УДК 615.277.3:577.112.6

DOI: 10.34215/1609-1175-2020-4-68-72

Противоопухолевая активность пектинов различной молекулярной массы

Е.А. Леонтьева¹, В.В. Вихарева¹, А.А. Калитник², М.Ю. Хотимченко¹¹ Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, Россия; ² Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия

Цель: сравнительный анализ противоопухолевых свойств различных пектинов и зависимости их биологических эффектов от структурных особенностей и молекулярной массы. **Материал и методы.** Для исследования противоопухолевого действия полисахаридов использовали клеточные линии мышиной аденокарциномы молочной железы C127, карциномы шейки матки HeLa, аденокарциномы толстой кишки человека SW620, аденокарциномы молочной железы человека HTB-30 и нормальные клетки сетчатки глаза RPE. Оценку противоопухолевого и цитотоксического действия пектинов проводили с помощью теста на метаболическую активность методом МТТ-анализа и с помощью прижизненной окраски флуоресцентными ДНК-связывающими красителями Hoechst и пропидия йодидом на живые и мертвые клетки. **Результаты.** Образцы цитрусовых пектинов во всем выбранном диапазоне концентраций обладали значительным противоопухолевым эффектом по отношению клеточной линии аденокарциномы C127, снижая метаболическую активность и пролиферацию клеток, а также проявляя выраженный цитотоксический эффект. **Заключение.** Полученные в настоящем исследовании данные демонстрируют, что реакция опухолевых клеток на действие пектинов зависит, как от типа используемого соединения, так и от чувствительности самих клеток к пектинам.

Ключевые слова: аденокарцинома молочной железы, полисахариды, метаболическая активность, клеточные линии, цитотоксическое действие

Поступила в редакцию 19.02.2020 г. Принята к печати 21.09.2020 г.

Для цитирования: Леонтьева Е.А., Вихарева В.В., Калитник А.А., Хотимченко М.Ю. Противоопухолевая активность пектинов различной молекулярной массы. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2020;4:68–72. doi: 10.34215/1609-1175-2020-4-68-72

Для корреспонденции: Леонтьева Екатерина Андреевна – главный специалист департамента фармации и фармакологии Школы биомедицины ДВФО (690950, г. Владивосток, ул. Суханова, 8), ORCID: 0000-0002-5283-4539, e-mail: leonteva.eand@dvfu.ru

Antitumor activity of pectins of various molecular weights

Е.А. Leonteva¹, V.V. Vikhareva¹, A.A. Kalitnik², M.Yu. Khotimchenko¹¹ School of Biomedicine of Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia; ² A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Objective: Comparative analysis of the antitumor characteristics of different pectins and the dependency of their biological effects on the structural features and the molecular weight. **Methods:** Cell lines of the murine adenocarcinoma of the mammary gland C127, carcinoma of the cervix HeLa, adenocarcinoma of the colon SW620, adenocarcinoma of the mammary gland HTB-30 and the normal cells of the retina RPE were used to study the antitumor activity of the polysaccharides. The assessment of the antitumor and cytotoxic actions of the pectins was made by testing metabolic activity through MTT-assay and by making intravital fluorescent coloring of the live and dead cells using DNA-connecting color Hoechst and propidium iodide. **Results:** The samples of the citrus pectins in the selected concentration range had a sufficient antitumor effect on the adenocarcinoma C127 cell line by decreasing metabolic activity and the cell proliferation, and also by providing clinically important cytotoxic effect. **Conclusions:** The data got in this study demonstrates that the reaction of the cancer cells on pectins depends on the type of the connection used and also on the sensitivity of the cells to pectins.

Keywords: adenocarcinoma of the mammary gland, polysaccharides, metabolic activity, cell lines, cytotoxic action

Received: 19 February 2020; Accepted: 21 September 2020

For citation: Leonteva EA, Vikhareva VV, Kalitnik AA, Khotimchenko MYu. Antitumor activity of pectins of various molecular weights. *Pacific Medical Journal*. 2020;4:68–72. doi: 10.34215/1609-1175-2020-4-68-72

Corresponding author: Ekaterina A. Leonteva, MD, chief specialist, Department of Pharmacy and Pharmacology, School of Biomedicine, Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St., Vladivostok, 690950, Russian Federation); ORCID: 0000-0002-5283-4539, e-mail: leonteva.eand@dvfu.ru

Пектины – полисахариды высших растений, – будучи их основными структурными компонентами, выполняют множество жизненно важных для растения функций [1]. По химическому строению они представляют собой соединения гетерогенной природы. Основной составной частью молекулы пектиновых веществ считается D-галактопиранозилуруновая (D-галактуроновая)

кислота, соединенная α-1,4-гликозидными связями в нитевидную молекулу полигалактуронозой кислоты [2]. Качественный и количественный состав пектинов зависит от источников их получения – фруктов, овощей, корнеплодов и др. [3]. Пектины пищевых растений относятся к важным компонентам рациона человека и входят в группу так называемых «пищевых волокон» [4].

