

УДК 577.1:619:615.3

Шемедюк Н.П., аспірант, **Буцяк В.І.,** проф. д. с.-г. н[©]*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З.Гжицького***ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ЕКСПРЕС-АНАЛІЗУ ХАРАКТЕРУ
БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ РОСЛИННОГО ПРЕПАРАТУ З *SOPHORA JAPONICA***

*Механізми, що забезпечують інгібування проліферації клітин, мало доступні для вивчення in vivo. Тому, за звичай, у таких дослідженнях використовують культивування клітин за дії досліджуваної речовини. Створено тест-систему для експрес-аналізу характеру біологічної дії рослинного препарату з *Sophora japonica*. Отримано порівняльні результати впливу біологічно активного комплексу рослинного походження щодо ліній клітин з різним рівнем експресії трансформованого фенотипу.*

Ключові слова: клітинні культури, *Sophora japonica*, біологічно активні речовини, проліферація.

Дослідження інгібування проліферації пухлинних клітин – одне з важливих завдань нашої роботи. Актуальність проблеми зростає з розповсюдженням захворювань, спричинених неконтрольованим поділом клітин (пухлини). Оцінка проліферативної активності необхідна не тільки для біологічної характеристики пухлин, але і для прогнозування перебігу хвороби. Часто прогностичні фактори є вирішальними для кінцевого результату захворювання і важливішими за терапевтичний ефект [1].

Метою роботи є розробка ефективної та доступної у застосуванні біотехнологічної моделі для з'ясування порівняльної оцінки впливу екстракту *Sophora japonica* щодо ліній клітин з різним рівнем експресії трансформованого фенотипу.

Клітинна лінія *BALB 3T3* отримана при тривалій експлантації клітин ембріонів мишей, ріст фібробластоподібного типу, псевдонормальна. У дослідженнях використовується як аналог нормальної клітини [2]. Грінбергом в 1978 році була доведена можливість екстраполяції даних, отриманих *in vitro* на культивованих фіброблестах, на умови *in vivo*. Яскравою відмінністю неопластичних клітин є «асоціальний» тип поведінки, зв'язаний у першу чергу з порушенням нормальних морфогенетичних реакцій – втрата контактного гальмування, поява здатності до проліферації незалежно від прикріплення до субстрату, зміна адгезійних взаємодій, форми, рухливості клітин [3]. *MDA-MB-231* – клітини аденокарциноми молочної залози людини, отримані у 1973 р. лікарем Р. Calleaу від 51 річної жінки. Клітини веретеноподібної форми, епітеліоцити. *4T1* - клітини пухлини молочної залози миші. Клітинна лінія

отримана Б. Пуласкі із пухлини молочної залози (аденокарциноми) миші, епітеліального походження [4].

Лікарські властивості софори японської (*Sophora japonica*): бактерицидні – зумовлені наявністю фітонцидів, сесквітерпенів, тощо [5]; протипухлинні – алкалоїдом софокаргин, лектинами насіння [6]. У квітках софори виявлено 17,5% рутину. За А.А. Гроссгеймом у плодах софори у період їх дозрівання міститься 8 флавоноїдів: рутин, кемпферол-3-софорозид, кверцетин-3-рутинозид, геністеїн-2-софоробіозид, тощо [7].

Матеріали і методи

Для досягнення поставленої мети вирішували завдання: оцінити цитотоксичну/цитостатичну дію етанольного екстракту. Для приготування екстракту софори японської (*Sophora japonica*), використано етиловий спирт. Використовували екстракт у дозах 10 мкл/мл, 1 мкл/мл та 0,1 мкл/мл середовища через 24 год. після висіву клітин. Контролем слугувала інтактна культура клітин. Також до уваги брались контролю з внесенням спирту (70%) 10 мкл/мл, 1 мкл/мл та 0,1 мкл/мл середовища, контроль з внесенням фізіологічного розчину – 10 мкл/мл середовища.

Клітини ліній *MDA-MB-231* та *4T1* були отримані з Клітинного банку ліній клітин Вроцлавського природничого університету (Польща). Клітини лінії *BALB 3T3* отримані з *Клітинного банку ліній тканин людини і тварин* Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (Київ).

