



УДК 547.728.23

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ. ЧАСТЬ 2. ДЕЙСТВИЕ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ НА ВЫСШИЕ ОРГАНИЗМЫ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

© 2016 г. О. А. Лузина[#], Н. Ф. СалахутдиновНовосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 9

Поступила в редакцию 15.04.2015 г. Принята к печати 21.08.2015 г.

Усниновая кислота (УК) – доступный лишайниковый метаболит, биологическая активность которого весьма разнообразна и представляет интерес для фармакопеи. Во второй части обзора, посвященном биологической активности УК и ее производных, представлены данные о воздействии УК и ее производных на высшие организмы, эффекты, проявляемые УК на клеточном уровне, молекулярные и физико-химические аспекты ее биологической активности. В обзоре уделено внимание возможностям регулирования биологической активности УК путем изменения ее биодоступности и модификации структуры молекулы.

Ключевые слова: усниновая кислота, биологическая активность, фитотоксичность, цитотоксичность, антиоксидант, фармакокинетика.

DOI: 10.7868/S0132342316030106

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	
Фитотоксичность усниновой кислоты	
Инсектицидное действие усниновой кислоты и ее производных.....	
Токсичность усниновой кислоты по отношению к животным.....	
Клеточные эффекты	
<i>Гепатотоксичность</i>	
<i>Антимитотический эффект</i>	
<i>Генотоксический эффект</i>	

Профилирование экспрессии генов.....	
Токсичность по отношению к раковым клеткам.....	
Ферментингибирующая активность усниновой кислоты и ее производных.....	
Антиоксидантные свойства усниновой кислоты.....	
Аллергенные свойства усниновой кислоты.....	
Фармакокинетика усниновой кислоты.....	
Заключение.....	
Список литературы.....	

Часть 1 см. [1].

Сокращения: АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспаратаминотрансфераза; АФА – активные формы азота; АФК – активные формы кислорода; ИК₅₀ – концентрация вещества, необходимая для 50% ингибирования тестовой реакции; ЛД₅₀ – количество потребленного вещества, которое вызывает летальный исход у 50% организмов; ЛК₅₀, ЛК₉₀, ЛК₁₀₀ – концентрация вещества, которая вызывает летальный исход у 50, 90 и 100% организмов, соответственно; ПОЛ – перекисное окисление липидов, УК – усниновая кислота; ЭД₅₀ – доза вещества, которая обеспечивает требуемый результат у 50% организмов, DPPH – дифенил-2-пикрилгидразил-радикал; LDH – лактатдегидрогеназа; PARP – poly(ADP-Rib)-полимераза.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (383) 330-88-70; эл. почта: luzina@nioch.nsc.ru).

ВВЕДЕНИЕ

Усниновая кислота (УК) является метаболитом лишайников, она обладает широчайшим спектром биологической активности и привлекает внимание исследователей как потенциальный низкомолекулярный биорегулятор для целого ряда направлений в фармацевтике. *В первой части обзора* [1] были представлены данные о биологических эффектах УК и родственных ей соединений в отношении одноклеточных организмов. *Вторая часть обзора* посвящена влиянию УК и ее производных на

высшие организмы, изучению действия УК на клеточном уровне, молекулярным и физико-химическим аспектам ее биологической активности.

ФИТОТОКСИЧНОСТЬ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Многие лишайниковые вещества проявляют аллелопатические свойства по отношению к другим растениям. Аллелопатическая активность выражается в ингибирующем действии на прорастание семян и/или на рост растений. Данные о влиянии УК на прорастание и рост высших растений, опубликованные в литературе, несколько противоречивы. Аллелопатическое ингибирующее действие (–)-УК на прорастание семян, рост и развитие ростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) проявляется в концентрациях 0.005–0.2% [2], в работе [3] сообщается об ингибирующем действии УК (энантиомер неизвестен) на прорастание семян бобов маш и пшеницы. В то же время Нишитоба и соавт. [4] обнаружили, что УК (также неизвестный энантиомер) даже в высоких концентрациях не оказывает эффекта на проращивание семян салата-латука. Об отсутствии токсического действия УК на прорастание сеянцев сосны сообщается в работе [5], УК также не влияет на поглощение азота проростками.

В экспериментах с семенами салата (*Lactuca sativa*) и лука (*Allium cepa*) обнаружено [6], что существуют заметные различия в фитотоксическом действии энантиомеров УК. (–)-УК вызывает дозозависимое отбеливание семядольных тканей, связанное с уменьшением содержания хлорофиллов и каротиноидов в обработанных растениях. В то же время (+)-энантиомер не оказывал никакого влияния на содержание пигментов. Использование разных энантиомеров либо же их смеси может объяснить и разницу в наблюдениях предыдущих авторов. Кроме того, направление ингибирующего эффекта зависит от используемых концентраций: в более высоких концентрациях (до 1 г/л) УК ингибирует прорастание и рост пшеницы и чеснока, тогда как использование УК в малых концентрациях (0.5 мг/л) может даже увеличить скорость роста этих растений [7].

Дозозависимый фитотоксический эффект УК наблюдали также Кардарелли и соавт. [8]. УК в диапазоне концентраций от 0.05 до 0.1 мкг/мл оказывала стимулирующий эффект на деление мезофилльных протопластов табака *Nicotiana tabacum*. УК в концентрациях до 2.5 мкг/мл мало влияет на жизнеспособность клеток (>80%), в то время как

концентрации от 5 до 20 мкг/мл уменьшают количество жизнеспособных протопластов до 40%. Более высокие дозы (100–200 мкг/мл) оказались токсичными для более чем 90% клеток. Дозы УК 50 мкг/мл достаточно, чтобы полностью ингибировать прорастание семян этого растения. Кроме того, авторы работы [9] обнаружили, что токсический эффект УК на прорастание спор мха фунарии гигрометрической *Funaria hygrometrica* имеет рН-зависимый характер. Действие УК в концентрации 2.7×10^{-3} М (молярная масса УК 344.315 г/моль) не оказывает влияния на споры при рН 5 и 6, а при значениях рН 7 и 8 – только 25 и 1% спор, соответственно, жизнеспособны. Возможно, считают авторы, проникновение в споры имеет место только в виде соли уснината.

Обработка взрослых растений УК также приводит к заметным фенотипическим изменениям [10]. У томатов, выращенных в среде с добавлением 40 мкМ (+)-УК, существенно уменьшаются длина побегов, корней и площадь листовой пластинки; содержание макроэлементов снижается на 25–35, 48–55, 65–69 и 60–70% для кальция, азота, фосфора и калия соответственно, по сравнению с контролем. Отмечен дозозависимый эффект – вычисленные показатели роста (штук в корнях, удельный вес листьев и относительная скорость роста) были обратно пропорциональны концентрации (+)-УК в среде. Морфологические изменения (карликовость и деформации) корневой системы проростков подсолнечника и кукурузы индуцируются УК в концентрации 50 мкМ [11].

Сообщается, что УК вызывает закрытие устьиц в проростках сои и листьях ячменя [12] и проростках подсолнечника и кукурузы [11]. Такой процесс ведет к уменьшению потери воды на 40%, свидетельствуя о антитранспирантном действии УК. Кроме того, (–)-УК в концентрации 20–30 мМ угнетает фотосинтетическую (40%) и респираторную (до 80%) функции томатов (*Lycopersicon esculentum*), при этом наблюдается уменьшение количества внутриклеточных хлорофилла и каротиноидов [13].

Первоначально одним из возможных механизмов ингибирующего рост растений эффекта УК (исследования на клетках лука) называли увеличение под ее действием проницаемости мембран для других органических соединений [14]. Эти же авторы в другой работе об ингибирующем действии УК на укоренение черенков *Salix blanda*, *Abutilon striatum* (канатник) и *Hedera helix* (плющ обыкновенный) [15], помимо изменения проницаемости мембран, указывали на ее возможный

антимитотический эффект. Однако, позднее Толедо Маранте и соавт. [16] показали, что УК практически не проникает в семена перца, капусты, томатов и салата, оценив наблюдаемую проницаемость как ничтожную. Также сообщается [17], что УК плохо проникает в изолированные хлоропласты листьев дуба (*Quercus rotundifolia*).

Сразу несколько работ свидетельствуют о токсическом действии УК на хлоропласты. При действии УК на листья *Quercus rotundifolia* (дуб круглолистный) наблюдалось полное подавление реакции Хилла хлоропластов [18]. Это действие полностью обращалось добавлением $MnCl_2$ к суспензии хлоропластов. Поскольку известно, что ионы марганца переносят электроны, высвобождающиеся при фотолизе воды, на хлорофилл фотосистемы II P-680, то предполагается, что действие УК может быть связано с хелатированием марганца, приводящим к уменьшению его содержания в среде и, следовательно, к ингибированию транспорта электронов. Тот же механизм действия УК предполагают Орус и соавт. [19]. О фитотоксическом эффекте в отношении хлоропластов шпината сообщается в работе [20]; позднее те же авторы [21] показали, что фитотоксический эффект УК на изолированные хлоропласты шпината огородного *Spinacia oleracea* связан с ингибирующим ее действием на окислительные функции фотосистемы II, возможно, через связывание УК с вторичными донорами электронов. В публикации также отмечается, что ингибирующее действие УК не обращается добавлением марганца в систему, что противоречит данным работы [18].

Авторы работы [12] подтвердили отсутствие влияния марганца на действие УК в отношении хлоропластов коммелины обыкновенной *Commelina communis*. При этом УК в концентрации 4 мкМ полностью ингибирует в мезофильных протопластах обменные клеточные процессы с вовлечением кислорода. При повышении концентрации УК до 10 мкМ также подавляется темновое дыхание на 59%. Авторы предполагают, что УК угнетает клеточное дыхание двумя путями: ингибируя первоначально окислительное фосфорилирование и позднее – оксидазу.

Действие УК на фотосинтетические процессы в листьях шпината описывается в работе [22]. Авторы показали, что УК ингибирует флуоресценцию хлорофилла А, при этом тормозится фотосинтез в тилакоидах (клеточные структуры в растениях, подобные по функциям митохондриям). Основной функцией тилакоидной мембраны и ее инте-

гральных фотосистем является создание электрохимического потенциала. Переносчики электронов, участвующие в электронном транспорте, используют некоторую часть энергии электронов для перекачки протонов из стромы в просвет тилакоида. Протонный градиент в тилакоидах выше, чем в митохондриях, в 10 раз, создается в основном фотосистемой II. В мембране тилакоида УК ингибирует именно фотосистему II, отвечающую за синтез кислорода. Авторы установили предпочтительный сайт связывания – вероятно, восстанавливающий фрагмент первичного и вторичного хинонных акцепторов электронов, альтернативный сайт – окисляющий фрагмент хлорофилла Р680. В обоих случаях происходит необратимое связывание с сайтами, при этом связывания с кислородвыделяющим фрагментом фотосистемы II не наблюдается.

Разобщение тилакоидной мембраны и, следовательно, дестабилизация фотосинтетического аппарата отмечена под действием обоих энантиомеров УК в экспериментах с семенами салата (*L. sativa*) и лука (*A. cepa*) [6]. Однако, наблюдаемые эффекты, вызванные разными энантиомерами УК, несколько различаются. (–)-УК вызывает дозозависимое отбеливание семядольных тканей, связанное с уменьшением содержания хлорофиллов и каротиноидов в обработанных растениях. В то же время, (+)-энантиомер не оказывает никакого влияния на содержание пигментов. Авторы предполагают, что разница в действии связана с избирательной ингибирующей активностью (–)-УК в отношении протопорфириногенаоксидазы (КФ 1.3.3.4, IK_{50} 3 мкМ); IK_{50} (+)-УК в 20 раз выше – 60 мкМ.

Кроме того, авторы установили, что действие УК связано также с ингибированием фермента гидроксифенилпируватдиоксигеназы (HPPD, КФ 1.13.11.27), IK_{50} (–)-УК составила 70 нМ, (+)-УК на порядок менее активна. Известно, что HPPD катализирует синтез пластохинонов, блокирование этого процесса действием УК приводит к ингибированию синтеза каротиноидов, которые, в свою очередь, гасят избыток активных форм кислорода (АФК). То есть, обработка семян УК приводит к окислительному стрессу и дегенеративным процессам. Еще один из путей влияния УК на рост растений описали Легаз и соавт. [23], которые обнаружили, что УК связывается с ауксинами через сложноэфирную связь, что нарушает фитогормональную регуляцию роста листьев.

Таким образом, наблюдается умеренное фитотоксическое действие УК в отношении высших

растений. Эффекты, вызванные действием УК, могут быть обусловлены изменением проницаемости мембран, нарушением процессов окислительного фосфорилирования и хелатирующим действием УК по отношению к некоторым катионам. Установлено, что УК более фитотоксична для фотосинтезирующих клеток, поскольку ингибирует флуоресценцию хлорофилла А путем разобщения мембраны тилакоидов. По-видимому, существуют заметные различия в активности двух энантиомеров, при этом отмечена более высокая токсичность (–)-УК.

Наблюдаемое расхождение в результатах исследований фитотоксичности УК разными авторами объясняется, возможно, использованием УК непонятной оптической чистоты и особенностями обработки. В литературе отсутствуют данные о использовании производных УК для обработки растений.

ИНСЕКТИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ

Публикации о действии УК на насекомых и их личинки относятся к совсем недавнему времени. Эммерих и соавт. [24] в 1993 г. обнаружили, что оба энантиомера УК токсичны для личинок египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis*. Как (+)-, так и (–)-УК вызвали высокую смертность, а также значительную задержку роста и ярко выраженное затягивание личиночного периода в экспериментах длительного кормления новорожденных личинок этими веществами в концентрациях, сопоставимых или даже значительно более низких, чем их естественная концентрация в различных лишайниках, при этом (–)-УК оказалась на порядок токсичнее.

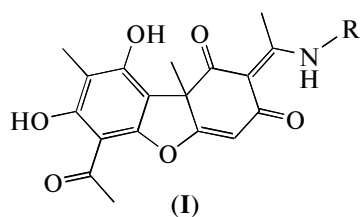
Факторы, свидетельствующие об антифидантных свойствах – доза вещества, вызывающая задержку роста насекомых на 50% (ЭД₅₀) и смертность личинок (ЛД₅₀), также различались для энантиомеров УК. Значительно более высокую антифидантную активность обнаружила (–)-УК. ЭД₅₀ составила 1.2 и 4.5 мкмоль для (–)-УК и (+)-УК, ЛД₅₀ 8.6 и 90.8 мкмоль на грамм сухого веса насекомых/личинки соответственно.

Острую токсичность энантиомеров УК определяли путем инъекции в гемолимфу личинок и показали, что эти характеристики коррелируют с их антифидантной активностью (ЛД₅₀ (–)-УК 27.5 мг/кг, (+)-УК значительно менее токсична – 71.0 мг/кг). Авторы предполагают, что оба фактора – антифидантные свойства и острая токсичность, влияют независимо, суммируя оказанное дей-

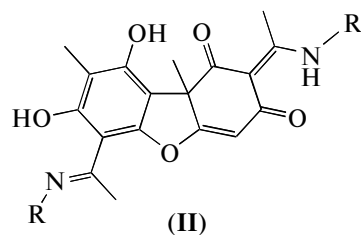
ствие. В работе [25] продемонстрировано, что энантиомеры УК токсичны для личинок комара обыкновенного *Culex pipiens* в разной степени. И (–)-, и (+)-УК оказали сильное ларвицидное действие на третьей и четвертой стадиях роста личинок, ЛК₁₀₀ составили 5 и 10 мкг/мл соответственно, а ЛК₅₀ 0.8 и 0.9 мкг/мл. Подобное действие (+)-УК наблюдалось также в отношении личинок москитов *Culiseta longiareolata* [26]. Ларвицидная активность против второй и третьей возрастной стадии личинок москитов составила ЛК₅₀ 0.48 мкг/мл (ЛК₉₀ 1.54 мкг/мл).