Сегодня пектины привлекают все большее внимание исследователей, благодаря своеобразному строению, уникальным биологическим свойствам и широкому спектру физиологической активности [5]. Эти соединения относятся к полианионам, проявляющим различную биологическую активность – антикоагулянтную, антитромботическую, противовоспалительную, противовирусную и противоопухолевую [6]. В некоторых источниках сообщается, что противоопухолевая активность модифицированных пектинов связана с взаимодействием их основного компонента галактозила с углевод-связывающим белком, который вырабатывается многими типами атипичных клеток. Биологические функции и все виды физиологической активности пектиновых полисахаридов тесно связаны с их строением в различных растениях, с периодом вегетации и рядом других факторов, обусловленных средой обитания или условиями получения клеточных культур [7].

Целью настоящего исследования стал сравнительный анализ противоопухолевых свойств различных пектинов и зависимости их биологических эффектов от структурных особенностей и молекулярной массы.

Материал и методы

Изучены образцы пектинов, различающиеся по источнику выделения, химической структуре и молекулярной массе. В работе использованы соединения, полученные и/или охарактеризованные в лаборатории фармакологии ННЦМБ им. А.В. Жирмунского РАН, а также коммерческие образцы пищевых пектинов (табл.).

Для оценки противоопухолевого и цитотоксического действия полисахаридов использовали клеточные линии мышины аденокарциномы молочной железы C127, карциномы шейки матки HeLa, аденокарциномы толстой кишки человека SW620, аденокарциномы мо-

лочной железы человека НТВ-30 и нормальные клетки сетчатки глаза RPE. Клеточные культуры были любезно предоставлены лабораториями биомедицинских клеточных технологий и фармакологии природных соединений Школы биомедицины ДВФУ. Выполняли тест на метаболическую активность методом МТТ-анализа, применяли прижизненную окраску флуоресцентными ДНК-связывающими красителями Hoechst и пропидия йодидом (на живые и мертвые клетки).

Образцы пектинов растворяли в течение суток в стерильном физиологическом растворе с последующим фильтрованием через мембранный фильтр Millex (Merck KGaA, Германия) с диаметром пор 0,22 мкм. Для исследования цитотоксической активности пектинов опухолевые линии засеивали в 96-луночный планшет (по 4,5 тыс. клеток в каждую лунку). После суточной инкубации среду DMEM (Gibco, США) из лунок осторожно убрали и добавляли свежую среду, содержащую образцы пектинов и их низкомолекулярных производных в концентрациях 100 и 200 мкг/мл и инкубировали в течение 24 часов. Для оценки цитотоксического действия полисахаридов на нормальные ткани использовали клеточную линию сетчатки глаза. Положительным контролем служил противоопухолевый препарат паклитаксел («Таксол») в рабочей концентрации 1 мкг/мл, отрицательным – интактные клетки в среде DMEM.

МТТ-тест. После 24 часов инкубации в каждую лунку планшета добавляли 20 мкл раствора МТТ 5 мг/мл (Диа-М, Россия) и инкубировали в течение 3,5 часа. Затем осторожно отбирали надосадок и добавляли 120 мкл смеси HCl-изопропанол с последующей инкубацией в течение 15 мин. Измерение производили на планшетном ридере Cytation 5 (Biotek, США) при длинах волн 590 и 620 нм. Величину метаболической активности клеток представляли в процентах относительно контроля как среднее значение от всех проведенных экспериментов (10 независимых экспериментов).

Таблица

Характеристики образцов пектинов, использованных в исследовании^а

Название	Содержание ур-новых кислот, %	Степень этерификации, %	Молекулярная масса, кДа
Пектин цитрусовый высокоэтерифицированный ^б	74,9	60,2	82,4
Пектин цитрусовый низкоэтерифицированный ^а	69,0	0	39,3
Пектин цитрусовый низкоэтерифицированный низкомолекулярный ^г	80,3	0	22,4
Пектин яблочный низкоэтерифицированный ^а	71,8	46,0	66,7
Пектин из филлоспадикса ^с	77,8	5,2	78,2

^а По результатам, полученным в лаборатории фармакологии ННЦМБ.

