

© Шаталова О.М.

УДК 582.739: 615.322

Шаталова О.М.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОФИЛЬНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ СОИ ЩЕТИНИСТОЙ

**Национальный фармацевтический университет
(г. Харьков)**

shatalov_leha@mail.ru

Данная работа выполнена в соответствии с планом НИР Национального фармацевтического университета «Создание новых лекарственных препаратов на основе растительного и природного сырья, продуктов пчеловодства для взрослых и детей» (№ государственной регистрации 0198U007008), а также в рамках национальной программы «Соя Украины» в соответствии с планом работ Государственного комитета Украины по вопросам науки, техники и отраслевой политики.

Вступление. Гидрофильный экстракт из травы сои (ГЭТС) получен на каф. химии природных соединений НФаУ под руководством проф. В.С. Кисличенко. В его состав, по результатам хроматографического анализа, входят гидроксикоричные кислоты, дубильные вещества, изофлавоноиды (генистеин, дайдзеин, глицитеин) [2]. По данным литературы, хорошо известна антиканцерогенная активность изофлавоноидов сои. [1, 3, 4, 7, 8, 10]. В механизме цитостатического и противоопухолевого эффектов изофлавонов первостепенную роль играет ингибирование активности тирозинкиназы, топоизомеразы II, орнитиндекарбоксилазы, снижение концентрации полиаминов, участвующих в канцерогенезе [6]. Дайдзеин способствует дифференциации клеток линии HL60, что снижает их злокачественность [1]. Ростингибиторный эффект генистеина представляет собой сумму цитостатического и апоптозного эффектов [9, 12, 13]. Генистеин влияет на экспрессию большого числа генов, в том числе стрессовых, участвующих в регуляции клеточного цикла, роста, сигнальной трансдукции, апоптоза опухолевых клеток, а также ангиогенеза, опухолевой инвазии и метастазирования. Он ингибирует экспрессию протоонкогена cAfos, стимулируемую тирозинкиназой. Установлено, что генистеин снижает экспрессию 774 генов и увеличивает экспрессию 58 генов из 12 558 изученных [7, 4]. Особенно значителен эффект генистеина в отношении гормонозависимых опухолей. Благодаря своему структурному сходству с эндогенными эстрогенами изофлавоны сои способны связываться с рецепторами эстрогенов в тканях и давать слабый эстрогенный эффект. С другой стороны, из-за структурных отличий связь изофлавонов с рецепторами эстрогенов (по типу антиметаболитов) более длительна; занимая рецепторы, изофлавоны тем самым ограничивают активность эстрогенов, что вызывает антиэстрогенный эффект [1]. Генистеин на

50% ингибирует связывание эстрадиола с эстрогенным рецептором. Низкие концентрации генистеина (10^{-8} – 10^{-6} М) стимулируют рост клеток рака молочной железы мышей (MCF7), а в концентрациях 10^{-5} М и выше наблюдается ингибирование роста опухолей [5, 13, 9]. Представленные литературные данные свидетельствуют о разнонаправленности эффектов изофлавоноидов сои, в связи с этим данное исследование представляет особый интерес.

Целью представленного исследования было изучить влияние гидрофильного экстракта из травы сои щетинистой (*Glycine hispida*) на пролиферацию опухолевых гормонозависимых клеток на моделях *in vitro* для оценки возможного цитотоксического противоопухолевого эффекта.

Объект и методы исследования. Исследования были проведены на базе кафедры токсикологии Познанского медицинского университета (Польша). В эксперименте использовали гормонозависимые клеточные культуры опухолевых клеток человека следующих линий: MCF-7 (эстрогенпозитивная 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 (2мМ), смесь антибиотиков PISIG (производства Sigma). Клетки после размножения культивировали в пластиковых матрасах 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 ГЭТС в различных дозах оценивали с помощью Alamar blue теста [11] 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

Таблица

Пролиферация клеток опухолевых культур в условиях in vitro под влиянием ГЭТС, (условные единицы флюоресценции)