Клітини культивували у флаконах (20 см²) у середовищі Дульбекко в модифікації Ігла (DMEM, Sigma Chem. Co., США) з додаванням 10% сироватки крові плодів великої рогатої худоби (BPX, Sigma Chem. Co., США) та 500 одиниць/мл гентаміцину (Sigma, США) при 37°C в атмосфері 5% CO₂ при 100% вологості. Пересів клітин здійснювали у співвідношенні 1 : 3 – 1 : 5 через кожні 2 – 3 дні. Для дослідів клітини висівали у (96- лункові) планшети (Sarstedt, США) в кількості 5x10⁵ клітин на лунку. Результати впливу екстрактів на культуру клітин оцінювали на 24, 48, 72 годину та на 14 день культивування. Для оцінки життєздатності клітин проводили забарвлення трипановим синім (ТС). За цих умов живі клітини відрізнялися від мертвих (некротичних) тим, що непоглинали барвник.

Одне з завдань – дослідити вплив екстрактів з *Sophora japonica* на прояв апоптозу. Апоптичні клітини виявляли за характерною фрагментацією ДНК, яку виділяли і розділяли методом електрофорезу в 1% агарозному гелі (Кудрявцев и др., 1996).

Проводилось дослідження вмісту біологічно активних речовин у екстракті з *Sophora japonica* методом мас-спектрометрії.

Дослід проводився у трьох паралелях. Результати опрацьовано за критерієм t-Стюдента.

Результати та обговорення

За умов мацерації етиловим спиртом у отриманий екстракт переходять глікозиди, флавоноїди, сапоніни, частково алкалоїди.

За даними літератури [5, 6, 7] лікарська рослина, яку використано для одержання екстракту містить значну кількість біологічно активних речовин, яким властива антиоксидантна дія. Згідно з сучасними уявленнями, вільнорадикальні процеси і регуляція їх рівня відіграють суттєву роль за умов канцерогенезу і злоякісного росту.

За даними мас-спектрометрії в екстракті софори японської ідентифіковано піки найближчих за структурою до перелічених у табл.1 речовин.

Таблиця 1.

Біологічно активні речовини ідентифіковані у екстракті з *Sophora japonica*

Ідентифікована речовина	Час ідентифікації (хв)	Площа піку (%)	Ймовірність ідентифікації (%)
2-фуранметанол	2,735	0,803	74
сорбітол	11,719	1,33	64
гліцерол	4,019	2,439	78
манітол	11,719	1,33	86
ксилітол	11,672	0,81	59
гептанова кислота	9,596	0,485	50
2-гідрокси-2-циклопентен-1-он	3,579	0,957	80
пропілвалерат	8,128	0,78	32
етилформіат	8,336	0,3	38
2,3-дигідроксипропаналь	7,296	1,02	32
дигідроксиацетон	3,199	12,981	78
β -метил-D-рибопіранозид	10,548	4,84	43
α -метил-D-глюкопіранозид	10,150	1,4	45
α -метил-L-галактопіранозид	10,150	1,4	72
D-манногептулоза	9,596	0,485	43
α -D-глюкопіраноза	10,822	1,07	80
D-гліцери-D-галактогептоза	10,822	1,07	80
D-ксилулоза	10,738	2,00	27
вернін	9,091	0,60	64
тіофен	11,041	22,25	50
цитозин	9,091	0,60	53
карваніл	6,565	0,267	42
тіазол	6,873	0,89	74
гама-амінобутиролактан	6,873	0,89	64
лактон G	8,841	1,005	64
D-рибонолактон	6,873	0,89	56
2,3-дигідро-3,5-дигідрокси-6-метил-4H-піран-4-он	6,135	13,364	70

Присутність сесквітерпенових лактонів, похідних пірролідину, речовин, що входять до складу ефірних олій може підтверджувати протипухлинну здатність екстракту софори японської. У екстракті софори японської ідентифіковані речовини антиоксиданти, антисептики, вазодилатори, осмотичні діуретики, карваніл розслаблює гладкі м'язи серця. Крім того, альдегіди володіють протизапальними, заспокійливими, седативними і антивірусними

властивостями, спирти – антисептичними і противірусними властивостями, феноли, терпени – бактерицидними. Кетони – це клас хімічних сполук, які володіють ранозагоювальними властивостями і полегшують виділення слизу. Сесквітерпени володіють протизапальними, седативними і противірусними властивостями, а також проявляють бактериостатичний і імуностимулюючий ефект. Ефірам властива протигрибкова дія. Лактони - це група складних ефірів, що мають додаткове вуглецеве кільце. Вони належать до наймогутніших протизапальних сполук.

