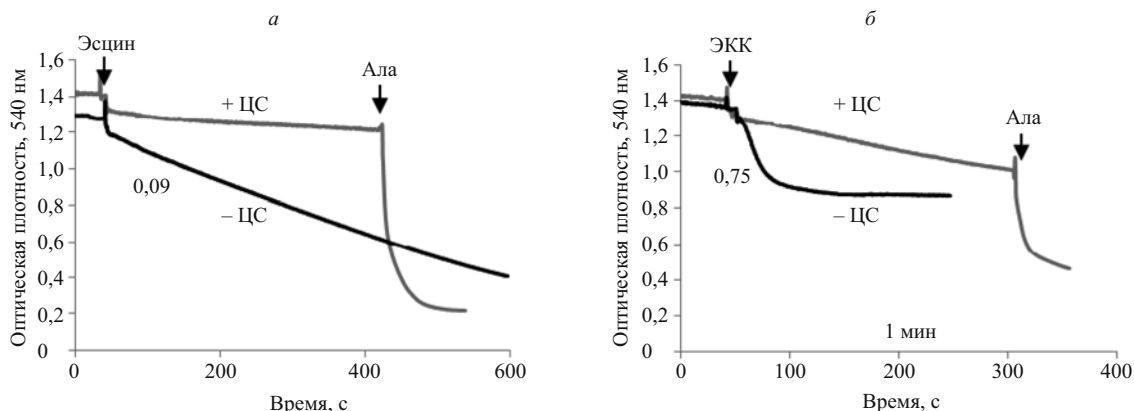


**Рис. 6.** Сравнение действия эсцина и экстракта (ЭКК) на индукцию МРТР: *a* – мембранный потенциал; *b* – транспорт ионов кальция в митохондрии. ЭКК – 50  $\mu\text{M}$ , эсцин – 50  $\mu\text{M}$ .

ся всего 1 добавка 20  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , тогда как при добавлении 25  $\mu\text{M}$  эсцина требовалось 2 добавки 20  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . В контроле, в отсутствие эсцина, для открытия поры требовалось 5 добавок (100  $\mu\text{M}$ )  $\text{CaCl}_2$ .

На рис. 4, включающем кривые изменения мембранного потенциала митохондрий и скорости транспорта ионов кальция в митохондрии, отчетливо видно, что добавление 50  $\mu\text{M}$  эсцина не только активирует

индукцию МРТР ионами кальция, но и снижает скорость транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии. Время аккумуляции одной добавки  $\text{CaCl}_2$  возрастает от 26 с в контроле до 43 с при 25  $\mu\text{M}$  эсцина и до 130 с при 50  $\mu\text{M}$  эсцина. Это видно и по времени восстановления мембранного потенциала, и по времени аккумуляции ионов кальция. На рис. 5 показано, что циклоспорин А, специфический ингибитор МРТР, восстанавли-



**Рис. 7.** Сравнение действия эсцина и экстракта (ЭКК) на набухание митохондрий: *а* — эсцин 100  $\mu\text{M}$ ; *б* — ЭКК 100  $\mu\text{M}$ . ЦС 2  $\mu\text{M}$ , Ала — аламетицин 0,005 мг, митохондрии 0,35 мг/мл.

ваит кальциевую емкость митохондрий, но не снимает торможение скорости транспорта ионов кальция в митохондриях. Возможно, снижение скорости транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях является одним из механизмов известного вазоконстрикторного действия эсцина на эндотелий.

На рис. 6 приведены кривые изменения мембранного потенциала в ответ на добавки 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии эсцина и ЭКК. При одной и той же концентрации (25  $\mu\text{M}$ ) экстракт был более эффективен по сравнению с эсцином по действию на индукцию митохондриальной поры. Также как и в пробах с эсцином, циклоспорин ингибировал открытие поры, индуцированное ЭКК и ионами кальция, увеличивая пороговые концентрации ионов кальция, необходимые для открытия поры.

В следующей серии экспериментов изучали влияние эсцина и ЭКК на набухание митохондрий. Следует отметить, что ЭКК вызывает набухание при более низких концентрациях, чем эсцин. Набухание с ЭКК идет с высокой скоростью, в 8 раз превышающей скорость набухания в присутствии эсцина. Аламетицин, пептидный ионофор, добавлен для выявления амплитуды полного набухания митохондрий. На рис. 7 приведены кривые набухания с рассчитанной скоростью, в случае эсцина она равна 0,09/мин, а в случае ЭКК — 0,75/мин.

Так как эсцин в высоких концентрациях вызывает полное набухание митохондрий, но с низкой скоростью, а ЭКК — неполное и с высокой скоростью, можно предположить, что ЭКК вызывает быстрое и обратимое набухание митохондрий, в отличие от эсцина, вызывающего медленное, но необратимое набухание. Механизм действия ЭКК на проницаемость мембран схож с эсцином, но более гибкий в отличие от эсцина — сапонина с поверхностно-активными свойствами, использующего в экспериментах для увеличения проницаемости мембран клеток и митохондрий [8].