Исследования *in vitro* акарицидной активности УК и ее натриевой соли в отношении *Psoroptes cuniculi* проводили Шанг и соавт. [27]. Они установили, что для гибели клещей требуются довольно высокие дозы УК. Смертность составила 91, 85 и 55% при применении УК в концентрациях 250, 125 и 62.5 мкг/мл. Те же дозы натриевой соли УК были несколько эффективнее, вызывая 100, 100 и 60%-ю смертность соответственно. Интересно, что (+)-УК приводит к 100% смертности взрослых червей *Schistosoma mansoni*, облигатных паразитов, вызывающих шистоматоз, при обработке ею в концентрации 200 мкМ [28].

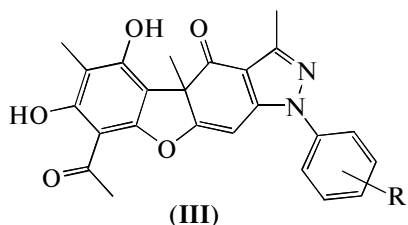
Синергетические свойства УК в качестве компонента инсектицидов на основе энтомопатогенных грибов изучались в работе [29] на гусеницах пчелиной огневки (*Galleria mellonella*), личинка колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*) и гусеницах непарного шелкопряда (*Limantria dispar*). Наиболее чувствительны к действию (+)-УК оказались гусеницы непарного шелкопряда, смертность которых при использовании 0.01% (+)-УК в препарате на основе *Metarhizium anisopliae* увеличилась в 10 раз. Для других видов насекомых и для препаратов с использованием гриба *Beauveria bassiana* синергетический эффект УК также был хорошо выражен, увеличивая смертности в 2–4 раза в сравнении с индивидуальным биопрепаратом. Авторами работы [29] также продемонстрировано в полевых экспериментах, что биологическая эффективность коммерческих биопрепаратов “Боверин” и “Битоксибацилин”, а также вирусных инсектицидных препаратов “Вирин-диприон” и “Вирин НШ” при добавлении в них 0.01% (+)-УК повышается в 2–3 раза.



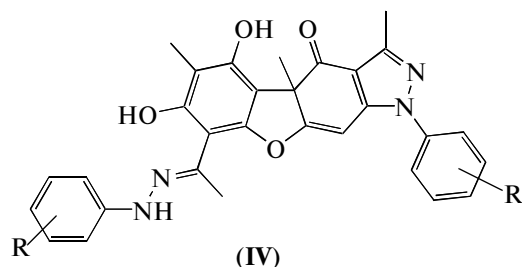
R = Me, *i*-Pr, Bn, Ph, *p*-OMePh



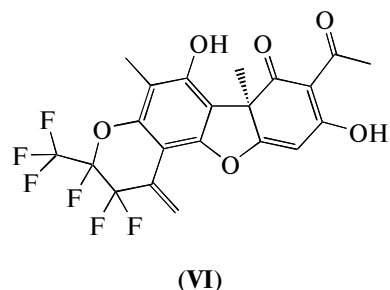
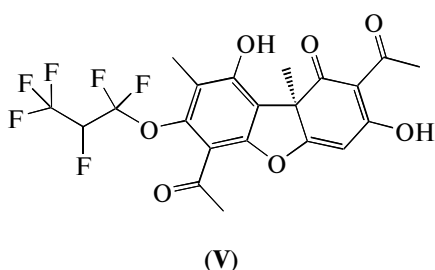
R = *i*-Pr, Bn



R = *p*-F, *p*-Cl, *p*-Br, *p*-Me, *m*-Cl, *m*-CF₃



R = *p*-F, *p*-Cl, *p*-Br, *p*-Me, *m*-Cl, *m*-CF₃



Формулы 1. Производные УК, тестированные на инсектицидную активность.

В лабораторных экспериментах на личинках второго возраста колорадского жука показано отсутствие инсектицидного действия производных (+)- и (–)-УК, полученных реакцией УК по карбонильным группам с различными аминами (соединения (I), (II) и фенилгидразинами ((III), (IV)) [30]. Большинство из 34 исследованных соединений в концентрации 0.05% не вызывают достоверного увеличения уровня смертности личинок по сравнению с монозаражением *B. bassiana* (смертность на уровне 40%). Наибольшее достоверное увеличение уровня смертности личинок вызвала смесь полифторсодержащих производных (+)-УК (соединения (V) и (VI)), полученная в реакции (+)-УК с гексафторпропеном. Хотя смертность после обработки соединениями (V) и (VI) не отличалась от контроля, составляя лишь 4%, данные соединения обладают антифидантными свойствами и, по всей видимости, вызывают кишечный токсикоз, приводя к гибели части особей и задержке развития выживших личинок. Указанные явления приводили к резкому повышению чувствительности личинок к энтомопатогенному грибу,

проникающему в тело хозяина через наружные покровы. Синергизм действия этих соединений с бактериальным инсектицидным препаратом на основе *B. bassiana* подтвержден также авторами в полевых экспериментах на личинках колорадского жука второго и третьего возраста.

Таким образом, токсическое действие УК, оказываемое на насекомых, наблюдается, как правило, на личиночных стадиях. Антифидантность и острая токсичность являются основными факторами токсического действия УК. Исследования обоих энантиомеров УК показали, что (–)-УК значительно токсичнее (+)-изомера. Большинство исследованных производных УК, модифицированных по кольцу С, не оказывают антифидантного и токсического действия на насекомых. Однако химическая модификация УК по кольцу А может приводить к существенному возрастанию антифидантного действия, что наблюдалось для полифторсодержащих производных УК.

ТОКСИЧНОСТЬ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЖИВОТНЫМ

Сообщения о токсичности УК для животных появились вскоре после установления ее структуры. Еще в 1936 г. К. Микошиба [31] определил (+)-УК как малотоксичное соединение и измерил ЛД₅₀ для млекопитающих – 25–30 мг/кг. В работе [32] установлено, что уже при введении дозы 10 мг/кг кошкам внутривенно наблюдается ускорение метаболизма, а именно гипервентиляция, увеличенное потребление кислорода и повышение температуры тела. Публикация [33] приводит данные по ЛД₅₀ для мышей, крыс, кроликов и собак. Дозы при внутривенном введении составили 25, 30, 30 и 40 мг/кг соответственно. В базе данных по токсичности веществ “Registry of Toxic Effects of Chemical Substances” (RTECS) указаны данные по острой токсичности УК для мышей и кроликов, ЛД₅₀ 838 и более 500 мг/кг соответственно.

Сведения об относительной токсичности УК для оленей приведены в работе [34]. Сравнительными экспериментами по поеданию оленями лишайника *Parmelia molliuscula*, содержащего 1.6% УК, авторы установили, что причиной их отравления была УК. Группа оленей, поедавшая лишайник после извлечения из него УК, не проявила признаки интоксикации. А вот улитки *Balea perversa*, *Chondrina clienta* и *Helicigona lapicida* не подвержены токсическому действию УК, поскольку, как выяснили авторы работы [35], они ее абсолютно не усваивают, ни в каких тканях улиток УК не обнаружена, только в экскрементах. Сообщается, что УК в обычных пищевых дозах не оказывает токсического действия на северных оленей [36]. Отсутствие токсического эффекта авторы объясняют особой микрофлорой пищеварительного тракта северного оленя, способной полностью метаболизировать УК. УК не обнаружена ни в пищеварительном тракте, ни в печени или почках, ни в экскрементах северных оленей после кормления, хотя животные ели лишайники, содержащие целых 9 мг УК на грамм пищи в течение 4 недель.

В 90-е годы XX века УК стали активно использовать в качестве компонента пищевых добавок, предназначенных для похудения. В результате чего появились сообщения об отравлении этими биодобавками, в первую очередь ассоциированные с гепатотоксичностью [37–40]. Наблюдаемые симптомы отравления – повышение уровней аланинаминотрансферазы (ГПТ, КФ 2.6.1.2), аспартатаминотрансферазы (ААТ, КФ 2.6.1.1), билирубина, темная моча, миалгия, артралгия и даже гепатоцеллюлярный некроз. Исследование [41] в 2005 г. суммировало данные по инцидентам

применения таких биодобавок и их последствиям. В публикации сообщается, что гепатотоксичность УК привела к тому, что один человек погиб, семь человек госпитализировано с печеночной недостаточностью, выявлено десять случаев химического гепатита и четыре – мягкой печеночной токсичности. Эти данные инициировали активные исследования гепатотоксического действия УК на клеточном уровне, впоследствии обобщенные в обзоре [42], опубликованном в 2008 г.

КЛЕТОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Гепатотоксичность

В работах [43–46], вошедших в обзор [42], и в более поздней работе [47] исследования токсичности УК проводились и на гепатоцитах и на изолированных митохондриях печени крыс и мышей. Анализ данных этих работ показывает, что УК может переносить протоны, минуя протонные каналы мембраны, т.е. выступает в качестве протонофора. По сути, ее действие связано с тем, что она делает мембрану проницаемой для протонов и тем самым ликвидирует протонный градиент. При этом скорость окисления даже усиливается, однако фосфорилирование не происходит. Таким образом, УК проявляет характеристики классического разобщающего агента для окислительного фосфорилирования. Минимальная концентрация, необходимая для обеспечения полного разобщения окислительного фосфорилирования в клетках, – 1 мкМ. В таком случае исчезает электрохимический потенциал и прекращается синтез АТФ. Это явление называют разобщением дыхания и фосфорилирования. Количество АТФ снижается, АДФ увеличивается, а энергия выделяется в виде теплоты. Накопление энергии в виде АТФ не происходит, отсюда наблюдаемый эффект УК как средства для похудения.

Резкий качественный скачок токсичности в расчете на образец наблюдается при переходе от дозы 2 мкмоль (полностью сохраняется жизнеспособность гепатоцитов) к дозе 5 мкмоль (практически летальная доза для гепатоцитов). Некрозный тип смерти гепатоцитов мышей был подтвержден в работах [45, 46].

Морейра и соавт. [48] приблизили исследования токсичности УК к условиям *in vivo*. Эксперименты проводили в изолированной, но перфузированной печени крыс, также авторами сделана количественная оценка метаболических эффектов УК. Установлено, что УК стимулирует потребление кислорода в концентрации 2.5 мкМ, уменьшает уровень клеточного АТФ, увеличивает цитозольное, но уменьшает митохондриальное

соотношение NADH/NAD⁺. УК сильно ингибирует глюконеогенез на трех различных субстратах (ИК₅₀ между 1.33 и 3.61 мкМ), стимулирует гликолиз, фруктолиз, гликогенолиз и аммониягенез и ингибирует уреагенез (ИК₅₀ 2.69 мкМ). Последний эффект вообще не характерен для классических разобщителей окислительного фосфорилирования. По-видимому, эффект УК в концентрациях до 2.5 мкМ отражает предпочтительно ее активность в качестве разобщителя. При более высоких концентрациях, однако, некоторые другие эффекты становятся значительными, в том числе ингибирование митохондриального электронного потока и ингибирование окисления жирных кислот со средней длиной цепи. Таким образом, УК в качестве разобщителя стимулирует катаболические метаболические пути и ингибирует анаболические.

Оказалось, что даже в низких концентрациях УК гепатотоксична, если оценивать совместное действие ее с липополисахаридами [49]. Оба агента действуют синергетически, вызывая ухудшение основных биохимических показателей клеток HepG2 (гепатобластома человека). Клетки чувствительны к воздействию УК; ЛК₅₀ составила 30 мкМ. При одновременном применении низких (нетоксичных) концентраций УК и липополисахаридов наблюдались множественные токсические эффекты (цитотоксичность, окислительный стресс, повреждение митохондрий). Бинарная смесь также изменяет экспрессию генов, отличных от тех, которые затрагиваются при индивидуальном действии УК и липополисахаридов. Кроме того, авторы установили, что обработка клеток УК увеличивает активность цитохрома P450 и вызывает митохондриальную дисфункцию.

С другой стороны, многие публикации отмечают невысокую токсичность УК *in vivo*. Авторы работы [50] установили, что для проявления симптомов отравления мышей необходима высокая доза (+)-УК. ЛД₅₀ (+)-УК при пероральном введении составила 388 мг/кг. При потреблении сублетальных доз УК у мышей наблюдались типичные проявления отравления, такие как апатия, усиленная перистальтика, озноб, одышка, оцепенение и анорексия. Прамиотин и соавт. [44] считают, что УК гепатотоксична в небольшой степени, поскольку для наблюдения изменений требуются как введение высокой дозы УК, так и длительное время воздействия. Морфологическое повреждение митохондрий и эндоплазматической сети наблюдалось после обработки животных дозой (+)-УК 200 мг/кг в день (внутрибрюшинно) в течение 5 дней, однако, существенных

изменений в активности трансаминаз сыворотки не было отмечено.

Влияние УК на различные биохимические показатели метаболизма изучали авторы работы [51] *in vivo* на крысах. Обнаружили, что введении в дозах 100, 200 и 240 мг/кг в день УК вызывает значительное увеличение уровня ГПТ и общего билирубина. В дозах выше 200 мг/кг наблюдалась отчетная дегенерация гепатоцитов. Тестирование токсического действия УК при длительном кормлении самцов крыс показало при микроскопическом исследовании гепатоцитов их дозозависимые изменения [52]. Наблюдалось значительное увеличение липидных включений, набухание митохондрий, фрагментирование шероховатой эндоплазматической сети, обилие гладкой эндоплазматической сети и фокусное повреждение мембран гепатоцитов около желчных канальцев. Кроме того, существенные изменения претерпевали биохимические показатели. При действии относительно низкой дозы УК (100 мг/кг) отмечено значительное увеличение уровня общего белка, альбумина, холестерина, липопротеинов высокой плотности и общего билирубина. При повышении дозы УК до 300 мг/кг помимо белка и билирубина возрастали показатели для ГПТ, ААТ, лактатдегидрогеназы (LDH, КФ 1.1.1.27), сахара и магния в крови. Уровень триглицеридов увеличивался незначительно.

Не всегда гепатотоксичность является основным токсическим фактором — в экспериментах на овцах наблюдается в первую очередь миотоксический эффект [53]. В крови овец после употребления высоких доз УК были значительно повышены уровни креатинкиназы (СК, КФ 2.7.3.2), ААТ и LDH. Наблюдалось заметные посмертные повреждения, в виде тяжелой дегенеративной миопатии аппендикулярного скелета.

Средняя токсическая доза (ЭД₅₀) (+)-УК для домашних овец, по оценкам авторов [53], составляет от 485 до 647 мг/кг/день в течение 7 дней. Следует отметить, что такая доза многократно превышает реально возможную для потребления.

Авторы работы [54] продемонстрировали наличие миотоксического эффекта (+)-УК на крысах. По их мнению, поскольку сердце, наряду с печенью, является органом, богатым митохондриями, оно также может служить мишенью для действия УК. В экспериментах на взрослых самках крыс при потреблении дозы (+)-УК 30 мг/кг/день авторами не наблюдались изменения в уровнях ААТ, ГПТ и тропонина-Т.

Эксперименты продемонстрировали, что УК преимущественно накапливается в печени и лег-

ких, содержание ее в сердце относительно мало. На клеточном уровне наблюдается интенсивное увеличение гранул прогибитаина, который регулирует кристаллическую структуру мембраны и обычно локализуется в мембране митохондрий. Увеличение количества гранул, полагают авторы [54], вызывается дисбалансом окислительного фосфорилирования и избыточным образованием АФК. Относительно невысокий токсический эффект УК на клетки сердца крыс показан в исследовании токсичности УК на кардиофибробластах [50]. ИК₅₀ (+)-УК составила 322 мкг/мл, что существенно выше гепатотоксической концентрации.