Модельные культуры	Контроль (0)	ГЭТС, мг/мл				
		5	1	0,2	0,04	0,0008
MCF-7 без гормонов	3,75 ±0,26	3,20 ±0,18	3,07 ±0,19	1,67 ±0,15*	3,85 ±0,49	3,52±0,35
MCF-7 с гормонами	10,65 ±1,16	4,650 ±0,59*	4,02 ±0,43*	1,91 ±0,19*	3,37 ±0,48*	3,67 ±0,47*
SiHa без гормонов	6,42 ±0,28	3,57 ±0,27*	4,65 ±0,40*	3,97 ±0,40*	9,25 ±0,75*	8,47 ±0,83*
SiHa с гормонами	62,75 ±5,02	5,50 ±0,45*	7,42 ±0,75*	3,20 ±0,42*	3,42 ±0,31*	4,92 ±0,83*
MDA-MB-231 без гормонов	3,37 ±0,29	2,27 ±0,29	4,10 ±0,36	2,07 ±0,21*	4,92 ±0,38*	4,85 ±0,56
MDA-MB-231 с гормонами	25,25 ±3,40	4,30 ±0,46*	4,32 ±0,54*	2,23 ±0,11*	3,48 ±0,19*	3,38 ±0,15*

Примечание: * – P ≤ 0,05 по отношению к контролю.

культивировали в среде на основе ДМЕМ 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 биолюминесценции Хепоген. Контролем служили клетки, которые культивировали в средах с гормонами и без гормонов (в параллельных опытах) после добавления индикатора Alamar blue. Исследования влияния ГЭТС на пролиферацию клеток в культуре выполняли в два независимых эксперимента с 4-мя образцами для каждой концентрации. Для определения действия ГЭТС на рост колоний клеток опухолевых культур были выбраны концентрации: 5; 1; 0,2; 0,04 и 0,0008 мкг/мл.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенного эксперимента было установлено, что в контроле при культивировании клеток одноименных линий в среде без гормональной стимуляции отмечается снижение пролиферативной активности по сравнению с одноименной культурой, подвергшейся гормональной стимуляции в составе среды. Эти данные свидетельствуют о высокой гормональной чувствительности тестируемых клеточных культур. Под действием ГЭТС в всех исследуемых концентрациях при культивировании в среде с добавлением гормонов происходит ингибирование пролиферации клеток всех используемых линий: SiHa, MCF-7 и MDA-MB-231, по сравнению с контролем. О чем свидетельствует выраженное уменьшение биофлюоресценции в ячейках под влиянием исследуемого экстракта. Максимальный ростиингибиторный эффект экстракта из травы сои щетинистой в отношении данных опухолевых клеток был зарегистрирован в дозе 0,2 мкг/мл. Так под влиянием ГЭТС в этой дозе отмечено угнетение пролиферации клеток линии MCF7 в 5,57 раза, MDA-MB-231 в 11,1 раза и SiHa в 19,6 раза в сравнении с контролем.

Результаты Alamar blue теста под влиянием ГЭТС в сравнении с контролем представлены в **таблице**.

При культивировании данных клеточных линий в среде без добавления гормонов в присутствии ГЭТС получен неоднозначный эффект. На культуру клеток MCF7 в среде без гормонов ГЭТС оказывает влияние

лишь в концентрации 0,2 мкг/мл, угнетая пролиферацию клеток в 2,2 раза. При этом указанная доза уменьшает пролиферацию клеток линии SiHa в 1,61 раза и MDA-MB-231 в 1,62 раза.

Выводы. Исследуемый гидрофильный экстракт из травы сои щетинистой проявляет антипролиферативное действие на модели in vitro в культуре гормонозависимых опухолевых клеток человека линий MCF-7 (рак молочной железы), MDA-MB-231 (рак молочной железы), SiHa (клетки чешуйчато-клеточной карциномы шейки матки), что свидетельствует в пользу его антиканцерогенной активности.

Цитотоксический эффект экстракта из травы сои щетинистой в отношении опухолевых клеток MCF-7, MDA-MB-231, SiHa в эксперименте in vitro был максимально выражен в дозе 0,2 мкг/мл, поэтому данная доза считается эффективной.