^б Производитель Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken. Марка Classic CS 401.

^в Получен из высокоэтерифицированного пектина путем щелочной деэтерификации.

^г Получен из низкоэтерифицированного пектина путем кислотного гидролиза.

^а Производитель Herbstreith & Fox KG Pektin-Fabriken. Марка Classic AS 401.

^с Источник – морская трава *Phyllospadix iwatensis*.

Флуоресцентное окрашивание. После 24 часов инкубации в каждую лунку планшета добавляли 10 мкл рабочего раствора красителя Hoechst и пропидия йодида для получения концентрации красителей в каждой лунке 1 мкг/мл. После 15-минутной инкубации подсчет живых и мертвых клеток проводили при помощи планшетного ридера Cytation 5 (Biotek, США) при длинах волн 390/430 и 493/636 нм, соответственно. Цитотоксическую активность оценивали по количеству мертвых клеток и выражали в процентах относительно контроля (интактные клетки) как среднее значение от всех проведенных экспериментов (10 независимых экспериментов).

Для статистической обработки полученных данных использовали программный пакет SPSS Statistics версия 23.0 для Windows. Проверку на нормальность распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различий между группами применялись непараметрические критерии: дисперсионный анализ Крускала–Уоллеса для внутригруппового сравнения и критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферони при попарном внутригрупповом сопоставлении. Для оценки различий между двумя независимыми выборками применялся критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

Результаты исследования

Образцы цитрусовых пектинов проявляли выраженное противоопухолевое действие в отношении клеточной линии мышины аденокарциномы молочной железы C127. Статистически значимое снижение метаболической активности опухолевых клеток наблюдалось при действии высокоэтерифицированного пектина в концентрации 200 мкг/мл и низкоэтерифицированного пектина в концентрациях 100 и 200 мкг/мл и низкоэтерифицированного низкомолекулярного пектина в концентрации 200 мкг/мл (рис. 1). Эти пектины в обеих концентрациях также демонстрировали выраженное цитотоксическое действие в отношении линии C127, увеличивая количество мертвых клеток на 29–47 % (рис. 2).

В то же время, совместная культивация клеток линии аденокарциномы молочной железы человека НТВ-30 с пектином из морской травы в концентрации 200 мкг/мл и с цитрусовым высокоэтерифицированным пектином в концентрации 200 мкг/мл увеличивала метаболическую активность опухолевых клеток (рис. 3). Также в полтора раза возросла метаболическая активность клеток аденокарциномы толстой кишки человека SW-620, культивируемых с пектином из филлоспадики в концентрации 200 мкг/мл (рис. 4). Достоверное увеличение активности метаболизма клеток линии карциномы шейки матки HeLa наблюдалось при совместном культивировании с низкоэтерифицированным цитрусовым пектином и его

Рис. 1. Метаболическая активность клеток аденокарциномы C127 при инкубации с пектинами:

K – контроль, I – пектин из филлоспадики, II – пектин яблочный, III – пектин цитрусовый высокоэтерифицированный, IV – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный, V – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный низкомолекулярный, VI – таксол; * различие с контролем статистически значимо.

Рис. 2. Цитотоксическая активность пектинов при совместной инкубации с клетками аденокарциномы C127:

K – контроль, I – пектин из филлоспадики, II – пектин яблочный, III – пектин цитрусовый высокоэтерифицированный, IV – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный, V – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный низкомолекулярный, VI – таксол; * различие с контролем статистически значимо.

Рис. 3. Метаболическая активность клеток аденокарциномы НТВ-30 при инкубации с пектинами:

K – контроль, I – пектин из филлоспадики, II – пектин яблочный, III – пектин цитрусовый высокоэтерифицированный, IV – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный, V – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный низкомолекулярный, VI – таксол; * различие с контролем статистически значимо.

Рис. 4. Метаболическая активность клеток аденокарциномы SW-620 при инкубации с пектинами:

K – контроль, I – пектин из филлоспадикса, II – пектин яблочный, III – пектин цитрусовый высокоэтерифицированный, IV – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный, V – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный низкомолекулярный, VI – таксол; * различие с контролем статистически значимо.