Таким образом, УК токсична для большинства животных и для человека. Высокая токсичность проявляется в экспериментах на клеточном уровне и заметно менее выражена в тестах *in vivo*, для интоксикации животного необходимо хроническое потребление УК в высоких дозах, при этом преимущественно поражаются энергопотребляющие органы. Основным механизмом токсичности УК на клеточном уровне связан с ее действием как митохондриального разобщителя. Совокупность результатов говорит о том, что окислительный стресс, возникающий при митохондриальном разобщении, занимает одно из центральных мест в индуцированной УК гепатотоксичности. Окислительный стресс, вызванный УК, может привести к нарушению энергетического метаболизма, метаболизма аминокислот, липидов и нуклеотидов. Под действием УК уменьшается продукция АТФ и ускоряется термогенез с повышенным потреблением калорий из-за разобщающего эффекта окислительного фосфорилирования.

Антимитотический эффект

Многие метаболиты растений при определенной концентрации и определенном режиме их введения в организм нарушают деление (митоз) клеток. Эффект ингибирования деления клеток наблюдается на разных клеточных мишенях — ДНК, различных ферментах (в частности, киназах) и других белках. Как правило, антимитотический эффект характеризуют митотическим индексом, просчитав в поле зрения клетки с видимыми хромосомами и разделив это число на общее число клеток в поле зрения. Еще в 1948 г. было замечено, что обработка УК ингибирует деление клеток икры морских ежей [55]. Более развернутые исследования показали [56], что достаточно концентрации 10 мкг/мл уснина натрия чтобы полностью ингибировать репликацию ДНК в клетках икры морских ежей, и даже при использовании 1 мкг/мл этот процесс частично подавляется. Происходит,

кроме того, полное прекращение образования аппарата веретена, хотя при воздействии УК на уже образованное веретено не наблюдается какого-либо эффекта. Влияние (+)-УК на формирование аппарата веретена упоминается также в работе [57]. Авторы отмечают, что после употребления мышами (+)-УК в разовой дозе 100 или 200 мг/кг уровень ДНК не изменяется при наблюдаемом увеличении уровня микроядерных полихроматических эритроцитов. По-видимому, (+)-УК может блокировать процесс трансляции ДНК косвенно путем нарушения биосинтеза РНК.

Антимитотический эффект УК продемонстрировали Кардарелли и соавт. [8] в экспериментах на разнообразных клеточных культурах. Обнаружено, что УК резко тормозит пролиферацию протопластов табака (*Nicotiana tabacum*) даже при очень низких концентрациях, которые не являются токсичными для 90% клеток. При относительно высоких концентрациях УК (2.5–5 мкг/мл) способность протопластов к пролиферации полностью угнетается. Однако, в концентрации в 5 раз меньшей, чем необходимо для достижения частичного ингибирования пролиферации (0.05 мкг/мл), УК, напротив, обладает стимулирующим действием на эту функцию протопластов. Антимитотический эффект наблюдался авторами также в отношении опухолевых клеток человека. УК в концентрации 50 мкг/мл ингибирует пролиферацию всех испытанных клеточных линий, хотя и не полностью (40–70%). При увеличении экспозиции клеток с УК до 46 ч, степень ингибирования увеличивается до 70–90%. Как оказалось, клеточная культура Ishikawa подвергается 90%-му подавлению роста и при воздействии на порядок меньшей дозы УК (5 мкг/мл), если время воздействия продлить до 46 ч.

Митотический индекс уменьшается при действии (+)-УК в концентрациях 100, 200, 300 мкг/мл на икру морских ежей [58]. Авторы также подтвердили, что ингибирующий эффект усиливается дозозависимо, а также при увеличении времени обработки с 12 до 24 ч. В работе [59] сообщается об антипролиферативном эффекте УК в отношении клеточной культуры фибробластов мыши L-929, рост клеток ингибируется на 50% при воздействии УК в концентрации 5.5 мкг/мл. Еще активнее УК подавляет рост опухолевых клеток K-562 (клеточная линия лейкемии человека) — ИК₅₀ равна 1.4 мкг/мл. О влиянии УК на образование и/или стабилизацию микротрубочек (белковая структура, участвующая в сегрегации хромосом во время митоза) сообщается в публикации [60]. Обработка клеток рака молочной железы MCF7 и рака легкого H1299 УК в концентрации 29 мкМ не приводит к каким-либо морфологиче-

ским изменениям в микротрубочках или увеличению митотического индекса. В экспериментах на линии кератиноцитов человека HaCaT показано, что воздействие (+)-УК на клеточную культуру связано с цитостатическим, а не цитотоксическим эффектом [61]. Высвобождение LDH в культуральную среду осталось неизменным по сравнению с контрольной группой, что говорит о сохранении целостности мембраны. (+)-УК тормозит рост клеток с ИК₅₀ 2.1 мкМ, что свидетельствует о высокой антипролиферативной активности.

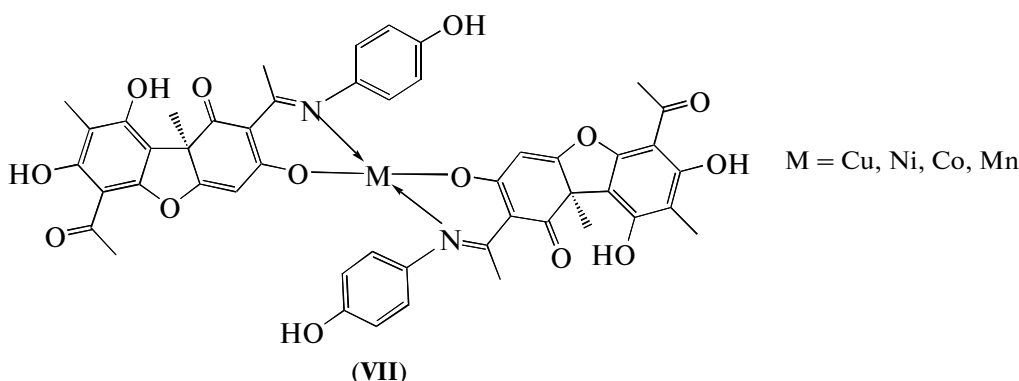
Генотоксический эффект

Ряд публикаций посвящен изучению способности УК воздействовать конкретно на ДНК, как клеточную мишень, в тестах на генотоксичность *in vitro*. Большинство исследователей подтвердили отсутствие генотоксичности УК: в тесте Эймса (микросомный анализ на мутагенез) [62], методом ДНК-комет на бактериях [63], методом хромосомных aberrаций и микроядерным тестом на культивированных человеческих клетках крови (5 линий) при действии УК в концентрациях до 200 мкг/мл [64]. Также установлено, что УК не повреждает ДНК некоторых опухолевых клеточных культур человека [65]. Результаты, полученные Копарал и соавт. [66] на лимфоцитах человека *in vitro* в микроядерном тесте с блокированием цитокинеза, показывают, что оба энантиомера УК не генотоксичны, о чем свидетельствует отсутствие индукции микроядер. Однако, результаты работы [63] продемонстрировали, что УК индуцирует повреждение ДНК в концентрации 60 и 120 мкг/мл в исследовании *in vitro*, выполненном методом ДНК-комет. Хотя генотоксичный эффект УК не

наблюдался этими же авторами в микроядерном тесте на клетках V79.

Генотоксические эффекты также не наблюдались в экспериментах *in vivo* [63] при потреблении мышами УК в дозах 25, 50, 100 и 200 мг/кг, контроль осуществлялся микроядерным тестом и тестом ДНК-комет. Не обнаружено заметного изменения в содержании белков, РНК и ДНК в сперматозоидах мышей даже при длительном (35 дней) пероральном потреблении (+)-УК в дозах 200 мг/кг/день [57]. Косвенно отсутствие генотоксического эффекта подтвердили в работе [67]. Авторы пытались снизить фертильность мышей добавлением в рацион УК; фертильность снизить не удалось, однако, в работе сообщается, что у следующего поколения генетических дефектов не наблюдалось.

При отсутствии генотоксического эффекта, УК проявляет сильный антимуtagenный эффект [63]. При комбинированном введении УК и алкилирующего агента – метилметансульфоната (MMS) значительно снижается частота образования микроядер и повреждений ДНК *in vitro* и *in vivo*, по сравнению с эффектом от обработки только алкилирующим агентом. Хотя механизмы, лежащие в основе защитного эффекта УК, авторами не выяснены, возможно, они обусловлены антиоксидантной активностью этого метаболита. Комплексы енаминов на основе УК (VII) с медью, кобальтом, никелем и марганцем, а также сами свободные лиганды в дозах 20, 40, 60, 80 и 100 мкг/образец проявили сильный антимуtagenный эффект на клеточных культурах после воздействия на них известных мутагенов: азида натрия, 9-аминоакридина (9-AA) и метилнитронитрозогуанидина (MNNG) [68].



Формулы 2. Производные УК, проявившие антимуtagenный эффект.

В работе [69] отсутствие генотоксического эффекта УК было подтверждено теоретическими расчетами. Авторы показали, что энергии генерированного пульс-радиолизом триплетного состояния УК (142.6 кДж/моль) недостаточно для генерирования триплета тимина (163.3 кДж/моль), а значит и для повреждения ДНК.

Профилирование экспрессии генов

Воздействие УК на генетический аппарат организмов может происходить опосредованно, путем изменения экспрессии генов. Ряд работ посвящен этой проблеме. В публикации [54] сообщается, что дозы УК 30 мг/кг/день недостаточно для влияния на регуляцию экспрессии генов крыс. Уровни экспрессии 542 генов, связанных с митохондриальной структурой и функцией печени самок мышей, исследовался в работе [70]. Значительное влияние УК на экспрессию нескольких генов имело место только в дозе 600 мкг/мл. Наблюдалась существенная индукция генов, ассоциированных с комплексами с I по IV цепь транспорта электронов. Кроме того, некоторые гены, участвующие в окислении жирных кислот, цикле Кребса, апоптозе, а также мембранные транспортеры (гены транспорта через митохондриальную мембрану) были сверхэкспрессированы. Общий уровень апрегуляции (up regulation) 1.2–1.8. Однако не наблюдалось изменения уровня экспрессии гена марганецсупероксиддисмутазы, индикатора окислительного стресса в митохондриях. Гены TFAM (транскрипционный фактор) и NRF-1 (ядерный респираторный фактор), обычно даунрегулируемые (down regulation) при митохондриальном биогенезе — процессе, запускаемом в ответ на окислительный стресс, также не были затронуты. Таким образом, из-за ограниченных данных трудно соотносить увеличение уровня экспрессии генов после обработки мышей УК с митохондриальным биогенезом. Апрегуляция генов комплексов I–IV может служить компенсаторным механизмом для поддержания протонного градиента внутренней митохондриальной мембраны. Кроме того, индукция окисления жирных кислот и цикла Кребса может быть адаптивным ответом на разобщение митохондрий.

Саху и соавт. [49] тестировали экспрессию 84 генов в ответ на воздействие УК. В публикации сообщается об апрегулировании генов CCL21 (воспалительный ответ), CCNC (пролиферация и карциногенез) и UGT1A4 (ДНК повреждения и репарация) и снижении экспрессии генов CSF2 (воспаление), CYP7A1 и CYP2E1 (оба ассоциированы с окислительным стрессом). Профили про-

дукции дифференциально регулируемых и экспрессируемых белков в печени крыс после обработки УК анализировали авторы работы [71] после обработки крыс УК в дозах от 100 до 240 мг/кг в день. Результаты экспериментов демонстрируют отличия в продукции 10 белков в крысах, обработанных УК, по сравнению с контролем. Эти белки связаны с окислительным стрессом, липидным обменом, а также некоторыми другими молекулярными механизмами. Среди чувствительных к воздействию УК белков, шесть активируются, в том числе белок теплового шока HSP60, глюкозорегулирующий белок 75 (Grp75), MAWDBP (белок, активируемый в ряде болезненных процессов), альбумин, белок Аро А-I, регулирующий уровень липопротеинов высокой плотности, и ферритин легкой цепи. В общей сложности четыре белка даунрегулируются, а именно транскретин, обеспечивающий транспорт тироксина и ретинола, катехол-О-метилтрансфераза (COMT, КФ 2.1.1.6), белок-шаперон ERp29 (белок стресса эндоплазматического ретикулама) и пероксиредоксин. На основании полученных данных авторы предполагают, что не только митохондрии, но и эндоплазматический ретикулум могут быть основными целями УК-индуцированной гепатотоксичности.

Таким образом, УК обладает сильным антимитотическим эффектом, ингибируя рост различных клеточных культур. Однако эффект достигается не путем воздействия на ДНК. Отсутствие генотоксического эффекта подтверждено для обоих энантиомеров УК и для некоторых их производных. И на клеточном уровне, и в экспериментах на животных УК проявляет сильный антимутагенный эффект. Воздействие УК на генетический аппарат организмов выражается путем изменения экспрессии генов, связанных с окислительным стрессом и липидным обменом.

Токсичность по отношению к раковым клеткам

Впервые противораковая активность УК была обнаружена в 1975 г. В поисках растительных источников противораковых веществ Купчан и соавт. [72] исследовали экстракт *Cladonia leptoclada*, обладающий такими свойствами. Мажорным компонентом экстракта оказалась (–)-УК. Эксперименты, проведенные на мышах с карциномой Льюиса, показали, что при потреблении (–)-УК, выделенной в индивидуальном виде, в дозах 20–200 мг/кг выживаемость мышей заметно повышается (135–152%).

Впоследствии эксперименты по изучению противораковых свойств УК проводили в основ-

ном *in vitro*. Так, авторы работы [73] установили, что (–)-УК обладает умеренным цитотоксическим действием на опухолевые клеточные культуры мыши и человека. ИК₅₀ составила 17.4, 35.2, 45.9, 51.7, 23.8 и 19.7 мкМ для опухолевых линий L1210 (лимфолейкоз), 3LL (карцинома Льюиса), DU145 (карцинома простаты), MCF7 (аденокарцинома молочной железы), K-562 (хронический миелобластоз) и U251 (глиобластома). Практически такие же ингибирующие рост концентрации для (+)-энантиомера УК приведены в публикации [16], ИК₅₀ (+)-УК для линий U-937 и HL-60 (обе – моноцитарный лейкоз человека) составила 14.3 мкМ. Умеренную цитотоксическую активность против клеток саркомы 180 и опухолевых клеток Ehrlich проявила (+)-УК, выделенная из *Usnea fasciata* [74]. В работе [75] сообщается о действующих концентрациях (ИК₅₀) УК от 15 до 44 мкМ. (+)-УК проявляет значительную противоопухолевую активность также в отношении клеток HeLa (карцинома шейки матки) с ИК₅₀ 14.8 мкМ [59], к воздействию УК в концентрациях до 100 мкМ чувствительны опухолевые клетки гепатобластомы человека HepG2, ЛК₅₀ составила 30 мкМ [49].

Авторы работы [76] проводили исследования на 9 линиях опухолевых клеток человека: A2780 (карцинома яичника), HeLa (аденокарцинома шейки матки), MCF-7, SK-BR-3 (обе – аденокарцинома груди), HT-29 (аденокарцинома толстой кишки), HCT-116 p53+/+, HCT-116 p53–/–, (карцинома толстой кишки человека p53 дикого типа, а также p53-ноль HCT-116 сублиния), HL-60 (промиелоцитарный лейкоз) и Jurkat (Т-клеточная лейкемия). Значения ИК₅₀ УК для исследованных клеточных линий составили от 48.5 (HL-60) до 199.2 мкМ (SK-BR-3).

