

УДК 615.322:576.385.5

Р. Ф. ЕРЕМЕНКО, Л. Н. МАЛОШТАН, О. М. ШАТАЛОВА

Национальный фармацевтический университет

ИЗУЧЕНИЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ НА МОДЕЛЯХ IN VITRO

Исследуемый экстракт из травы люцерны посевной проявляет антипролиферативное действие на модели in vitro в культуре гормонозависимых опухолевых клеток человека линий: MCF-7, MDA-MB-231, SiHa. Цитотоксический эффект экстракта из травы люцерны посевной в отношении опухолевых клеток носил дозозависимый характер и был наиболее ярко выражен в дозе 1 мкг/мл.

Ключевые слова: фармакология; эстрогензависимые опухолевые клетки; фитоэстрогены; люцерна

ВСТУПЛЕНИЕ

В последнее время повышенный интерес вызывают изофлавоны: генистеин, даидзеин, глицитеин, что обусловлено возможным положительным действием этих веществ на организм, а также перспективами создания новых на их основе высокоактивных лекарственных препаратов, обладающих противовоспалительной, антиканцерогенной, противовирусной, антипаразитарной или бактерицидной активностью. Так известно, что в люцерне посевной кроме генистеина и даидзеина присутствуют изофлавоны биоханин А и формонетин, которые также представлены в виде гликозидов ононина и сиссортинна [1, 2, 4, 13]. Изофлавоны являются нестероидными миметиками эстрогенов, называемых фитоэстрогенами. Хорошо известна антиканцерогенная активность генистеина [5, 18], в том числе и в лечении рака молочной железы [15]. Генистеин представляет собой ингибитор тирозинкиназы, который ингибирует пролиферацию как эстроген-позитивных, так и эстроген-негативных линий клеток рака молочной железы [5, 14]. Пищевые изофлавоны рассматриваются как возможная альтернатива гормональным препаратам в лечении множества заболеваний. Они способны подавлять рост опухолей у животных [11] и усиливать действие таких агентов, как моноклональные антитела против фактора роста эпителия [9] и селен [8]. Считается, что изофлавоны могут вызывать гибель клеток рака также посредством мобилизации способности присутствующих в опухоли ионов меди генерировать активные продукты окисления [17] благодаря влиянию на экспрессию генов супрессора опухоли в раковых клетках [6]. Однако необхо-

димо помнить, что фитоэстрогены способны подавлять активность некоторых изоформ цитохромов P450, что может модифицировать действие других лекарственных веществ. Кроме того, недавние исследования свидетельствуют, что генистеин способен усиливать рост опухоли простаты и инициировать процессы метастазирования во вторичные органы вследствие усиления пролиферации и снижения апоптоза раковых клеток [10]. Генистеин способен индуцировать экспрессию фермента ароматазы, присутствующей в клетках рака молочной железы. Этот фермент отвечает за биосинтез эстрогенов, и его экспрессия может способствовать росту клеток опухоли [16]. Кроме того, было показано, что даже низкие дозы генистеина, поступающие с пищей, способны препятствовать проявлению терапевтического действия антиракового агента тамоксифена, являющегося антагонистом рецептора эстрогенов [7].

Представленные литературные данные свидетельствуют о неоднозначности эффектов изофлавоноидов, в связи с чем данное исследование представляет особый интерес. Основанием для этого исследования послужил богатый фитохимический состав экстракта из травы люцерны посевной (ЭТЛП), а в особенности наличие в составе изофлавоноидов. ЭТЛП, полученный на кафедре фармакогнозии НФаУ под руководством проф. В. Н. Ковалева, по результатам хроматографического и фитохимического исследований [1, 2] кроме изофлавоноидов содержит такие фенольные соединения как гидроксикоричные кислоты, кумарины, эуфлавоноиды и дубильные вещества.

Целью исследования было изучение влияния экстракта из травы люцерны посевной на пролиферацию опухолевых гормонозависимых клеток на моделях in vitro для оценки возможного цитотоксического противоопухолевого эффекта.