Перспективы дальнейших исследований. Представленные экспериментальные данные позволяют в дальнейших исследованиях антиканцерогенных свойств ГЭТС использовать в диапазоне доз близких к 0,2 мкг/мл. В перспективе было бы целесообразно проведение исследований антиканцерогенных свойств экстракта из травы сои щетинистой на моделях ксенотрансплантанта рака у мышей in vivo.

Литература

1. Барабой В. А. Изофлавоны сои: биологическая активность и применение / В. А. Барабой // Бiотехнологiя. – 2009. – № 3, Т. 2. – С. 44-54.
2. Карпюк У.В. Стандартизація густого екстракту з трави сої щетинистої та вивчення його анаболічної активності / У.В. Карпюк, О.М. Шаталова, Р.Ф. Єрьоменко [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – № 3 (10). – С. 38-43.
3. Apprey C. Anti-proliferative Effect of Isoflavones Isolated from Soybean and Soymilk Powder on Lymphoma (DG 75) and Leukemia (CEM) Cell Lines / С. Apprey, С. Larbie, F. Arthur, R. Appiah-Opong // British Journal of Pharmaceutical Research. – 2015. – № 7 (3). – P. 206-216.

- Chen Y. MicroRNAs 221/222 and genistein-mediated regulation of ARHI tumor suppressor gene in prostate cancer / Y. Chen, M. Zaman, G. Deng [et al.] // *Cancer Prev. Res. (Phila.)*. – 2011. – № 4. – P. 76–86.
- Cho E. J. Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ER α expression and induction of apoptosis / E. J. Cho // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2014. – № 8. – P. 454–459.
- Hawrylewicz E. J. Soy and experimental cancer: animal studies / E. J. Hawrylewicz, J. J. Zapata, W. H. Blair // *J. Nutr.* – 1995. – № 125 (3) – P. 698–708.
- Hess D. Genistein downregulates de novo lipid synthesis and impairs cell proliferation in human lung cancer cells / D. Hess, R.A. Igal // *Exp. Biol. Med.* – 2011. – № 236. – P. 707–713.
- Latrich C. Additive effects of trastuzumab and genistein on human breast cancer cells / C. Latrich, J. Lubig, A. Springwald [et al.] // *Anticancer Drugs*. – 2011. – № 22. – P. 253–261.
- Lucki N.C. Genistein stimulates MCF-7 breast cancer cell growth by inducing acid ceramidase (ASAH1) gene expression / N.C. Lucki, M.B. Sewer // *J. Biol. Chem.* – 2011. – № 286. – P. 19399–19409.
- Messina M. J. Emerging evidence on the role of soy in reducing prostate cancer risk / M. J. Messina // *Nutr. Revs.* – 2003. – № 61. – P. 117–131.
- 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. – № 17. – P. 5421–5426.
- Ullah M. Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions and generation of reactive oxygen species / M. Ullah, A. Ahmad, H. Zubair [et al.] // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2011. – № 55. – P. 553–559.
- Wang T. J. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein / T.J. Wang, M. Sathyamoorthy, J.M. Phang // *Carcinogenesis*. – 1996. – № 17. – P. 271–275.

УДК 582.739: 615.322

ВИВЧЕННЯ АНТИПРОЛІФЕРАТИВНОЇ АКТИВНОСТІ ГІДРОФІЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ СОЇ ЩЕТИНИСТОЇ

Шаталова О.М.

Резюме. Проведено фармакологічне вивчення антипроліферативної активності гідрофільного екстракту з трави сої щетинистої (*Glycine hispida*) на моделі *in vitro* в культурі гормонозалежних пухлинних клітин людини ліній MCF-7, MDA-MB-231, SiHa. Експериментально встановлено, що досліджуваний екстракт з трави сої має антипроліферативну дію відносно модельних пухлинних клітин. Цитотоксичний ефект екстракту з трави сої щетинистої в представленому експерименті був максимально виражений в дозі 0,2 мг/мл.

Ключові слова: фармакологія, екстракт трави сої.

УДК 582.739: 615.322

ИЗУЧЕНИЕ АНТИПРОЛІФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ГИДРОФИЛЬНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ СОИ ЩЕТИНИСТОЙ

Шаталова О.М.