Во всех вышеописанных публикациях подтверждена цитотоксическая активность УК в отношении опухолевых клеток без сравнения с ее токсичностью для здоровых клеток. Исследователи работы [77] показали, что (+)-УК проявляет высокую токсичность не только в отношении опухолевых культур: ИК₅₀ для клеточной линии MM98 (злокачественная мезотелиома) составляла от 23 до 64 мкМ, для A431 (карцинома вульвы) от 39 до 72 мкМ, но и по отношению к клеткам HaCaT (кератиноциты) колебалась в том же диапазоне 35–76 мкМ. То есть токсичность УК для опухолевых и здоровых клетках была сравнима. Та же тенденция наблюдалась авторами работы [78]. Хотя УК обладает цитотоксическим действием против клеточных линий меланомы

UACC-62 и B16-F10 (ИК₅₀ 91.5 и 137 мкМ соответственно), но, поскольку здоровые клетки также показывают заметную чувствительность к УК (ИК₅₀ 120.2 мкМ), можно считать, что (+)-УК явно не проявляет противораковую активность в отношении меланомы.

В пользу наличия противоракового эффекта УК свидетельствуют работа [63], в которой показано, что цитотоксические концентрации УК в отношении здоровых клеток V79 заметно выше, чем для опухолевых A549 (эпителиальный рак легких человека). Брисделли и соавт. [79] наблюдали эффективное действие УК на три линии клеток рака человека: MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HeLa (аденокарцинома шейки матки) и HCT-116 (рак толстой кишки). Измеренная ИК₅₀ УК составила 75.7, 23.7 и 17.7 мкМ соответственно. Авторами приведена для сравнения токсичность УК к нормальным клеткам линии NIH-3T3 (мышинные эмбриональные фибробласты), которая оказалась существенно ниже: ИК₅₀ >100 мкМ.

Сравнительное исследование цитотоксичности энантиомеров УК проводили в работе [66]. МТТ-анализ на опухолевой клеточной линии A549 показал, что (+)-УК более токсична, чем (–)-УК (ЭД₅₀ 6.25 и 12.5 мкг/мл соответственно). Цитотоксичность обоих энантиомеров УК для клеточной культуры V79 (здоровые клетки) была ниже, чем для A549. (–)-УК в концентрациях 6.25, 12.5 и 25 мкг/мл не оказала цитотоксического действия, те же концентрации (+)-УК оказались в небольшой степени, но токсичны. При этом, в работе приведены данные о том, что (–)-УК более эффективно вызывает апоптоз, чем (+)-энантиомер. Частота апоптозных клеток при концентрации (+)-УК 10 мкг/мл составила 2.0 на 1000, для (–)-УК – 8.5 на 1000. При повышении концентрации УК растет частота появления апоптозных клеток, но несколько нивелируется разница в действии ее энантиомеров.

В исследованиях [80, 81] сообщается, что нет никакого существенного различия в потенциале двух энантиомеров УК в отношении человеческих раковых клеток. Исследовались две клеточные линии разного происхождения: одна из них с неактивным p53 – рак молочной железы T-47D, другая p53-зависимая – рак поджелудочной железы Саран-2. Белок p53 выполняет в организме функцию супрессора образования злокачественных опухолей и активируется при повреждениях генетического аппарата. Авторами публикаций установлено, что оба энантиомера УК являются действующими ве-

шествами с IK_{50} (+) и (–)-УК, соответственно: 4.2 и 4.0 мкг/мл (Т-47D) и 5.3 и 5.0 мкг/мл (Сарап-2).

Исследования механизма противоракового действия УК проводили в нескольких направлениях. Ряд исследователей изучали активность УК в отношении транскрипции белка p53. Эксперименты [65] на опухолевых клеточных культурах человека – клетках рака молочной железы MCF7 (активный p53), MDA-MB-231 (неактивный p53), H1299 (p53-ноль, клеточная линия рака легких, в которой отсутствует ген p53) – показали, что эффективность транскрипции этого белка не затрагивается в присутствии УК. То есть УК является противораковым агентом, который работает p53-независимым образом.

Несмотря на данные о p53-независимом действии УК [65], авторы работы [81] предполагают, что зависимость все-таки есть, но она опосредована клеточной реакцией на окислительный стресс, вызванный УК, и последующим фосфорилированием Ser20 в p53. Фосфорилирование p53 по остатку Ser20 отличается от фосфорилирования по остаткам Ser15 или Ser 46, отвечающим за индукцию апоптоза, и связано с клеточной реакцией на окислительный стресс при посредничестве протеинкиназы C (PKC, КФ 2.7.11.13) и IκB-киназы α (IKK, КФ 2.7.11.10). Кроме того, в публикации [81] показано, что в клеточной линии с функциональным p53 (Сарап-2) после инкубации с УК в течение 48 ч некроз клеток наблюдается, а в клеточной линии с неактивным p53 (Т-47D) – не наблюдается. Бакорова и соавт. [82] также предполагают, что, хотя роль белка p53 не является решающей в гибели клеток после обработки УК, воздействие УК на этот белок имеет место и может частично повлиять на общий результат. Авторы обнаружили, что продукция p53 сильно активируется в присутствии УК после первых 6 ч экспозиции раковых клеток A2780.

Связь механизма цитотоксичности УК с генерацией АФК не очевидна. Рабело и соавт. [83] предполагают причиной цитотоксического действия (+)-УК (20 мкг/мл) на клеточную линию SH-SY5Y (нейробластома человека) увеличение внутриклеточного производства АФК. В работе [79], наоборот, наблюдали очень незначительное увеличение АФК при действии УК на три линии клеток рака человека. Механизм цитотоксичности УК на опухолевых клетках гепатобластомы человека HepG2 изучали через ряд биохимических и токсикогеномных показателей в работе [49]. Авторы подтверждают, что УК вызывает окислительный стресс и митохондриальную дисфункцию.

Еще об одном регуляторном механизме УК в отношении опухолей сообщается в работе [84]. Авторы показали, что одним из механизмов противоопухолевого действия УК является подавление образования клеточных колоний и уменьшение их размера. На клеточной линии A549 (карцинома легких человека) показано, что 24-часовое воздействие УК в концентрации 25 мкМ приводит к гибели 39% клеток, увеличение концентрации до 100 мкМ и продление действия до 2 сут увеличивает гибель клеток до 89%. Уменьшение концентрации УК до 1–10 мкМ уменьшает образование клеточных колоний, на 85% в сравнении с контролем. В публикации [76] также подтверждается, что УК эффективно тормозит образование колоний клеток в концентрациях 100–200 мкМ. Исследования проводили на 9 линиях опухолевых клеток человека: A2780 (карцинома яичника), HeLa (аденокарцинома шейки матки), MCF-7, SK-BR-3 (обе – аденокарцинома груди), HT-29 (аденокарцинома толстой кишки), HCT-116 p53+/+, HCT-116 p53–/–, (карцинома толстой кишки человека и ее сублиния p53-ноль), HL-60 (промиелоцитарный лейкоз) и Jurkat (Т-клеточная лейкемия). IK_{50} УК составила от 48.5 (HL-60) до 199.2 мкМ (SK-BR-3).

Исследования влияния УК на процесс апоптоза опухолевых клеток проводили, в основном, в последнее десятилетие. Безивинюм и соавт. [73] для клеточной линии L1210 при действии УК были выявлены морфологические изменения, характерные для апоптоза – конденсация ядерного хроматина, фрагментация ядер и образование апоптических тел. Показана способность УК вызывать апоптоз дозо- и времязависимо. При действии двукратной эффективной дозы (12 мкг/мл) в течение 2 сут число апоптических клеток составило 63%. Данные о индуцировании УК апоптоза подтверждаются в работе [76], кроме того, анализ распределения клеточного цикла показал накопление клеток в S-фазе (фазе, предшествующей митозу, во время которой происходит транскрипция ДНК), при действии УК. Авторы работы [84] сообщают, что УК ингибирует рост клеток в G0/G1-фазах клеточного цикла (фазах покоя и накопления клеткой питательных веществ), вызывает деполяризацию митохондриальной мембраны, двукратно увеличивает число клеток с апоптозом и разрушает поли(АДФ-рибозо)полимеразу (PARP, КФ 2.4.2.30), известный маркер митохондриального и каспаза-опосредованного апоптоза. По-видимому, УК индуцирует апоптоз клеток через деполяризацию митохондриальной мембраны. Данные работы [82] свидетельствуют об индукции апоптоза при действии УК на клетки A2780 (карцинома яичника) и

HT-29 (аденокарцинома толстой кишки), зафиксирована фрагментация геномной ДНК и активация каспазы-3 (CASP3, КФ 3.4.22.56).

Авторы работы [81] не наблюдали классического апоптоза с фрагментацией ДНК при действии УК. Цитометрический анализ подтвердил, что одинаково подвержены значительному ингибирующему эффекту УК как вход в S-фазу клеточного цикла, так и увеличение размера клеток, однако при этом выживание клеток не сильно менялось. В обеих клеточных линиях Саран-2 и T-47D воздействие УК привело к значительным потерям митохондриального мембранного потенциала.

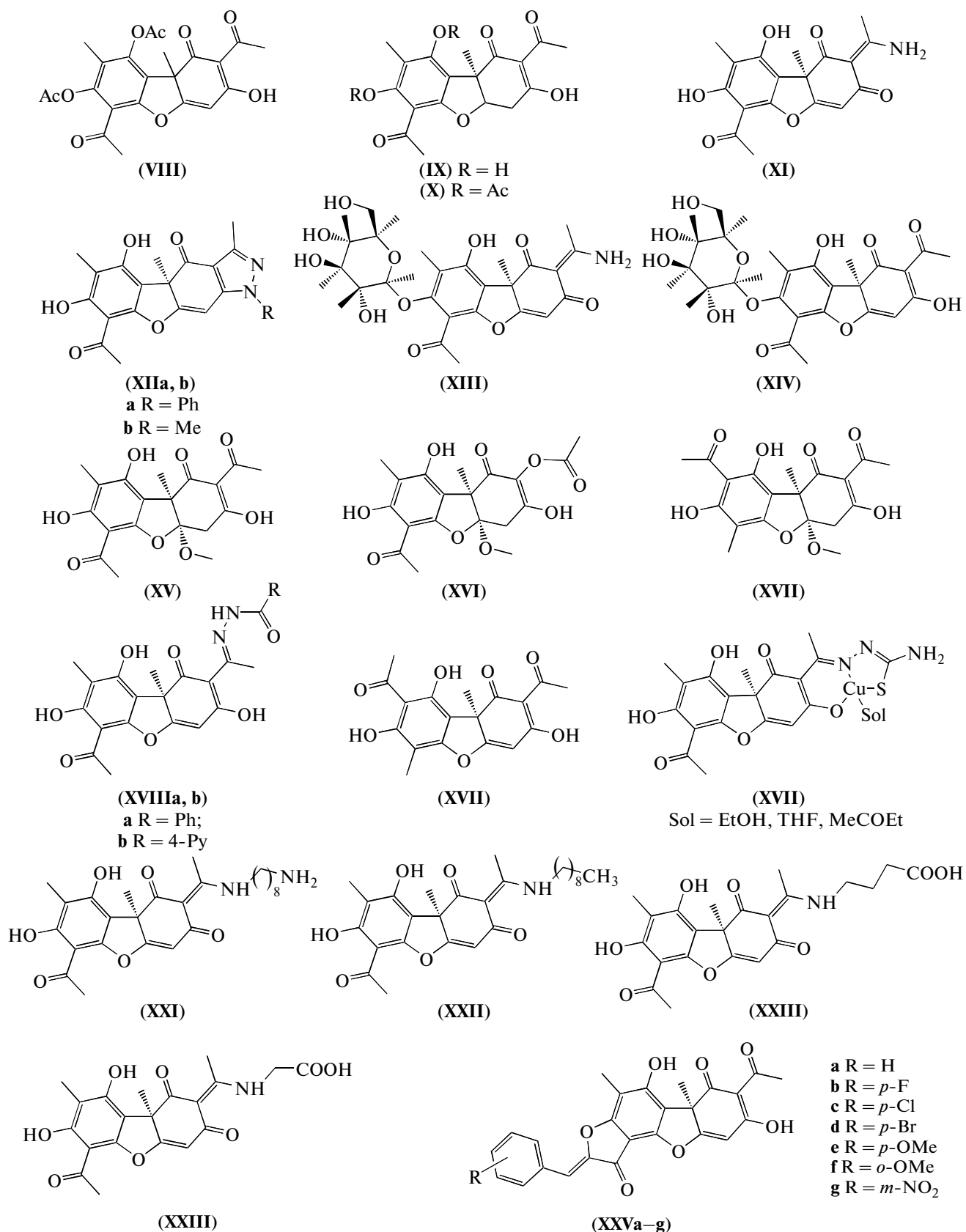
В работе [85] сообщается о еще одной клеточной мишени действия УК в опухолевых клетках. В исследованиях *in vitro* (концентрация УК 1 мкг/диск) и *in vivo* (50 мг/кг/день внутривентриально) обнаружено, что УК сильно тормозит ангиогенез и рост опухоли молочной железы BCAP-37, не затрагивая массу тела мышей. *In vitro* показано, что УК не только значительно ингибирует пролиферацию эндотелиальных (HUVES) и опухолевых (BCAP-37) клеток, миграцию клеток и формирование сосудистых трубок, но также индуцирует морфологические изменения и апоптоз в эндотелиальных клетках в концентрациях 10–50 мкМ. УК блокирует рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) 2, опосредованно регулируя уровень внеклеточных протеинкиназ 1 и 2 (ERK1 и ERK2, КФ 2.7.11.24) и протеинкиназы P70S6K (КФ 2.7.11.1) в эндотелиальных клетках. Авторы установили, что УК ингибирует активацию каскада внеклеточно-регулируемых протеинкиназ, ключевого сигнального пути в системе MAPK-сигнальных путей в опухолевом ангиогенезе.

Попытки улучшить терапевтическую активность УК путем использования средств доставки предприняты в исследовании [86]. Авторы использовали распространенный способ доставки молекул – встраивание в капсулы из биоразлагаемых полиэфилов – сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) [86]. Свободную и инкапсулированную в PLGA УК тестировали *in vitro* на клетках HEp-2 (плоскоклеточный рак гортани). Эффективная ингибирующая концентрация ИК₅₀ составила 12.6 и 14.4 мкг/мл соответственно, что говорит об отсутствии желаемого эффекта. Однако в экспериментах *in vivo* тех же авторов [86] на мышцах с саркомой-180 степень ингибирования роста опухоли инкапсулированной УК была выше (63%), чем свободной (42%). При этом наблюдалась существенная разница в гистологических срезах: при воздействии свободной УК в опухоли возникает множество

некротических очагов, для инкапсулированной УК некроз менее выражен. Аналогичные нанокapsулы использовали для уменьшения цитотоксичности УК в отношении здоровых клеток в процессе лечения асцитной опухоли саркомы-180 у мышей [87]. УК, инкапсулированная в PLGA-нанокapsулы, на 26.4% эффективнее ингибировала рост опухоли, чем свободная УК, при этом наблюдаемые морфологические изменения здоровых клеток – вакуолизация гепатоцитов и лимфоцитарная инфильтрация – были для инкапсулированной УК менее выражены.

Повысить цитотоксическую активность УК в отношении клеток K-562 (эритроцелочный лейкоз человека) путем повышения растворимости в воде пытались Кристмундсдоттир и соавт. [88], для чего использовали ряд комплексантов. Наилучшие результаты авторами получены при комплексообразовании УК с полиэтиленгликолем 400 (PEG400) и 2-гидроксипропил-β-циклодекстрином, ЭД₅₀ комплексов составили 3.0 и 4.7 мкг/мл соответственно. ЭД₅₀ определяли как количество вещества, требуемое для уменьшения включения меченого тимидина в ДНК (что свидетельствует об ингибировании пролиферации клеток) на 50% в сравнении с аналогичным включением в необработанной контрольной культуре.