Таблица

**ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ IN VITRO ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКСТРАКТА
ИЗ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ В РАЗЛИЧНЫХ ДОЗАХ, %**

Доза ЭТЛП, мкг/мл	5	1	0,2	0,04	0,0008
MCF-7 без гормонов	+13,80	-17,90	На уровне контроля	+6,20	На уровне контроля
MCF-7 с гормонами	-60,98	-72,15	-55,49	-34,30	-58,48
SiHa без гормонов	-40,10	-55,9	На уровне контроля	На уровне контроля	На уровне контроля
SiHa с гормонами	-91,10	-94,26	-81,11	-80,40	-80,40
MDA-MB-231 без гормонов	+37,29	На уровне контроля	+62,70	+81,90	+38,50
MDA-MB-231 с гормонами	-85,34	-88,65	-74,46	-83,10	-82,76

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на базе кафедр токсикологии Познаньского медицинского университета (Польша) им. Кароля Марцинковского под руководством проф. М. Муриуса. В эксперименте использовали гормонозависимые клеточные культуры опухолевых клеток человека линий MCF-7 (эстроген-позитивная ER+ и прогестеронпозитивная PR+ аденокарцинома протоков молочной железы человека), MDA-MB-231 (рак молочной железы), SiHa (клетки чешуйчато-клеточной карциномы шейки матки). Клетки культивировали при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин (2 мМ), смесь антибиотиков PISIG (производства Sigma). Клетки после размножения культивировали в пластиковых матцах площадью 25 см² в течение 1 недели со сменой среды каждые 3 дня, и по достижении монослоя производили пересев на 24-луночные планшеты с плотностью 8000 клеток на лунку. Пролиферативную активность клеток в культуре на планшетах под влиянием экстракта люцерны посевной в различных дозах оценивали с помощью Alamar blue теста [12] и выражали в условных единицах флуоресценции (УЕФ). Alamar Blue-анализ основан на преобразовании резазурина во флуоресцентное вещество резорурфин при снижении жизнеспособности клеток. Активный компонент индикатора (резазурин) является нетоксичным, проникающим через мембраны веществом синего цвета (нефлуоресцентным). При попадании в клетку резазурин преобразуется в резорурфин, который обладает яркой флуоресценцией в красной области. Живые клетки способны непрерывно преобразовывать резазурин в резорурфин, тем самым формируя количественный сигнал. Клетки культивировали в среде на основе DMEM с добавлением гормонов (как стимуляторов клеточной пролиферации) и без содержания гормонов (в параллельном опыте) в течение 72 часов. После этого производили измерение интенсивности флуоресценции на детекторе биолуминесценции Xenogen. Контролем служили клетки, которые культивировали в средах с гормонами и без гормонов (в параллельных опы-

тах) после добавления индикатора Alamar blue. Исследования влияния ЭТЛП на пролиферацию клеток в культуре выполняли в два независимых эксперимента с 4-мя образцами для каждой концентрации. Для определения действия ЭТЛП на рост колоний клеток опухолевых культур были выбраны концентрации: 5; 1; 0,2; 0,04 и 0,0008 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты показывают, что при культивировании в среде с добавлением гормонов под действием ЭТЛП в исследованном интервале концентраций (5, 1, 0,2, 0,04 и 0,0008 мкг/мл) происходит однонаправленное ингибирование роста колоний клеток всех используемых линий: SiHa (клетки чешуйчато-клеточной карциномы шейки матки), MCF-7 и MDA-MB-231 (рак молочной железы) по сравнению с контролем, о чем свидетельствует выраженное уменьшение биофлуоресценции в ячейках под влиянием исследуемого экстракта. Цитотоксический эффект носит дозозависимый характер. Ингибирование роста колоний более 50 % по результатам Alamar blue теста для клеток MCF-7 отмечено в дозах 5 мкг/мл и 1 мкг/мл при культивировании в среде с добавлением гормонов.

Результаты угнетения пролиферации клеток в культурах по сравнению с контролем представлены в таблице.

В то же время для клеток SiHa в среде с гормонами антипролиферативный эффект зарегистрирован во всех исследуемых дозах, однако наиболее значимым он был в дозировке 1 мкг/мл (94,26 %). Максимальное ингибирование роста и пролиферации под влиянием ЭТЛП в дозе 1 мкг/мл наблюдалось и со стороны клеточной культуры MDA-MB-231 (88,65 %), в связи с чем доза ЭТЛП 1 мкг/мл на данных клеточных моделях оценена как эффективная.