Для подтверждения специфического действия эсцина и ЭКК на набухание митохондрий было изучено

влияние ингибитора МРТР циклоспорина на их эффекты. Было показано, что циклоспорин полностью устраняет действие эсцина и ЭКК. Тот факт, что действие эсцина и ЭКК снимается циклоспорином свидетельствует о том, что как эсцин, так и ЭКК являются специфическими регуляторами МРТР и транспорта ионов кальция в митохондриях, влияя на клеточную гибель и кальций-зависимые сигнальные пути.

Впервые получен ЭКК из семян каштана конского с высоким содержанием эсцина (> 50 %), подлинность которого подтверждена ЯМР-анализом. ЭКК и эсцин обладают цитотоксическим действием на клетки HeLa. Обнаружено специфическое регуляторное действие эсцина и ЭКК на МРТР, проявляющееся в увеличении проницаемости мембраны митохондрий и индукции поры при увеличении их концентрации: быстрое и обратимое для ЭКК и медленное необратимое для эсцина. Влияние эсцина и ЭКК на клеточную гибель опосредовано транспортом ионов кальция в митохондриях.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 19-015-00195А.

## ЛИТЕРАТУРА

1. B. Ottillinger, K. Greeske, *BMC CardiovascDisord.*, **1**(5), (2001); doi.org / 10.1186 / 1471 – 2261 – 1-5.
2. D. H. J. Cheong, F. Arfuso, G. Sethi, et al., *Cancer Let.*, **422**, 1 – 8 (2018); doi: 10.1016 / j.canlet.2018.02.027.
3. E. Harford-Wright, N. Bidère, J. Gavard, *Oncotarget*, **7**(41), 66865 – 66879 (2016); doi: 10.18632 / oncotarget.11784.
4. D. Domanski, O. Zegrocka-Stendel, A. Perzanowska, et al., *PLoS One*, **11**(10):e0164365, (2016); doi: 10.1371 / journal.pone.0164365.
5. S. Y. Yuan, C. L. Cheng, S. S. Wang, et al., *Oncol Rep.*, **37**(2), 1002 – 1010 (2017); doi: 10.3892 / or.2017.5348.
6. D. S. Stepanova, N. L. Shimanovskiy, J. Chernoff, *Pharm. Chem. J.*, **48**(12), 777 – 782 (2015); doi: 10.1007 / s11094-015-1194-z.
7. Т. А. Федотчева, Н. Л. Шимановский, А. Г. Круглов и др., *Биол. мембраны*, **28**(6), 1 – 8 (2011).
8. B. Zimmermann, *J. Physiol.*, **525**, Pt 3, 707 – 719 (2000).

Поступила 02.09.18

## PREPARATION OF HORSE CHESTNUT EXTRACT WITH 50% ESCIN AND ITS EFFECT ON THE PROLIFERATION OF TUMOR CELLS AND ISOLATED MITOCHONDRIA

T. A. Fedotcheva<sup>1,2\*</sup>, O. P. Sheichenko<sup>2</sup>, V. I. Sheichenko<sup>2</sup>, N. I. Fedotcheva<sup>3</sup>, and N. L. Shimanovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Molecular Pharmacology, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

<sup>2</sup> Scientific Center for Biomedical Technologies, All-Russia Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), Moscow, 117216 Russia

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

\* e-mail: tfedotcheva@mail.ru

Escin-containing horse chestnut extracts (HCEs) in various medicinal forms are widely used as venotonic agents, but neither mechanism of their action nor the intracellular target have yet been established. It is well known that escin is also used as an active substance to increase the permeability of membranes in experiments, and recently its cytotoxic effect on a number of various tumor cell lines has been found. In order to increase the percentage of active pharmaceutical form of escin in drugs and to study its mechanism of action, a horse chestnut extract with 50% escin content was prepared. A comparative study of the cytotoxic effect of this CHE on the culture of HeLa tumor cells, showed that this HCE and escin reference with the same mass concentrations exhibited identical cytotoxic effect. At a concentration of 0.003 mg/mL, both substances inhibited the viability of HeLa cells by more than 80% for 24 h. When the concentration was reduced 4 times, the cytotoxic effect was not observed. The effects of escin and HCE in equivalent cytotoxic concentrations were studied in isolated mitochondria. It was found that both substances increased permeability of mitochondrial membranes, caused their swelling, reduced the calcium capacity of mitochondria, and induced opening of mitochondrial pores (MPTP effect). Escin caused slow and irreversible swelling of mitochondria while HCE produced fast and reversible effect. The MPTP inhibitor cyclosporin completely removed the effect of both substances, which indicated the involvement of mitochondria in realization of the pharmacological action of both escin and HCE.

**Keywords:** saponin; horse chestnut extract; escin; cyclosporine; mitochondrial pore; membrane potential; HeLa; cervical cancer.