С целью повышения цитотоксической активности (–)-УК [72] авторы работы [89] синтезировали серию ее производных. Ключевой стратегией синтеза было повышение биодоступности путем повышения водорастворимости. Эту цель авторы достигали разрывом внутримолекулярных водородных связей в молекуле УК, в том числе – получением эфиров по фенольным группам ароматического фрагмента (соединения (VIII), (X), (XIII), (XIV)), разрушением трикетонной системы (соединения (IX), (X), (XI), (XIa, b) и (XV)). Анализ структура–цитотоксичность показал, что β-трикетонный фрагмент, а следовательно, и липофильные свойства УК, важны для цитотоксичности. Ни одно из тестируемых производных ((VIII)–(XV)) не показало активности на клетках карциномы Льюиса легких выше, чем сама (–)-УК. Помимо карциномы Льюиса, тестирование проводили также в тест-системах лейкемии P388 и показали незначительное увеличение выживаемости подопытных животных по сравнению с контрольными.



Формулы 3. Производные УК, тестированные на цитотоксическую активность.

Эфиры УК и дигидроУК (соединения **(VIII)**–**(X)**), почти полностью подавляют рост клеток карциномы Льюиса на уровне 14 мкМ. Несколько меньшую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток имеют производные УК с модификацией β -трикетонной части (**(XI)** и **(XIIa, b)**). Наиболее гидрофильные соединения в ряду исследованных авторами [89] производных УК – гликозиды **(XIII)** и **(XIV)** – оказались наименее цитотоксичны. Косвенно важность трикетонного фрагмента в цитотоксичности подтвердили авторы работы [90]. В ряду родственных УК дибензофуранов (**(XV)**–**(XVII)**), соединение **(XVI)**, с нарушенной системой водородных связей в трикетонном фрагменте, существенно менее цитотоксично (ED_{50} 190 мкг/мл) в отношении клеток MDCK (клетки почечного эпителия) в сравнении с соединениями **(XV)** и **(XVII)** (ED_{50} 4.6 и 3.6 мкг/мл соответственно).

Также не удалось получить более цитотоксичные в отношении раковых клеток производные УК модификацией ее трикетонного фрагмента в работе [91]. Гидразоны ароматических кислот (**(XVIIIa, b)**) получали на основе обоих энантиомеров УК. На опухолевых клетках человека *in vitro* обнаружена незначительная цитотоксическая активность производных, также авторы отмечают, что правовращающие соединения активнее производных на основе (–)-УК. Однако не только наличие трикетонного фрагмента определяет цитотоксичность соединения. В публикации [92] сообщается, что (–)-изоусниновая кислота (**(XIX)**), отличающаяся положением заместителей в фенольном фрагменте и обладающая трикетонной группировкой, в отличие от самой (–)-УК, не проявила цитотоксической активности по отношению к опухолевым клеткам HT-29 (колоректальный рак человека).

Производные УК с высокой цитотоксической активностью впервые отмечены в работе [93]. Комплексы ацилгидразидов УК с Pd(II) и Cu(II) проявили цитотоксическую активность *in vitro* в отношении клеток карциномы шейки матки HeLa с ИК от 1.8 до 86.0 мкМ, но лишь некоторые оказались активнее самой УК (ИК₅₀ 14.9 мкМ). Например, комплекс тиосемикарбазида УК с медью (**(XX)**) (ИК₅₀ 1.8 мкМ).

Основываясь на данных о высокой активности полиаминной транспортной системы в раковых клетках, авторы работы [94] синтезировали девять аминопроизводных УК с синтетическими и природными полиаминами с целью их селективной и быстрой доставки в опухолевые клетки системой транспорта полиаминов. Конъюгаты были протестированы на мышинных и человеческих линиях раковых клеток: L1210 (лимфолейкоз), 3LL (карцинома Льюиса), DU145 (карцинома проста-

ты), MCF7 (аденокарцинома молочной железы), K-562 (хронический миелолейкоз) и U251 (глиобластома), а также на двух опухолевых клеточных линиях хомяка. Некоторые производные показали значительную цитотоксичность в клетках L1210, однако их действие оказалось независимым от системы транспорта полиаминов. Наиболее активное 1,8-диаминооктан-производное (**(XXI)**) оказывает схожее действие на все линии раковых клеток и вызывает апоптоз. При сравнении апоптоз-индуцирующей активности (+)-УК и ее 1,8-диаминооктанового производного (**(XXI)**) в клетках L1210 обнаружено, что степень апоптоза для них примерно одинакова, а ингибирующая концентрация производного существенно ниже (ИК₅₀ 3–6 мкМ). Авторы отмечают, что присутствие первичной аминогруппы на конце алкильной цепи также имеет большое значение для цитотоксичности, что иллюстрируется ее отсутствием у нониламинопроизводного (**(XXII)**) (ИК₅₀ на L1210 > 500 мкМ).

В работе [95] показано, что производные (+)-УК с аминокислотами проявляют цитотоксичность в отношении клеточной линии HaCaT (иммортиализованные кератиноциты человека). Авторы установили, что ингибирующая концентрация сильно различается в зависимости от строения аминокислотного остатка. ИК₅₀ производного с γ -аминомасляной кислотой (**(XXIII)**) – 150 мкг/мл, соединение с остатком глицина (**(XXIV)**) оказалось наиболее токсичным – 4.1 мкг/мл. Для сравнения – токсичность по отношению к HaCaT самой (+)-УК составляет 24 мкг/мл.

Высокая противоопухолевая активность по отношению к опухолевым клеточным культурам SEM-13, U-937 и MT-4 выявлена у производных (+)-УК (**(XXVa–g)**) с бензилиденфураноновым фрагментом [96]. Значения ИК₅₀ для соединений (**(XXVa–g)**) имеют сходный порядок величины на всех исследованных опухолевых клеточных линиях и лежат в диапазоне 0.6–3.0 мкг/мл. В экспериментах на опухолевых клетках моноцитов человека U-937 показано, что механизм противоопухолевого действия этих соединений связан с индукцией апоптоза (например, для соединения (**(XXVa)**) клетки с апоптозом составляют 70%).

Таким образом, УК проявляет противораковые свойства в умеренной степени, действующие концентрации составляют порядка 10^{-6} М и выше. При этом наблюдаются общие цитотоксические эффекты: повышение уровня АФК, окислительный стресс, некроз. Исследования ряда авторов позволяют предположить, что основным механизмом противоопухолевого действия УК является апоптоз, но не классический, а митохондриальный. Специфические пути воздействия УК

на опухоли включают подавление роста клеточных колоний и ингибирование ангиогенеза в опухоли. Применение средств доставки незначительно улучшает противоопухолевое действие УК. Недостаточно сравнительных данных о противораковом действии энантиомеров УК; в ряде случаев можно говорить о большей эффективности (–)-энантиомера. Опубликованные данные о цитотоксичности производных УК говорят о перспективности синтеза противоопухолевых агентов на ее основе. Исследования “структура–свойства” позволяют предположить, что цитотоксичность производных УК связана с их липофильностью, при этом важную роль играет трикетонная система кольца С УК.

ФЕРМЕНТИНГИБИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ

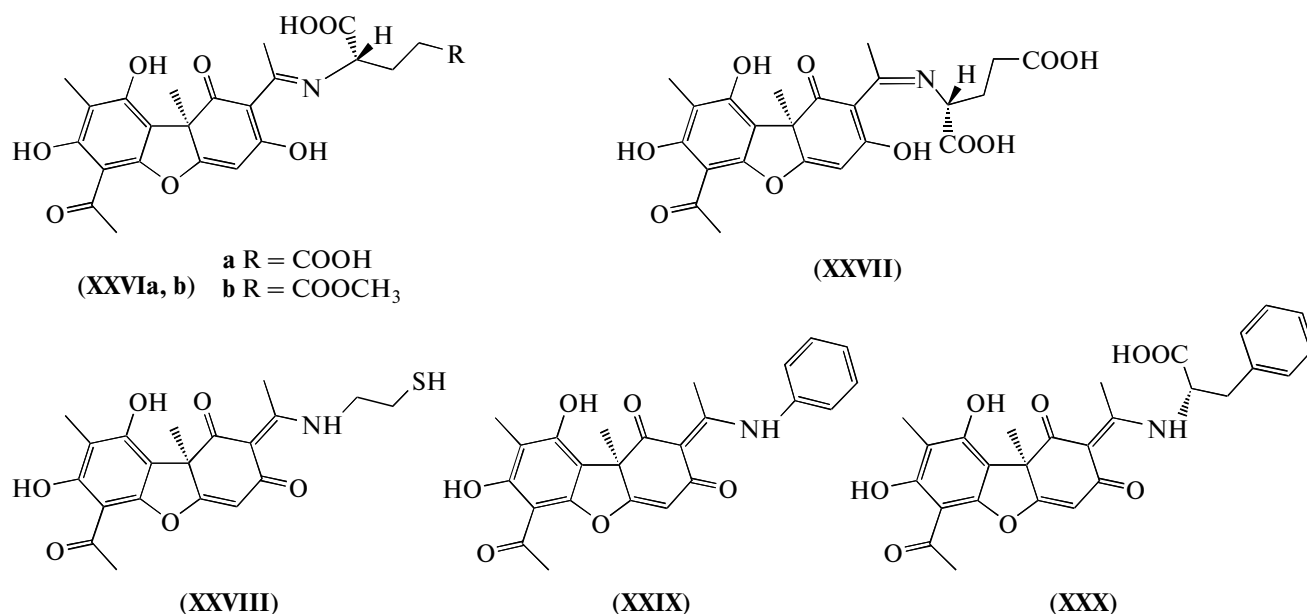
Системного изучения взаимодействия УК с ферментами не проводилось. Большинство публикаций содержит отрывочные данные, как правило, полученные при исследованиях других аспектов ее биологической активности.

В работе [56] высказано предположение, что причиной блокирования митоза в оплодотворенной икре морских ежей и в *Mycobacterium tuberculosis* является ингибирование ДНК-азы (КФ 3.1.21.1). Авторы считают, что УК участвует в ингибировании в виде комплекса с кобальтом, ее действующая концентрация определена как 1–10 мкг/мл. Висенте и соавт. [97] сообщают, что (–)-УК ингибирует активность ВИЧ-1- и ВИЧ-2-интегразы (HIV IN, КФ 2.7.7.49), топоизомеразы I (Торо I, КФ 5.99.1.2) млекопитающих и связывает фермент гидроксифенилпириватдиоксигеназу (HPPD, КФ 1.13.11.27). Блокирование фермента HPPD при действии (–)-УК может приводить к ингибированию биосинтеза каротиноидов [98]. Есть данные, что УК ингибирует некоторые ферменты в микроорганизмах [99] и оказывает влияние на концентрации фитогормонов в томатах [100]. При выращивании томатов в среде с добавлением 30 мкМ (+)-УК снижаются концентрации фитогормонов, например, уровень индол-3-уксусной кислоты составил 61 и 66% в листьях и корнях соответственно. В публикации [101] показано, что (–)-УК образует комплекс с D-фруктоза-6-фосфат-аминотрансферазой (GFAT, КФ 2.6.1.16) в растворе. Авторами установлены два сайта связывания с высоким сродством к лиганду и шесть – с низким.

Сообщается, что УК способна связывать уреазу (КФ 3.5.1.5) с образованием больших неактивных агрегатов [99, 102]. Предполагается, что (–)-УК блокирует при этом основные тиоловые (–SH)

группы молекулы уреазы. Это предположение подтверждено тем, что L-Cys частично обращает ингибирование уреазы путем конкурентного связывания УК по своей тиольной группе [103]. Исследования [104] по влиянию УК на фермент аргиназу (КФ 3.5.3.1) показали, что УК в концентрациях от 20 до 120 мкМ влияет на активность гликолизированной аргиназы, но не обнаружено влияния УК на уровень активности индуцибельной (негликолизированной) аргиназы. В публикации [105] сообщается, что УК ингибирует очищенную аргиназу с насыщением при концентрации 0.14 мкМ и числе сайтов связывания – 28. УК ингибирует ферменты 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктазу (HMGR, КФ 1.1.1.34) и ангиотензинпревращающий фермент (АСЕ, КФ 3.4.15.1) в концентрациях от 50 до 250 мкг/мл неконкурентоспособным путем [83]. Ряд публикаций сообщает примеры отсутствия фермент–УК-взаимодействия. В экспериментах *in vitro* УК в концентрациях 3.33–100 мкг/мл не проявила ингибиторной активности в отношении 12S-липоксигеназы тромбоцитов (LOX, КФ 1.13.11.31) – фермента, вовлекаемого в ангиогенез опухоли [106]. (–)-УК является даже активатором некоторых ферментов: способствует секреции глюкозаминфосфатазы (КФ 3.5.99.6) и лактатдегидрогеназы (LDH, КФ 1.1.1.27) [107].

Работа [108] сообщает о ферментингибирующей активности некоторых производных УК. Ряд производных УК с аминокислотами (XXVIa, b), (XXVII), также как и сама УК, умеренно ингибируют активность протеин-тирозин-фосфатазы 1В (PTR1B, КФ 3.1.3.48) дозозависимым образом, величины ИК₅₀ были определены как 27.7, 23.2, 16.4 и 15.0 мкМ соответственно, что сравнимо с ИК₅₀ известного ингибитора фосфатазы РК-682 (4.5 мкМ). Ингибиторы PTR1B считаются потенциальными агентами для лечения диабета типа 2 и других метаболических синдромов. Возможный механизм процесса заживления ран производными УК (XXVIII) и (XXIII) [95] также связывают с ингибирующей активностью этих соединений в отношении ферментов гиалуронидазы (HYAL, КФ 3.2.1.35) и коллагеназы (MMP1, КФ 3.4.24.7). Степень ингибирования HYAL 25 и 40% при применении соединения (XXIII) в дозах соответственно 50 и 100 мкг/мл. Для сравнения УК в таких же дозах ингибирует HYAL на 14 и 33%.



Формулы 4. Производные УК, тестируемые на ингибирующую активность в отношении ферментов.

Ранее уже упоминалось деструктивное действие УК на поли(АДФ-рибозо)полимеразу (PARP) [84] – фермент, участвующий во многих клеточных процессах, в том числе в репарации ДНК. Авторы работы [109] изучали ингибирование PARP1 различными производными на основе (+)-УК. Выявлено умеренное ингибирующее действие на фермент соединений, содержащих ароматические заместители, вне зависимости от способа и места их прикрепления к остову УК. Авторы предполагают, что имеет место стекинг-взаимодействие, связывание при этом носит неспецифический характер. Менее выраженное ингибирующее действие УК и ее производные оказывают на еще один ключевой фермент репарации ДНК – полимеразу β (POLB, КФ 2.7.7.7). Ряд соединений (пиразолы (XII) и енамин (XXIX)) оказывают селективное ингибирующее действие на PARP1, не влияя на уровень POLB. Наибольший ингибирующий эффект в отношении обоих ферментов наблюдался для соединения (XXX), полученного реакцией (+)-УК и *L*-Phe, остаточная активность PARP1 и POLB составила 11 и 28% соответственно.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА

То, что УК выступает в качестве защитного вещества при окислительном стрессе, предположили авторы работы [110], поскольку ее содержание значительно (+36%) выросло в лишайнике *Parmelia soredians* в ответ на действие гербицида “Paraquat”, вызывающего окислительный стресс. Неоднократно отмечалось, что содержание УК в лишайниках значительно возрастает также в от-

вет на УФ-облучение [111–114]. Способность УК поглощать радикалы, генерируемые средневолновым УФ-излучением (УФ-В), также наблюдали в работе [115]. Причем фактор защиты, определенный авторами в экспериментах *in vivo*, составил 5, что сравнимо с коммерческими солнцезащитными агентами.