Напротив, при культивировании клеток MDA-MB-231 в среде без гормонов отмечались неоднозначные изменения: умеренная стимуляция пролиферации в дозах 0,2 и 0,04 мкг/мл (заместительное эстрогеноподобное действие изофлавоноидов люцерны); отсутствие влияния ЭТЛП в дозе 0,04 мкг/мл на пролиферацию клеток MCF-7 в среде без гормонов, стиму-

ляция пролиферации в дозах 0,2, 0,04, 0,0008 мкг/мл. Похожие результаты относительно активности изофлавоноидов встречаются в литературе [11]. Следует отметить достоверное подавление пролиферации SiHa под действием ЭТЛП в дозе 1 мкг/мл при совместном культивировании в среде без гормонов за счет конкурентного антиэстрогенного действия изофлавоноидов люцерны.

Таким образом, анализ сравнительной эффективности ЭТЛП показал наиболее выраженный цитотоксический эффект на клетках культур SiHa и менее выраженный на клетках линии MCF-7 и MDA-MB-231, что может объясняться культуральными и морфологическими особенностями данных клеток [4].

В дальнейшем целесообразно более детальное изучение экстракта люцерны посевной с целью выяснения механизмов действия его компонентов.

ВЫВОДЫ

1. Исследуемый экстракт из травы люцерны посевной проявляет антипролиферативное действие на модели *in vitro* в культуре гормонозависимых опухолевых клеток человека линий MCF-7, MDA-MB-231, SiHa.
2. При культивировании клеток в среде, содержащей гормоны, экстракт из травы люцерны посевной умеренно подавляет пролиферацию клеток. В то же время воздействие экстракта на рост и пролиферацию опухолевых клеток в культуральной среде без добавления гормонов неоднозначно.
3. Цитотоксический эффект экстракта из травы люцерны посевной в отношении опухолевых клеток в эксперименте *in vitro* носил дозозависимый характер и был наиболее выражен в дозе 1 мкг/мл. Полученный эффект может объясняться конкурентным связыванием изофлавоноидов люцерны с рецепторами эстрогензависимых клеток и подтверждать противоопухолевое действие фитоэстрогенов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Ковальов С. В. Дослідження фенольного комплексу з трави люцерни посівної / [С. В. Ковальов, А. М. Ковальова, Р. Ф. Єрьоменко та ін.] // Фармац. часопис. – 2008. – № 2 (6). – С. 27-30.
2. Ковальов С. В. Кількісне визначення фенольних сполук у траві люцерни посівної / С. В. Ковальов, Р. Ф. Єрьоменко, Л. М. Малоштан // Фармаком. – 2008. – № 4. – С. 35-38.
3. Тараховский Ю. С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрашилов, Е. Н. Музафаров. – Пушино: Synchronbook, 2013. – 310 с.
4. Шевченко В. Е. Картирование протеома лизата линии опухолевых клеток MCF-7 для идентификации потенциальных маркеров рака молочной железы / [В. Е. Шевченко, М. А. Таипов, С. В. Ковалев и др.] // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2012. – № 2. – С. 5-10.
5. Akiyama T. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases / [T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa et al.] // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262. – P. 5592-5595.
6. Chen Y. MicroRNAs 221/222 and genistein-mediated regulation of ARHI tumor suppressor gene in prostate cancer / [Y. Chen, M. S. Zaman, G. Deng et al.] // Cancer Prev. Res. – 2011. – Vol. 4. – P. 76-86.
7. Du M. Low-dose dietary genistein negates the therapeutic effect of tamoxifen in athymic nude mice / [M. Du, X. Yang, J. A. Hartman et al.] // Carcinogenesis. – 2012. – Vol. 33. – P. 895-901.
8. Hamdy S. M. Prevention of rat breast cancer by genistin and selenium / [S. M. Hamdy, A. K. Latif, E. A. Drees et al.] // Toxicol. Ind. Health. – 2011. – Vol. 28. – P. 746-757.
9. Lattrich C. Additive effects of trastuzumab and genistein on human breast cancer cells / [C. Lattrich, J. Lubig, A. Springwald et al.] // Anticancer Drugs. – 2011. – Vol. 22. – P. 253-261.
10. Lazarevic B. Efficacy and safety of short-term genistein intervention in patients with localized prostate cancer prior to radical prostatectomy: a randomized, placebo-controlled, double-blind Phase 2 clinical trial / [B. Lazarevic, G. Boezelijn, L. M. Diep et al.] // Nutr. Cancer. – 2011. – Vol. 63. – P. 889-898.
11. Nebe B. Influence of phytoestrogens on the proliferation and expression of adhesion receptors in human mammary epithelial cells *in vitro* / B. Nebe // Eur. J. Cancer Prev. – 2006. – Vol. 15 (5). – P. 405-415.
12. O'Brien J. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity / [J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton et al.] // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267 (17). – P. 5421-5426.
13. Rowland I. Bioavailability of phyto-oestrogens / I. Rowland // Br. J. Nutr. – 2003. – Vol. 89, Suppl. 1. – P. 45-58.
14. Sahin K. Inhibitory effects of combination of lycopene and genistein on 7,12-dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in rats / [K. Sahin, M. Tuzcu, N. Sahin et al.] // Nutr. Cancer. – 2011. – Vol. 63. – P. 1279-1286.
15. Sotoca A. M. Quantitative proteomics and transcriptomics addressing the estrogen receptor subtype-mediated effects in T47D breast cancer cells exposed to the phytoestrogen genistein / [A. M. Sotoca, M. D. Gelpke, S. Boeren et al.] // Mol. Cell Proteomics. – 2011. – Vol. 10. – P. 110.
16. Van Duursen M. B. Genistein induces breast cancer-associated aromatase and stimulates estrogen-dependent tumor cell growth in *in vitro* breast cancer model / [M. B. Van Duursen, S. M. Nijmeijer,