Резюме. Проведено фармакологическое изучение антипролиферативной активности гидрофильного экстракта из травы сои щетинистой (*Glycine hispida*) на модели *in vitro* в культуре гормонозависимых опухолевых клеток человека линий: MCF-7, MDA-MB-231, SiHa. Экспериментально установлено, что исследуемый экстракт из травы сои проявляет антипролиферативное действие в отношении модельных опухолевых клеток. Цитотоксический эффект экстракта из травы сои щетинистой в представленном эксперименте был максимально выражен в дозе 0,2 мг/мл.

Ключевые слова: фармакология, экстракт травы сои.

UDC 582.739: 615.322

Type Study of Antiproliferative Activity of Hydrophilic Extract from *Glycine Hispida* Grass

Shatalova O.M.

Abstract. The pharmacological study of the antiproliferative activity of the hydrophilic extract of soy (*Glycine hispida*) grass (HESG) on *in vitro* model was carried out. The aim of the present study was to investigate the effect of HESG on the proliferation of tumor hormone-dependent cell to assess possible cytotoxicity anti-tumor action. This work was performed in accordance with the plan of research the National Pharmaceutical University "Creating new medicines based on natural and herbal raw materials, apiculture products for adults and children" (№ state registration 0198U007008), and as part of the national program "Soy of Ukraine" in accordance with the work plan of the State Committee on Science, technology and industrial policies. HESG was obtained from the department of chemistry of natural compounds NUPh under the supervision of prof. V.S. Kislichenko. It consists of hydroxycinnamic acids, tannins, isoflavones (genistein, daidzein, glycitein). In the experiment was used a hormone-dependent cell cultures of human tumor cells some lines: MCF-7 (estrogen positive ER + progesterone positive PR + mammary duct adenocarcinoma), MDA-MB-231 (breast cancer), SiHa (cells of cervical carcinoma). Evaluation of proliferative activity in cell culture under the influence of various doses HESG was assessed by Alamar blue test. Cell cultures were grown in the presence of HESG in concentrations 1.0; 0.2; 0.04 and 0.0008 $\mu\text{g/ml}$ for 72 hours in DMEM-based medium supplemented with hormones (as stimulators of cell proliferation) and without hormone (in parallel experiments). After 72 hours the fluorescence intensity of the detector bioluminescence Xenogen was measured. The cells cultured in medium with hormones and without hormones after adding an indicator Alamar blue were controls. It was found that in control cells of corresponding lines

cultured in medium without hormonal stimulation it is marked reduction in proliferative activity in comparison with the same culture with hormonal stimulation in the medium composition. These data show the high hormone sensitivity of tested cell cultures. Under the influence of the investigated extract of soy grass cultured in medium with hormones inhibiting of proliferation against all used tumor cell model (MCF-7, MDA-MB-231 and SiHa) was found. That was indicated by decreasing of biofluorescence in socket under the influence of the investigated extract. Cytotoxic effect of the extract of *Glycine hispida* grass on these tumor cells was maximally expressed in dose of 0.2 µg/ml. Thus, under the influence of HESG at this dose inhibition of cell proliferation was in 5.57 times in line MSF7, in 11.1 times in MDA-MB-231 and in 19.6 times in SiHa in the comparison with control. The obtained data indicates anticancer activity of HESG.

But when these cell lines were cultured in medium without hormones in the presence of HESG mixed effect was obtained, which requires an additional set of experiments. GETS influences only at a concentration of 0.2 µg/ml in MCF7 cells cultured in medium without hormones, inhibiting cell proliferation in 2.2 times; but reducing of proliferation in SiHa cell line was in 1.61 times and in MDA-MB-231 – in 1.62 times. The experimental data suggest this dose as effective and allow to recommend GETS for further studies of its anticarcinogenic properties in the dose range to 0.2 µg/ml. In the future, it would be appropriate to research anticarcinogenic properties the extract of *Glycine hispida* grass on models of xenograft cancer in mice *in vivo*.

Keywords: pharmacology, extract of soy grass.

Рецензент – проф. Дев'яткіна Т.О.
Стаття надійшла 02.06.2015 р.