Антиоксидантное действие УК *in vivo* изучали в работе [116]. Эксперименты проводили на крысах с язвой, индуцированной индометацином, с использованием доз УК от 25 до 200 мг/кг массы тела. Во всех изученных дозах УК проявляет себя как антиоксидант, обращая окислительное действие индометацина. Известно, что введение индометацина снижает уровень супероксиддисмутазы (SOD, КФ 1.15.1.1), глутатионпероксидазы (GPx, КФ 1.11.1.9) и восстановленного глутатиона (GSH), увеличивает уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), таким образом, повышая продукцию АФК. Воздействие УК во всех дозах обращает эту тенденцию. Авторы предполагают, что гастропротективный эффект УК может быть связан с ее восстановительным влиянием на окислительные повреждения. Также значительное снижение уровня ПОЛ под действием УК, сравнимое с таковым при применении омепразола, наблюдали на крысах с индуцированной гастроэзофагальной рефлюксной болезнью [117]. Антиоксидантное действие УК проявляется кроме того в повышении уровней SOD и каталазы (CAT, КФ 1.11.1.6), ферментов, регулирующих продукцию АФК.

Авторы работы [118] установили, что при действии УФ-излучения УК в низких концентрациях (10^{-8} и 10^{-6} М) демонстрирует антиоксидантную

активность в отношении клеток Т-лимфоцитов человека. Клетки крови повышают свою метаболическую активность и показывают хорошую выживаемость в сравнении с контролем. В работе [119] в экспериментах на 5 культивируемых человеческих линиях клеток крови также показано, что УК обладает антиоксидантными функциями. Окислительные эффекты УК оценивались по уровню биохимических показателей — общая антиоксидантная емкость (ОАЕ) и общий окислительный статус (ООС). Низкие концентрации УК (1 и 5 мкг/мл) вызывают увеличение уровней ОАЕ в культурах клеток, при этом уровни ООС не менялись ($p > 0.05$) при всех использованных концентрациях УК (до 200 мкг/мл). Количественные исследования провели Бехера и соавт. [120]. Авторами определена концентрация УК, необходимая для гашения 50% свободных радикалов (ИК₅₀), которая варьировала от 195 до 214 мкг/мл для разных радикальных частиц. Степень антиоксидантной активности менялась дозозависимо, процент ингибирования АФК составил 4.85% при концентрации 5 мкг/мл и 51.21% при 200 мкг/мл, подобные зависимости наблюдались также и для ингибирования активных форм азота (АФА) — от 23.46 до 52.19% и для ПОЛ (24.44–46.57%).

Ряд публикаций посвящен способности УК содействовать ПОЛ. Авторы работы [118] показали, что в концентрациях 10^{-4} М при жестком облучении клеток УК выступает как прооксидант, ухудшая и выживаемость, и клеточный метаболизм. А в публикации [121] подтвердили, что при использовании достаточно высокой концентрации УК (250 мкг/мл) антиоксидантного эффекта (+)-УК не наблюдается. В тесте на лецитинсодержащих липосомах не зафиксировано видимого эффекта, а при окислении другой липидной системы — эмульсии линолевой кислоты — наблюдается прооксидантное действие УК. Данные об отсутствии антиоксидантного действия (+)-УК приведены в работе [16], где показано, что даже в высоких дозах 100 и 250 мкМ (+)-УК не ингибирует процесс ПОЛ. В исследованиях на трех опухолевых клеточных линиях человека [79] показано, что УК не проявляет способность гасить устойчивый свободный радикал 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил (DPPH) вплоть до концентрации 800 мкМ, и, хотя не увеличивает внутриклеточный уровень АФК, но и не предотвращает окислительное повреждение, вызванное *трет*-бутилгидропероксидом. Аналогичные результаты, подтверждающие отсутствие антиоксидантного действия УК по отношению к процессу ПОЛ, получены в экспериментах на культуре клеток полиморфноядерных лейкоцитов [122]. Интересно, что в исследовании [123] сообщается о том, что (+)-УК вызывает высвобождение NO, а в работе [124], что УК ингибирует продукцию NO с ИК₅₀ 4.7 мкМ.

Наиболее обстоятельно к исследованию окислительных свойств УК подошли Рабело и соавт. [83]. Дабы прояснить вопрос, прооксидантом или антиоксидантом является УК, авторами измерены в тестах *in vitro* параметры TRAP (*total reactive antioxidant potential* — общая потенциальная активность антиоксиданта) и TAR (*total antioxidant reactivity* — общая антиоксидантная активность), которые свидетельствуют о значительной антиоксидантной способности УК в концентрации 20 мкг/мл. Считается, что TRAP отражает количество антиоксиданта в системе, а TAR — его активность, т.е. скорость взаимодействия антиоксиданта с радикалами. В результате исследований на нейроноподобных клетках SH-SY5Y *in vitro* в МТТ-тесте [83] выяснено, что (+)-УК действует бифункциональным образом. А именно, в диапазоне концентраций от 2 нг/мл до 20 мкг/мл она эффективно гасит гидроксильные радикалы и окись азота, однако, в этом же диапазоне концентраций усиливает ПОЛ. Последний эффект приводит к уменьшению жизнеспособности клеток при высокой концентрации УК (20 мкг/мл) через 4 ч, а при низкой (2 мкг/мл) — через 24 ч.

Изучение взаимодействия УК с различными радикальными частицами показало, что УК охотно реагирует с озоном. При этом УК сама не способна ни реагировать с синглетным кислородом, ни генерировать его даже в миллимолярных концентрациях [125]. Другие окисляющие радикалы (NO_2^- ; Br_2^- , N_3^- , OH^- и $(\text{SO}_4)^-$, как оказалось, также не реагируют с УК [126]. Измеренная антирадикальная сила УК, определенная в тестах по гашению радикалов DPPH, составила 0.1124. Этот показатель определяли как $1/\text{ИК}_{50}$, где ИК₅₀ — концентрация УК, которая уменьшает уровень DPPH на 50%. Кроме того, авторы показали, что генерированное пульс-радиолизом триплетное состояние УК может гасить АФК, но его энергии (142.6 кДж/моль) недостаточно для генерирования триплета тимина (163.3 кДж/моль), необходимого для образования тиминовых димеров, основных фотопродуктов при действии УФ-излучения на ДНК, а значит и для повреждения ДНК. В работе [127] *in vitro* определена количественно способность УК гасить радикалы. Радикалулавиляющая активность УК в отношении АФК составила 59.9, АФА — 56.9% и наблюдалось полное отсутствие активности по гашению радикалов DPPH.

Очевидно, что УК может проявлять переменные окислительно-восстановительные свойства в зависимости от условий и/или клеточного окружения (она и гасит АФК и их генерирует в разных тестах), выступая как прооксидант или антиоксидант. Поскольку УК усиливает липопероксидацию, то более токсичное действие УК будет наблюдаться в богатых липидами системах.

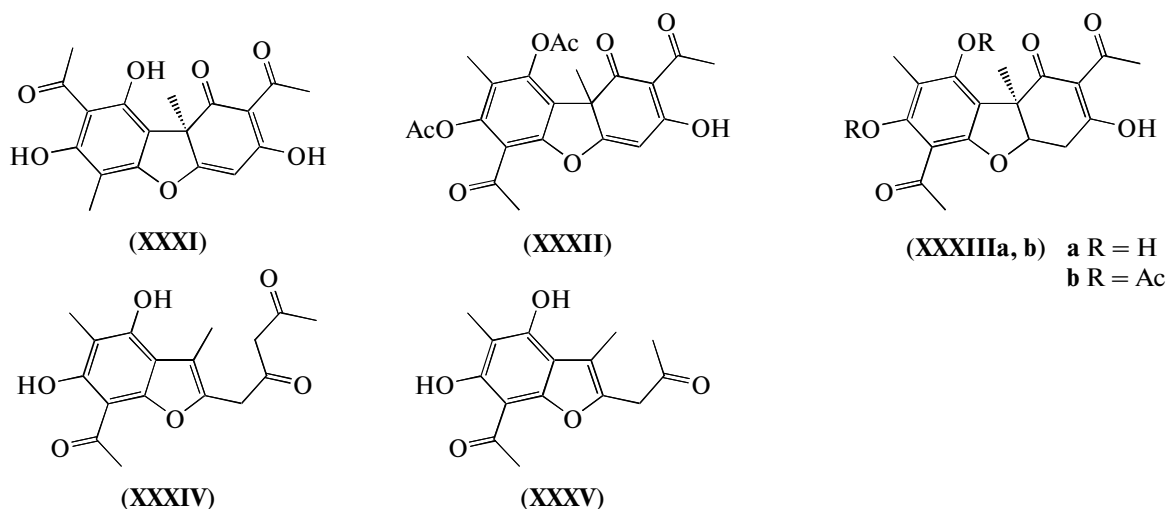
АЛЛЕРГЕННЫЕ СВОЙСТВА УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Способность УК вызывать аллергическую реакцию известна довольно давно. Об аллергических свойствах самой УК, а также лишайников и парфюмерных композиций, содержащих УК, неоднократно сообщалось в публикациях [128–133]. Однако в работе [134] продемонстрировано, что (+)-УК не вызывает аллергию у морских свинок. Исследования [135] индивидуальных энантиомеров УК, проведенные на морских свинках в тесте FCA (адъювант Фрейнда полный), показали, что оба энантиомера являются слабыми аллергенами, но при этом (–)-УК сенсибилизирует в 2 раза сильнее, чем (+)-УК.

Тесты на людях (3 пациента) еще в 1966 г. показали, что более выраженным сенсибилизирующим действием обладает, наоборот, (+)-УК [136]. Позднее эти результаты были подтверждены в исследовании на 7 пациентах-лесниках [134]. Авторами использовались различные дозы УК в вазелине и показано, что в концентрации 0.1% (+)-УК приводит к развитию аллергии, а (–)-УК даже в концентрации 5% не сенсибилизирует. Чувстви-

тельность к (+)-УК была подтверждена также в исследовании [137] на 9 пациентах. Авторы показали, что 1% раствор (+)-УК в петролейном эфире вызвал дерматит у 5 пациентов, а такая же концентрация (–)-УК – только у трех из них. Работы [131–133, 138] подтвердили наличие у некоторых пациентов аллергии на (+)-УК. Позднее показано [128], что УК является наиболее вероятным действующим компонентом в развитии аллергии на парфюм “Oak moss”, 5 из 7 пациентов, имеющих аллергию на эту композицию, чувствительны к действию (+)-УК в концентрациях от 0.001 до 0.1%. То, что механизм аллергии каким-то образом связан с фоточувствительностью установили в работах [139, 140].

Тестирование некоторых производных УК, модифицированных по разным фрагментам молекулы (изоусниновая кислота (XXXI), диацетилпроизводное (XXXII), дигидроусниновая кислота (XXXIIIa), диацетилдигидроусниновая кислота (XXXIIIb), соединения с разомкнутым кольцом С (XXXIV) и (XXXV)) показало отсутствие у них аллергического действия [136].



Формулы 5. Производные УК, тестируемые на способность вызывать аллергические реакции.

Таким образом, согласно большинству опубликованных работ, УК оказывает аллергическое действие на организмы. По-видимому, люди чувствительнее к (+)-УК, морские свинки к (–)-энантиомеру. Среди исследованных производных УК нет вызывающих аллергию соединений.

ФАРМАКОКИНЕТИКА УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Первое системное исследование фармакокинетики (+)-УК проводили в 1992 г. на кроликах

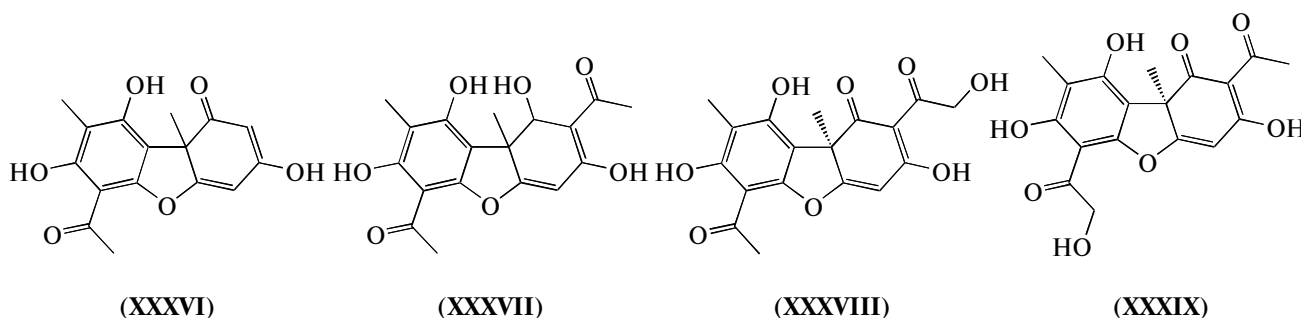
при внутривенном (доза 5 мг/кг) и пероральном (доза 20 мг/кг) ее введении [141]. Следует отметить, что авторы использовали так называемую растворимую форму, а именно натриевую соль УК. Время полувыведения при внутривенном введении составило 4–17 ч. При пероральном введении значительно удлиняются время полужизни УК в плазме (18.9 против 11.4 ч для внутривенного) и период полувыведения. Пиковая концентрация УК в плазме (32 мкг/мл) достигается примерно через 12 ч, а биодоступность составляет 78%. Кроме того, авторы отмечают, что концентра-

ция, более чем необходимая для ингибирования роста микобактерий (8 мкг/мл), сохраняется при внутривенном введении в течение 12 ч, а при пероральном — 48 ч, что достаточно при использовании УК в лечении туберкулеза. По данным работы [142], системный клиренс УК составил 12 мл/ч/кг. В публикации [143] сообщается, что клиренс УК в первую очередь определяется фазой I метаболизма, а время полужизни УК в микросомах печени человека составило 19.3 ± 0.58 мин.

Связывание (+)-УК с белками плазмы изучалось *in vitro* в работе [144]. Авторами обнаружена высокая способность УК к связыванию с белками, достигающая 99% в диапазоне используемых концентраций УК 1–5 мкг/мл. Исследование показало наличие двух типов связывания с константами ассоциации 34.3×10^{-4} и 1.43×10^{-4} М соответственно. Анализ распределения УК в тканях крыс показал, что УК при интраперитонеальном введении преобладает в хорошо кровоснабжаемых органах. У крыс, которые получили дозу 25 мг/кг, концентрации УК в печени, легких и крови были несколько выше, чем концентрации в плазме. В легких также наблюдается высокий уровень распределения ткань/плазма, что свидетельствует о хороших перспективах использования УК в лечении легочных болезней.

Данные о связывании УК с белками плазмы крови были подтверждены исследованием [143], в котором установлено, что УК в концентрации 1 мкМ связывается с белками плазмы человека и плазмы крови крыс на 99.76 и 99.49%. Обратимость этого процесса достаточно высокая, степень высвобождения УК была более 95% во всех случаях. Эти данные показывают, что связывание УК с белками может замедлить клиренс других препаратов и будет значимым фактором при расчете воздействия лекарств или при выводе фармакокинетических параметров человека в доклинических исследованиях.