- E. S. de Morree et al.] // Toxicol. – 2011. – Vol. 289. – P. 67-73.
17. Ullah M. F. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species / [M. F. Ullah, A. Ahmad, H. Zubair et al.] // Mol. Nutr. Food Res. – 2011. – Vol. 55. – P. 553-559.
18. Wahajuddin. Disposition of Pharmacologically Active Dietary Isoflavones in Biological Systems / [Wahajuddin, I. Taneja, S. Arora et al.] // Curr. Drug Metab. – 2013. – Vol. 14. – P. 369-380.

УДК 615.322:576.385.5**Р. Ф. Єрьоменко, Л. М. Малоштан, О. М. Шаталова****ВИВЧЕННЯ АНТИПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ НА МОДЕЛЯХ IN VITRO**

Досліджуваний екстракт з трави люцерни посівної проявляє антипроліферативну дію на моделі in vitro в культурі гормонозалежних пухлинних клітин людини ліній: MCF-7, MDA-MB-231, SiHa. Цитотоксичний ефект екстракту з трави люцерни посівної відносно пухлинних клітин носив дозозалежний характер і був найбільш яскраво виражений в дозі 1 мкг/мл.

Ключові слова: фармакологія; естрогенозалежні пухлинні клітини; фітоестрогени; люцерна

UDC 615.322:576.385.5**R. F. Yeriomenko, L. N. Maloshtan, O. M. Shatalova****STUDY OF ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF EXTRACT OF MEDICAGO SATIVA SOWING GRASS ON IN VITRO MODELS**

The observable extract of medicago sativa sowing grass displays the antiproliferative effect on the in vitro models in the culture of hormone-dependent tumorous human cells lines: MCF-7, MDA-MB-231, SiHa. The cytotoxic effect of the extract of medicago sativa sowing grass regarding the tumorous cells had a dose-dependent nature and was most expressed at a dose of 1 mcg / ml.

Key words: pharmacology; estrogen-dependent tumorous cells; phytoestrogen; medicago sativa sowing grass

Адрес для переписки:

61002, г. Харьков, ул. Мельникова, 12.

Тел. (057) 7063073.

Национальный фармацевтический университет

Поступила в редакцию

05.12.2014 г.