Рис. 5. Метаболическая активность клеток карциномы HeLa при инкубации с пектинами:

K – контроль, I – пектин из филлоспадикса, II – пектин яблочный, III – пектин цитрусовый высокоэтерифицированный, IV – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный, V – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный низкомолекулярный, VI – таксол; * различие с контролем статистически значимо.

Рис. 6. Метаболическая активность клеток RPE при инкубации с пектинами:

K – контроль, I – пектин из филлоспадикса, II – пектин яблочный, III – пектин цитрусовый высокоэтерифицированный, IV – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный, V – пектин цитрусовый низкоэтерифицированный низкомолекулярный, VI – таксол; * различие с контролем статистически значимо.

низкомолекулярным производным в концентрации 100 мкг/мл (рис. 5). При оценке влияния всех исследуемых пектинов в выбранном диапазоне концентраций на нормальные клетки сетчатки глаза RPE обнаружено выраженное снижение их метаболической активности (рис. 6).

Обсуждение полученных данных

Все образцы цитрусовых пектинов в выбранном диапазоне концентраций проявляли выраженное противоопухолевое действие в отношении аденокарциномы C127, снижая метаболическую и пролиферативную активность ее клеток, а также демонстрируя выраженное цитотоксическое действие. Наибольший эффект здесь продемонстрировал низкоэтерифицированный низкомолекулярный пектин. Все исследованные пектины в зависимости от химической структуры и молекулярной массы разнонаправленно влияли на метаболизм как опухолевых, так и нормальных клеток.

В то же время некоторые образцы пектинов увеличивали метаболическую активность опухолевых клеток разных линий. Эти результаты согласуются с данными других авторов, которые писали, что низкомолекулярные пектины (с массой до 20 кДа) стимулируют рост аденокарциномы Эрлиха, но те же соединения в дозе 50 мг/кг усиливают противоопухолевый эффект циклофосфана [8]. В ряде работ показано, что пектины с разной степенью этерификации, как и олигосахариды полученные из них, индуцируют апоптоз аденокарциномы HT29 толстой кишки человека [9].

Следует подчеркнуть, что уже в первых работах, посвященных противоопухолевой активности пектинов были получены неоднозначные результаты. Так, было показано, что коммерческий высокомолекулярный пектин связывался с поверхностью клеток меланомы B16-F1 *in vitro*, а после внутривенной инъекции усиливал агрегацию ее клеток и стимулировал легочное метастазирование. В то время рН-модифицированный пектин с относительно небольшой молекулярной массой ингибировал легочное метастазирование меланомы [10]. В других опытах высокомолекулярный пектин стимулировал апоптоз в андроген-чувствительных и андроген-нечувствительных раковых клетках предстательной железы человека, при этом уровень апоптоза в 40 раз превышал таковой в интактных клетках, но рН-модифицированный цитрусовый пектин в форме препарата PectaSol практически не обладал апоптотической активностью [11]. Такая противоречивость данных об эффектах пектинов и их низкомолекулярных производных, вероятно, связана со сложной химической структурой этих полисахаридов, выделенных из различных источников, и в связи с этим – со сложностью получения и стандартизации образцов, с зависимостью биологических эффектов от молекулярной массы и содержания основных моносахаридов, а также степени метил-этерификации [12]. Согласно результатам настоящего исследования все

образцы пектинов в выбранном диапазоне концентраций угнетали жизнедеятельность и пролиферацию клеток рака молочной железы мыши (аденокарцинома C127). По данным МТТ-анализа, максимальным ингибирующим эффектом обладали цитрусовые пектины. Тест на цитотоксичность показал, что исследованные соединения усиливали гибель клеток аденокарциномы C127, максимальный эффект здесь демонстрировал низкоэтерифицированный низкомолекулярный цитрусовый пектин в концентрации 100 мкг/мл.

Заключение

Полученные в настоящем исследовании данные демонстрируют, что реакция опухолевых клеток на действие пектинов зависит, как от типа используемого пектина, так и от чувствительности к ним самих опухолей. Несмотря на то, что пектиновые полисахариды привлекают все большее внимание исследователей в качестве потенциальных препаратов и биологически активных добавок в составе терапии злокачественных опухолей, особенно в торможении метастазирования, механизмы противоопухолевых эффектов этих соединений недостаточно ясны. Трудности в исследовании механизмов действия природных пектинов обусловлены, во-первых, сложностью их структуры, во-вторых, ее изменениями в процессе экстракции из растений и, в-третьих, дополнительными модификациями при структурных исследованиях и получении производных. Анализ этих факторов необходим для разработки и стандартизации оптимальных методов экстракции и модификации природных пектинов, а также правильной стратегии их применения в терапии злокачественных новообразований.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования: научное исследование (публикация статьи) выполнено при финансовой поддержке Школы биомедицины ДВФУ.