Помимо выведения в неизменном виде, УК также метаболизируется в организмах различными путями. В растениях УК метаболизируется под действием различных микроорганизмов, в том числе некоторых видов грибов рода *Penicillium*, а также *Absidia coerulea*, *Mortierella pusilla*, *Rhizopus stolonifer* и *Mucor ramanianus* [145]. Канадскими исследователями [146] из микобионтов лишайников выделены некоторые ферменты, метаболизирующие УК. Например, из мицелия *Mortierella isabellina* выделен фермент, метаболизирующий УК до дезацетилусниновой кислоты (XXXVI).



Формулы 6.

Из микобионта лишайника *Evernia prunastri* выделены 2 фермента: *D*-УК-дегидрогеназа и *D,L*-УК-дегидрогеназа [147]. Оба этих фермента катализируют восстановление карбонильной группы кольца С УК до гидроксильной (соединение (XXXVII)) [147, 148]. В работе [143] методом хромато-масс-спектрометрии показано, что в микросомах печени УК метаболизируется с образованием трех моногидроксилированных метаболитов (соединения (XXXVIII) и (XXXIX) — предполагаемые авторами метаболиты) и двух региоизомерных конъюгатов ее с глюкуронами.

Ряд работ посвящен возможным метаболическим путям УК в организмах млекопитающих. Уровень анилингидроксилазы CYP2E1 в цитохроме P450 увеличивается в присутствии (+)-УК,

что говорит о возможном пути деградации УК через этот фермент [44]. Другой метаболический путь наблюдали Фоти и соавт. [143]. В исследовании показано, что глюкуронидация УК протекает под действием уридиндифосфат-глюкуронозил-трансфераз UGT1A1 и UGT1A3 (КФ 2.4.1.17). А в присутствии фурафиллина, ингибитора CYP1A2, время полужизни УК возрастает в 10 раз, что означает, что окислительный метаболизм УК протекает в основном с участием цитохрома CYP1A2. При этом УК выступает как сильный ингибитор некоторых ферментов CYP2C человека, не являясь индуктором основного человеческого цитохрома P450. Этот эффект приобретает значимость при совместном действии лекарств, поскольку из-за мощного ингибирования фер-

ментов СYP2C УК может участвовать в лекарственных взаимодействиях путем ингибирования клиренса нескольких важных классов препаратов, таких как ингибиторы протонной помпы, противосудорожные препараты, антикоагулянты, противодиабетические, блокаторы ангиотензина II и отдельные нестероидные противовоспалительные препараты.

Метаболизм УК изучали *in vitro* на гепатоцитах крыс [149]. В публикации сообщается, что цитотоксичность УК значительно возрастает при ингибировании цитохромов CYP1A или CYP3A. Уже через 2 ч воздействия ингибиторов CYP совместно с УК наблюдается угнетение клеточного дыхания, через 4 ч снижается уровень LDH и АТФ. Эти данные свидетельствуют о том, что УК метаболизирует, вероятно под действием цитохромов CYP1A и 3A, до менее токсичных, чем она сама, метаболитов. Ингибитор цитохрома CYP2B/2C не оказывал эффекта на метаболизм клеток.

Суммируя, следует отметить, что УК очень хорошо связывается в организме с белками плазмы, распределяется в хорошо снабжаемых кровью тканях, медленно выводится, а метаболизируется, по-видимому, путем гидроксирования и глюкуронизации при участии различных цитохромов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несомненно, усниновая кислота — молекула с неординарными и разноплановыми биологическими свойствами, включающими антибактериальную, противовирусную, противоопухолевую, фунгицидную, антиоксидантную, инсектицидную и другие виды активности. Два наиболее распространенных пути ее влияния на живые системы — токсическое действие и антиоксидантное. За реализацию этих взаимодействий, скорее всего, отвечают разные структурные фрагменты УК. Антиокислительным действием УК обязана фенольному фрагменту структуры, ответственному за гашение свободных радикалов. Токсичность УК проявляется в экспериментах на клеточном уровне и заметно менее выражена в тестах *in vivo*, для интоксикации организма необходимо хроническое потребление УК в высоких дозах, при этом преимущественно поражаются энергопотребляющие органы. Механизмы цитотоксического и антибактериального действия схожи и заключаются в разобщении цепи окислительного фосфорилирования путем нарушения мембранного потенциала как у эукариотов в митохондриях, так и в грамположительных бактериях, где нет митохондрий, но есть мезосомы сходных функций. Потерю митохондриального потенциала обеспечивает трикетонный фрагмент УК, благодаря кислотным свойствам которого молекула может диффундировать через митохондриальные мембраны и вызвать утечку протонов. Липофильность УК и ее аниона

позволяет им проходить через митохондриальную мембрану путем пассивной диффузии. Ни цитотоксический, ни антибактериальный механизмы действия УК не зависят от строения асимметричного центра, и поэтому, в тех процессах, где они являются основными, различие в действии энантимеров УК незначительное. Значительный эффект должен наблюдаться в случаях, если происходит специфическое связывание УК с субстратом, например белками, ферментами. Что и отмечается в публикациях, в которых наблюдалось УК-ферментное взаимодействие, а также в работах по противовирусному и сенсibiliзирующему действиям УК.

Отметим, что не все наблюдаемые клеточные эффекты могут быть объяснены действием УК в качестве разобщителя мембран, при этом данные о ее эффектах на уровне молекулярных взаимодействий практически отсутствуют. Исследования, направленные на выяснение механизмов действия УК и ее производных в вирусных микроорганизмах и на их взаимодействия с клеточными рецепторами, пока либо не дают однозначных ответов, либо исключают некоторые общеизвестные механизмы.

В настоящее время массовое возникновение множественной лекарственной устойчивости к традиционным лекарствам диктует необходимость разработки новых кандидатов в лекарства среди соединений, показавших новый механизм действия, и среди них далеко не на последнем месте полусинтетические производные на базе природных веществ. Изучение биологической активности родственных УК соединений и ее полусинтетических производных играет свою роль в понимании некоторых механизмов действия УК и позволяет получить соединения с более высокой цитотоксической, противораковой и антибактериальной активностями. Многие работы, посвященные биологической активности УК, содержат рекомендации поиска ее новых синтетических производных, сохраняющих или улучшающих биологическое действие, но ослабляющих нежелательные эффекты (прежде всего, токсичность). В заключение следует отметить, что, несомненно, рассмотренные в обзоре результаты позволяют рассматривать УК в качестве потенциального предшественника для новых перспективных химиотерапевтических агентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. // БХ. 2016.
2. Barbalic L. // *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*. 1963. V. 9. P. 286–296.
3. Dalvi R.R., Singh B., Salunkhe D.K. // *Phyton*. 1972. V. 29. P. 63–72.

4. Nishitoba Y., Nishimura H., Nishiyama T., Mizutani J. // *Phytochemistry*. 1987. V. 26. P. 3181–3185.
5. Kytöviita M.M., Stark S. // *Funct. Ecol.* 2009. V. 23. P. 435–441.
6. Romagni J.G., Meazza G., Nanayakkara N.P.D., Dayan F.E. // *FEBS Letters*. 2000. V. 480. P. 301–305.
7. Dauriac H., Rondon Y. // *Bull. Soc. Bot. Fr.* 1976. V. 123. P. 235–241.
8. Cardarelli M., Serino G., Campanella L., Ercole P., De Cicco Nardone F., Alesiani O., Rossiello F. // *Cell. Mol. Life Sci.* 1997. V. 53. P. 667–672.
9. Gardner C.R., Müller D.M.J. // *Am. J. Bot.* 1981. V. 68. P. 87–95.
10. Lechowski Z., Mej E., Bialczyk J. // *Environmental and Experimental Botany*. 2006. V. 56. P. 239–244.
11. Lasceve G., Gaugain F. // *J. Plant Physiol.* 1990. V. 136. P. 723–727.
12. Vavasseur A., Gautier H., Thibaud M., Lasceve G. // *J. Plant Physiol.* 1991. V. 139. P. 90–94.
13. Latkowska E., Lechowski Z., Bialczyk J., Pilarski J. // *J. Chem. Ecol.* 2006. V. 32. P. 2053–2066.
14. Folmann G., Villagran V. // *Z. Naturforsch.* 1965. V. 20. P. 723–723.
15. Follmann G. // *Naturwissenschaften*. 1965. V. 52. P. 266.
16. Toledo Marante F.J., Garcia Castellano A., Estevez Rosas F., Quintana Aguiar J., Bermejo Barrera J. // *J. Chem. Ecol.* 2003. V. 29. P. 2049–2071.
17. Bouaid K., Vicent C. // *Ann. Bot. Fennici*. 1998. V. 35. P. 71–74.
18. Orus M.J., Estevez P., Vicente C. // *Physiol. Plant.* 1981. V. 52. P. 263–266.
19. Gimenez I., Vicente C. // *Phyton*. 1989. V. 49. P. 119–121.
20. Inoue H., Noguchi M., Kubo K. *The Oxygen Evolving System of Photosynthesis* / Eds Inoue Y., Crofts A., Govindje E., Murata N., Renger G., Satoh K. Tokyo: Academic Press, 1983. P. 351–356.
21. Inoue H., Noguchi M., Kullo K. // *Photosynthetica*. 1987. V. 21. P. 88–90.
22. Endo T., Takahagi T., Kinoshita Y., Yamamoto Y., Sato F. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998. V. 62. P. 2023–2027.
23. Legaz M.E., Monso M.A., Vicente C. // *Recent Res. Devel. Agron. Hortic*. 2004. V. 1. P. 1–10.
24. Emmerich R., Giez I., Lange O.L., Proksch P. // *Phytochemistry*. 1993. V. 33. P. 1389–1394.
25. Cetin H., Tufan-Cetin O., Turk A.O., Tay T., Candan M., Yanikoglu A., Sumbul H. // *Parasitol. Res.* 2008. V. 102. P. 1277–1279.
26. Cetin H., Tufan-Cetin O., Turk A.O., Tay T., Candan M., Yanikoglu A., Sumbul H. // *Natural Product Research*. 2011. V. 26. P. 350–355.
27. Shang X., Miao X., Lv H., Wang D., Zhang J., He H., Yang Z., Pan H. // *Parasitol. Res.* 2014. V. 113. P. 2387–2390.
28. Salloum A.I.O., Lucarini R., Tozatti M.G., Medeiros J., Silva M.L.A., Magalhães L.G., Cunha W.R. // *Planta Med.* 2012. V. 78. P1304.
29. Половинка М.П., Салахутдинов Н.Ф., Лузина О.А., Глунов В.В., Серебров В.В., Дубовский И.М., Мартымянов В.В., Крюков В.Ю. Применение усниновой кислоты в качестве синергиста инсектицидов на основе энтомопатогенных микроорганизмов: Патент на изобретение № 2328493 // Б.И. 2008. № 19.
30. Половинка М.П., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Крюков В.Ю., Ярославцева О.Н., Ходырев В.П., Глунов В.В. Синергист для повышения эффективности биопрепаратов против колорадского жука: Патент на изобретение № 2448464 // Б.И. 2012. № 12.
31. Mikoshiha K. // *Japan J. Med. Sci. IV. Pharmacol.* 1936. V. 9. P. 77–105.
32. Söderberg U. // *Acta Physiol. Scand.* 1953. V. 28. P. 202–210.
33. Virtanen O.E., Kärki N. // *Suom. Kemistilehti*. 1956. V. 29B. P. 225–226.
34. Kingsbury J.M. *Poisonous Plants of the United States and Canada*. NJ: Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1964. P. 86–87.
35. Hesbacher S., Baur B., Baur A., Proksch P. // *J. Chem. Ecol.* 1995. V. 21. P. 233–246.
36. Sundset M.A., Barboza P.S., Green T.K., Folkow L.P., Blix A.S., Mathiesen S.D. // *Naturwissenschaften*. 2010. V. 97. P. 273–278.
37. Hsu L.M., Huang Y.S., Chang F.Y., Lee S.D. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005. V. 20. P. 1138–1139.
38. Neff G.W., Reddy K.R., Durazo F.A., Meyer D., Marrero R., Kaplowitz N. // *J. of Hepatology*. 2004. V. 41. P. 1062–1064.
39. Sanchez W., Maple J.T., Burgart L.J., Kamath P.S. // *Mayo Clin. Proc.* 2006. V. 81. P. 541–544.
40. Durazo F.A., Lassman C., Han S.H.B., Saab S., Lee N.P., Kawano M., Saggi B., Gordon S., Farmer D.G., Yersiz H., Goldstein R.L.L., Ghobrial M., Busuttill R.W. // *Am. J. Gastroenterol.* 2004. V. 99. P. 950–952.
41. Frankos V.H. // *National Toxicology Program*. Washington, DC: Food and Drug Administration, Division of Dietary Supplement Programs (available at: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/UnsicAcid.pdf). 2005.
42. Guo L., Shi Q., Fang J.L., Mei N., Ali A.A., Lewis S.M., Leakey J.E., Frankos V.H. // *J. Environ. Sci. Health. Part C*. 2008. V. 26. P. 317–338.
43. Abo-Khatwa A.N., Al-Robai A.A., Al-Jawhari D.A. // *Natural Toxins*. 1996. V. 4. P. 96–102.
44. Pramyothin P., Janthasoot W., Pongnimitprasert N., Phrukudom S., Ruangrunsi N. // *J. Ethnopharmacol.* 2004. V. 90. P. 381–387.
45. Han D., Matsumaru K., Rettori D., Kaplowitz N. // *Biochem. Pharmacol.* 2004. V. 67. P. 439–445.