Литература / References

1. Leclerc L, Fransolet M, Cote F, Cambier P, Arnould T, Van Cutsem P, Michiels C. Heat-modified citrus pectin induces apoptosis-like cell death and autophagy in HepG2 and A549 cancer cells. *PLoS ONE*. 2015;10(3):1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0115831
2. Lara-Espinoza C, Carvajal-Millán E, Balandrán-Quintana R, López-Franco Y, Rascón-Chu A. Pectin and pectin-based composite materials: Beyond food texture. *Molecules*. 2018;23(4):1–35.
3. Голубев В.Н., Шелухина Н.П. *Пектин: химия, технология, применение*. М.: Изд-во Академии технологических наук, 1995. [Golubev VN, Shelukhina NP. *Pectin: Chemistry, technology, application*. Moscow: Academy Technologist Sciences; 1995 (In Russ).]
4. Leclerc L, Cutsem PV, Michiels C. Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Front Pharmacol*. 2013;4:128. doi: 10.3389/fphar.2013.00128
5. Оводов Ю.С., Оводова Р.Г., Попов С.В., Биогликан-иммунотерпены. Структура и свойства. *Фитотерапия, биологически активные вещества естественного происхождения*. Сыктывкар: Изд-во Коми НЦ Уро РАН, 2004:348–63. [Ovodov YuS, Ovodova RG, Popov SV, Bioglycans-immunomodulators. The structure and properties. *Herbal medicine, biologically active substances of natural origin*. Syktyvkar: Publishing House of Komi Scientific Center, Ural Branch of RAS; 2004:348–63 (In Russ).]
6. Zainal Ariffin SH, Yeen WW, Zainol Abidin IZ, Abdul Wahab RM, Ariffin ZZ, Senafi S. Cytotoxicity effect of degraded and undegraded kappa and iota carrageenan in human intestine and liver cell lines. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:508. doi: 10.1186/1472-6882-14-508
7. Оводов Ю.С., Оводова Р.Г., Попов С.В., Головченко В.В. *Новейшие сведения о пектиновых полисахаридах*. Сыктывкар: Изд-во Коми НЦ Уро РАН, 2010:37–43. [Ovodov YuS, Ovodova RG, Popov SV, Golovchenko VV. *The latest knowledge on pectin polysaccharides*. Syktyvkar: Publishing House of Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 2010:37–43 (In Russ).]
8. Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Хотимченко М.Ю., Лопатина К.А. и др. Влияние пектинов с различной молекулярной массой на развитие аденокарциномы Эрлиха и карциномы легких Льюис и эффективность циклофосфана у мышей. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010;2:32–6. [Razina TG, Zueva EP, Amosova EN, Krylova SG, Khotimchenko MY, Lopatina KA, et al. Effects of pectins of various molecular mass on growth of Ehrlich adenocarcinoma and Lewis lung carcinoma, cyclophosphane efficiency in mice. *Pacific Medical Journal*. 2010;2:32–6 (In Russ).]
9. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах. *Биоорганическая химия*. 2009;35(3):293–310. [Ovodov YuS. Modern ideas about pectin substances. *Bioorganic Chemistry*. 2009;35(3):293–310 (In Russ).]
10. Watanabe K, Reddy BS, Weisburger JH, Kritchevsky D. Effect of dietary alfalfa, pectin and wheat bran on azoxymethane or methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *J Natl Cancer Inst*. 1979;63(1):141–5.
11. Бердникова Н.В. Биомаркеры апоптоза при раке предстательной железы: роль в патогенезе, диагностическая и прогностическая значимость. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2015;2:17–23. [Berdnikova NV. Apoptotic factors in prostate cancer: role in pathogenesis, diagnostic and prognostic value. *Health. Medical ecology. Science*. 2015;2:17–23 (In Russ).]
12. Хожаенко Е.В., Хотимченко Р.Ю., Ковалев В.В., Подкорытова Е.А., Хотимченко М.Ю. Разработка методов стандартизации низкомолекулярных пектинов. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2014;2:83–7. [Khozhaenko EV, Khotimchenko RY, Kovalev VV, Podkorytova EA, Khotimchenko MY. Development of standardization methods for low molecular weight pectins. *Pacific Medical Journal*. 2014;2:83–7 (In Russ).]