46. *Correche E.R., Enriz R.D., Piovano M., Garbarino J., Gomez-Lechon M.J.* // Alternatives to Laboratory Animals. 2004. V. 32. P. 605–615.
47. *Sonko B.J., Schmitt T.C., Guo L., Shi Q., Boros L.G., Leakey J.E.A., Beger R.D.* // Food Chem. Toxicol. 2011. V. 49. P. 2968–2974.
48. *Moreira C.T., Oliveira A.L., Comar J.F., Peralta R.M., Bracht A.* // Chem. Biol. Interact. 2013. V. 203. P. 502–511.
49. *Sahu S.C., O'Donnell M.W., Sprando R.L.* // J. Appl. Toxicol. 2012. V. 32. P. 739–749.
50. *Cheng Y.B., Wei L.L., Gu N., Si K.W., Shi L., Li X.Q., Li C., Yuan Y.K.* // Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2009. V. 29. P. 1749–1751.
51. *Lu X., Zhao Q., Tian Y., Xiao S., Jin T., and Fan X.* // Int. J. Toxicol. 2011. V. 30. P. 478–491.
52. *Al-Ahmadi A.A., Ayuob N.N., Ali S.S., Al-Robai A.A., Abo-Khatwa N.A.* // Journal of Animal and Veterinary Advances. 2012. V. 11. P. 1368–1377.
53. *Dailey R.N., Montgomery D.L., Ingram J.T., Siemion R., Vasquez M., Raisbeck M.F.* // Vet. Pathol. 2008. V. 45. P. 19–25.
54. *Yokouchi Y., Imaoka M., Niino N., Kiyosawa N., Sayama A., Jindo T.* // Toxicologic Pathology. 2013. P. 1–11.
55. *Marshak, A., Harting J.* // J. Cell. Comp. Physiol. 1948. V. 31. P. 321–325.
56. *Marshak A., Fager J.* // J. Cell. Comp. Physiol. 1950. V. 35. P. 317–329.
57. *Al-Bekairi A.M., Qureshi S., Chaudhry M.A., Krishna D.R., Shah A.H.* // J. Ethnopharmacol. 1991. V. 33. P. 217–220.
58. *Öztürk S., Güvenç S., Erikan N., Yılmaz Ö.* // Lagascalia. 1999. V. 21. P. 47–52.
59. *Ivanova V., Bačkor M., Dahse H.-M., Graefe U.* // Prep. Biochem. Biotechnol. 2010. V. 40. P. 377–388.
60. *O'Neill M.A., Mayer M., Murray K.E., Rolim-Santos H.M.L., Santos-Magalhaes N.S., Thompson A.M., Appleyard V.C.L.* // Braz. J. Biol. 2010. V. 70. P. 659–664.
61. *Kumar S., Müller K.* // J. Nat. Prod. 1999. V. 62. P. 821–823.
62. *Shibamoto T., Wei C.L.* // Environmental Mutagenesis. 1984. V. 6. P. 757–762.
63. *Leandro L.F., Munari C.C., Sato V.L., Alves J.M., de Oliveira P.F., Mastrocola D.F., Martins S., Moraes T., de Oliveira A.I., Tozatti M.G., Cunha W.R., Tavares D.C.* // Mutation Research. 2013. V. 753. P. 101–106.
64. *Polat Z., Aydin E., Türkez H., Aslan A.* // Toxicology and Industrial Health. 2013. P. 1–8.
65. *Mayer M., O'Neill M.A., Murray K.E., Santos-Magalhaes N.S., Carneiro-Leao A.M.A., Thompson A.M., Appleyard V.C.L.* // Anticancer Drugs. 2005. V. 16. P. 805–809.
66. *Koparal A.T., Tüylü B.A., Türk H.* // Nat. Prod. Res. 2006. V. 20. P. 1300–1307.
67. *Wiesner B.P., Yudkin J.* // Nature. 1955. V. 176. P. 249–250.
68. *Koçer. S., Uruş S., Cakır A., Güllüce M., Dıđrak M., Alan Y., Aslan A., Tümer M., Karadayı M., Kazaz C., Dal H.* // Dalton Transactions. 2014. V. 43. P. 6148–6164.
69. *Boehm F., Clarke K., Edge R., Fernandez E., Navaratnam S., Quilhot W., Rancan F., Truscott T.G.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2009. V. 95. P. 40–45.
70. *Joseph A., Lee T., Moland C.L., Branham W.S., Fuscoe J.C., Leakey J.E.A., Allaben W.T., Lewis S.M., Ali A.A., Desai V.G.* // Mitochondrion 2009. V. 9. P. 149–158.
71. *Liu Q., Zhao X., Lu X., Fan X., Wang Y.* // J. Agric. Food Chem. 2012. V. 60. P. 7312–7317.
72. *Kupchan S.M., Kopperman H.L.* // Experientia. 1975. V. 31. P. 625–752.
73. *Bezvin C., Tomasi S., Rouaud I., Delcros J.G., Boustie J.* // Planta Med. 2004. V. 70. P. 874–877.
74. *Periera E.C., Nascimento S.C., Lima R.C., Silva N.H., Oliveira A.F., Bandeira E., Boitard M., Beriel H., Vicente C., Legaz M.E.* // Tokai J. Exp. Clin. Med. 1994. V. 19. P. 47–52.
75. *Dias D.A., Urban S.* // Nat. Prod. Commun. 2009. V. 4. P. 959–964.
76. *Bačkorová M., Bačkor M., Mikeš J., Jendželovský R., Fedoročko P.* // Toxicol. In Vitro. 2011. V. 25. P. 37–44.
77. *Burlando B., Ranzato E., Volante A., Appendino G., Pollastro F., Verotta L.* // Planta Med. 2009. V. 75. P. 607–613.
78. *Brandão L.F.G., Alcantara G.B., Matos M.C., Bogo D., Freitas D., Oyama N.M., Honda N.K.* // Chem. Pharm. Bull. 2013. V. 63. P. 176–183.
79. *Brisdelli F., Perilli M., Sellitri D., Piovano M., Garbarino J.A., Nicoletti M., Bozzi A., Amicosante G., Celenza G.* // Phytother. Res. 2013. V. 27. P. 431–437.
80. *Hardardottir G., Ogmundsdottir H.M., Ingólfssdóttir K.* // Planta Med. 2006. V. 72. P. 050.
81. *Einarsdóttir E., Groeneweg J., Björnsdóttir G.G., Harðardóttir G., Omarsdóttir S., Ingólfssdóttir K., Ögmundsdóttir H.M.* // Planta Med. 2010. V. 76. P. 969–974.
82. *Bačkorová M., Jendželovský R., Kello M., Bačkor M., Mikeš J., Fedoročko P.* // Toxicology in Vitro. 2012. V. 26. P. 462–468.
83. *Rabelo T.K., Zeidán-Chuliá F., Vasques L.M., dos Santos J.P.A., da Rocha R.F., de Bittencourt Pasquali M.A., Rybarczyk-Filho J.L., Araújo A.A.S., Moreira J.C.F., Gelain D.P.* // Toxicology in Vitro. 2012. V. 26. P. 304–314.
84. *Singh N., Nambiar D., Kale R.K., Singh R.P.* // Nutrition and Cancer. 2013. V. 65. P. 36–43.
85. *Song Y., Dai F., Zhai D., Dong Y., Zhang J., Lu B., Luo J., Liu M., Yi Z.* // Angiogenesis. 2012. V. 15. P. 421–432.
86. *Ribeiro-Costa R.M., Alves A.J., Santos N.P., Nascimento S.C., Pereira E.C., Silva N.H., Honda N.K., Santos-Magalhaes N.S.* // J. Microencapsul. 2004. V. 21. P. 371–384.
87. *da Silva Santos N.P., Nascimento S.C., Wanderley M.S., Pontes-Filho N.T., da Silva J.F., de Castro C.M.,*

- Pereira E.C., da Silva N.H., Honda N.K., Santos-Magalhães N.S.* // Eur. J. Pharmac. and Biopharmac. 2006. V. 64. P. 154–160.
88. *Kristmundsdóttir T., Aradóttir H.A., Ingólfssdóttir K., Ógmundsdóttir H.M.* // J. Pharm. Pharmacol. 2002. V. 54. P. 1447–1452.
89. *Takai M., Uehara Y., Beisler J.A.* // J. Med. Chem. 1979. V. 22. P. 1380–1384.
90. *Sassa T., Igarashi M.* // Agric. Biol. Chem. 1990. V. 54. P. 2231–2237.
91. *Proksa B., Sturdikova M., Pronayova N., Liptaj T.* // Pharmazie. 1996. V. 51. P. 195–196.
92. *Millot M., Kaouadji M., Champavier Y., Gamond A., Simon A., Chulia A.J.* // Phytochemistry Letters. 2013. V. 6. P. 31–35.
93. *Natič M., Tešič Z., Anđelković K., Brčeski I., Radulović S., Manić S., Sladič D.* // Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem. 2004. V. 34. P. 101–113.
94. *Bazin M.-A., Le Lamer A.-C., Delcros J.-G., Rouaud I., Uriac P., Boustie J., Corbel J.-C., Tomasi S.* // Bioorg. Med. Chem. 2008. V. 16. P. 6860–6866.
95. *Bruno M., Trucchi B., Monti D., Romeo S., Kaiser M., Verotta L.* // ChemMedChem. 2013. V. 8. P. 221–225.
96. *Покровский А.Г., Покровский М.А., Лузина О.А., Соколов Д.Н., Салахутдинов Н.Ф.* Производные усниновой кислоты как противоопухолевые агенты: Патент на изобретение № 2536873 // Б.И. 2014. № 36.
97. *Vicente C., Azpiroz A., Estvez M.P., Gonzales L.* // Plant, Cell and Environment. 1978. V. 1. P. 29–33.
98. *Lawrey J.D.* // American Chemical Society Symposium Series. 1995. V. 582. P. 26–38.
99. *Vicente C., Cifuentes B.* // Cryptogamie, Bryol. Lichenol. 1981. V. 2. P. 213–222.
100. *Bialczyk J., Latkowska E., Lechowski Z.* // Allelopathy Journal. 2011. V. 28. P. 115–122.
101. *Cifuentes B., Vicente C.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1980. V. 95. P. 1550–1554.
102. *Gonzalez A., Cifuentes B.* // Phytochemistry. 1986. V. 25. P. 1063–1066.
103. *Arribas L., Vicente C.* // Current Enzyme Inhibition. 2008. V. 4. P. 180–185.
104. *Planelles V., Estrella Legaz M.* // Plant Science. 1987. V. 51. P. 9–16.
105. *Legaz M.E., Vicente C., Pedrosa M.M.* // J. Biochem. Molec. Biol. 2001. V. 34. P. 194–200.
106. *Bucar F., Schneider I., Ógmundsdóttir H., Ingólfssdóttir K.* // Phytomedicine. 2004. V. 11. № 7–8. P. 602–606.
107. *Cifuentes B., Vicente C.* // Cryptogam. Bryol. Lichenol. 1983. V. 4. P. 255–257.
108. *Seo C., Sohn J.H., Park S.M., Yim J.H., Lee H.K., Oh H.* // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. P. 710–712.
109. *Zakharenko A., Sokolov D., Luzina O., Sukhanova M., Khodyreva S., Zakharova O., Salakhutdinov N., Lavrik O.* // Medicinal Chemistry. 2012. V. 8. P. 883–893.
110. *Caviglia, A.M., Nicora, P., Giordani, P., Brunialti, G., & Modenesi, P.* // Il Farmaco. 2001. V. 37. P. 379–382.
111. *Buffoni-Hall R.S., Bornman J.F., Björn L.O.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2002. V. 66. P. 13–20.
112. *Nybakken L., Julkunen-Tiitto R.* // Lichenologist. 2006. V. 38. P. 477–485.
113. *Bjerke J.W., Lerfall K., Elvebakk A.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2002. V. 1. P. 678–685.
114. *BeGora M.D., Fahselt D.* // Bryologist. 2001. V. 104. P. 134–140.
115. *Rancan F., Rosan S., Boehm K., Fernandez E., Hidalgo M.E., Quihot W., Rubio C., Boehm F., Piazena H., Oltmanns U.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2002. V. 68. P. 133–139.
116. *Odabasoglu F., Cakir A., Suleyman H., Aslan A., Bayir Y., Halici M., Kazaz C.* // Journal J. Ethnopharmacol. 2006. V. 103. P. 59–65.
117. *Sharma J., Gupta S.S., Kumar B.P., Upreti D.K., Khare R., Rao C.V.* // International Journal of Experimental Pharmacology. 2014. V. 4. P. 55–60.
118. *Kohlhardt-Floehr C., Boehm F., Troppens S., Lademann J., Truscott T.G.* // Journal J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 2010. V. 101. P. 97–102.
119. *Polat Z., Aydin E., Türkez H., Aslan A.* // Toxicology and Industrial Health. 2013. P. 1–8.
120. *Behera B.C., Mahadik N., Morey M.* // Pharmaceutical Biology. 2012. V. 50. P. 968–979.
121. *Atalay F., Halici M.B., Mavi A., Çakir A., Odabaşoğlu F., Kazaz C., Aslan A., Küfrevioğlu Ö.I.* // Turk. J. Chem. 2011. V. 35. P. 647–661.
122. *Kumar S., Müller K.* // J. Nat. Prod. 1999. V. 62. P. 817–820.
123. *Santos L.C., Honda N.K., Carlos I.Z., Vilegas W.* // Fitoterapia. 2004. V. 75. P. 473–479.
124. *Jin J., Li C., He L.* // Phytotherapy Res. 2008. V. 22. P. 1605–1609.
125. *Boehm F., Clarke K., Edge R., Fernandez E., Navaratnam S., Quilhot W., Rancan F., Truscott T.G.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2009. V. 95. P. 40–45.
126. *Valencia-Islas N., Zambrano A., Rojas J.L.* // J. Chem. Ecol. 2007. V. 33. P. 1619–1634.
127. *Thadhani V.M., Choudhary M.I., Ali S., Omar I., Siddique H., Karunaratne V.* // Natural Product Research. 2011. V. 25. P. 1827–1837.
128. *Thune P., Solberg Y., McFadden N., Staerfeld F., Sandberg M.* // Contact Dermatitis. 1982. V. 8. P. 396–400.
129. *Dahlquist I., Fregert S.* // Contact Dermatitis. 1980. V. 6. P. 111–119.
130. *Sheu M., Simpson E.L., Law S.V., Storrs F.J.* // J. Am. Academy of Dermatology. 2006. V. 55. P. 332–337.
131. *Heine A.* // Derm. Monatsschr. 1987. V. 173. P. 221–225.
132. *Gonçalo S.* // Contact Dermatitis. 1987. V. 16. P. 84–86.
133. *Gonçalo S., Cabral F., Gonçalo M.* // Contact Dermatitis. 1988. V. 19. P. 335–357.

134. *Mitchell J.C., Maibach H.I.* // *Acta Dermato-Venereologica*. 1969. V. 49. P. 498–500.
135. *Hausen B.M., Emde L., Marks V.* // *Contact Dermatitis*. 1993. V. 28. P. 70–76.
136. *Mitchell J.C.* // *J. Invest. Derm.* 1966. V. 47. P. 167.
137. *Salo H., Hannuksela M., Hausen B.M.* // *Contact Dermatitis*. 1981. V. 7. P. 9–13.
138. *Rafanelli S., Bacchilega R., Stanganelli I., Rafanelli A.* // *Contact Dermatitis* 1995. V. 33. P. 271–272.
139. *Thune P.O., Solberg Y.J.* // *Contact Dermatitis*. 1980. V. 6. P. 64–71.
140. *Pacheco D., Travassos A.R., Antunes J., Soares de Almeida L., Filipe P., Correia T.* // *Allergologia et Immunopathologia*. 2014. V. 42. P. 80–82.
141. *Krishna D.R., Venkataramana D.* // *Drug Metab. Dispos.* 1992. V. 20. P. 909–911.
142. *Venkataramana D., Krishna D.R.* // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 1993. V. 18. P. 161–163.
143. *Foti R.S., Dickmann L.J., Davis J.A., Greene R.J., Hill J.J., Howard M.L., Pearson J.T., Rock D.A., Tay J.C., Wahlstrom J.L., Slatter J.G.* // *Xenobiotica*. 2008. V. 38. P. 264–280.
144. *Krishna D.R., Ramana D.V., Mamidi N.V.* // *Drug Metabol. Drug Interact.* 1995. V. 12. P. 53–63.
145. *Bandoni R.J., Towers G.H.N.* // *Canadian Journal of Biochemistry*. 1967. V. 45. P. 1197–1201.
146. *Kutney J.P., Ebizuka Y., Salisbury P.J., Watt C.K., Towers G.* // *Phytochemistry*. 1978. V. 17. P. 49–52.
147. *Vicente C., Gonzalez A., Legaz M.E.* // *Biochem. Syst. Ecol.* 1986. V. 14. P. 263–266.
148. *Avalos A., Vicente C.* // *Plant Physiol.* 1987. V. 84. P. 803–807.
149. *Shi Q., Greenhaw J., Salminen W.F.* // *J. Appl. Toxicol.* 2014. V. 34. P. 835–840.

Biological Activity of Usnic Acid and Its Derivatives Part 2: Effects on Higher Organisms, Molecular and Physicochemical Aspects of Biological Activity

O. A. Luzina[#], N. F. Salakhutdinov

[#]Phone: +7(383)330-88-70; e-mail: luzina@nioch.nsc.ru

Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Lavrentjeva 9, Novosibirsk, 630090 Russia

Usnic acid (UA) – available lichen metabolite, its biological activity is varied and of interest for the pharmacopoeia. The second part of review is dedicated to the biological activity of usnic acid (UA) and its derivatives with respect to the higher organisms. The effects exhibited by the UA at the cellular level, molecular and physicochemical aspects of its biological activity are presented. The review paid attention to the possibility of changing the biological activity of UA by changing its bioavailability or modification the structure of the molecule.

Keywords: usnic acid, biological activity, phytotoxicity, cytotoxicity, antioxidant, pharmacokinetics