Створюється певний комплекс сполук, у якому існують антагоністичні та синергістичні взаємодії. Внаслідок втрати одного з компонентів, діючі речовини можуть набути відмінних, можливо, небажаних властивостей.

Проведені дослідження *in vitro* свідчать про цитостатичну дію екстракту софори японської щодо пухлинних клітин. Негативна дія екстракту софори японської характеризується значним зменшенням кількості клітин *MDA-MB-231*, *4T1* відносно контрольних зразків за дії дози 10 мкл/мл середовища. Так, на 24 год. кількість клітин *MDA-MB-231* за дії препарату софори японської 3333 ± 833 (всі трипаннегативні) на 1 мл середовища. Приріст кількості клітин *MDA-MB-231*, *4T1* за дії препарату софори японської є невисоким і залишається майже незмінним упродовж 72 год. (рис. 1, 2, 3). Некротичні процеси не спостерігаються. Істотне інгібування проліферативної активності *BALB 3T3* за дії препарату софори японської, на 24 год. кількість трипаннегативних клітин *BALB 3T3* – 2500 ± 1040 на 1 мл середовища відповідно, на 72 добу - 5000 ± 1443 на 1 мл середовища, що у 3,3 рази менше кількості клітин у контролі (рис. 1, 2, 3).

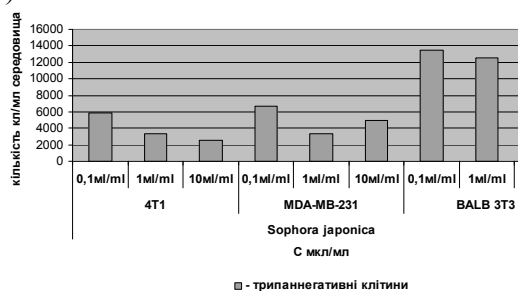


Рис. 1. Кількість клітин у середовищі на 72 год. культивування за дії на досліджувані популяції екстракту *Sophora japonica*

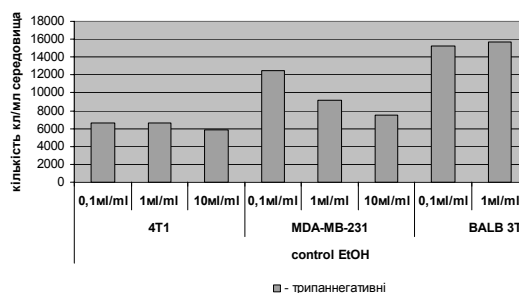


Рис. 2. Кількість клітин у середовищі на 72 год. культивування за дії на досліджувані популяції етилового спирту (70%)

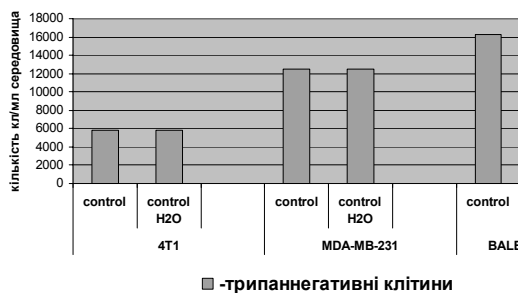
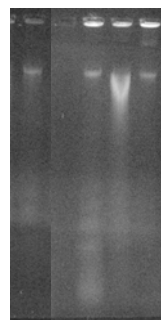


Рис. 3. Кількість клітин інтактних культур на 72 год. культивування



1 2 3 4

Рис. 4. Розділення фрагментів ядерної ДНК клітин лінії 4T1.
1 – *Sophora japonica* 2 – proapoptotik control
3 – pronecrotik control 4 – alive control
Розділення проводили у 1%- му агарозному гелі з додаванням броміду етидію.

Екстракт софори японської, за дози 1 мкл/мл середовища характеризується антипроліферативним впливом (кількість клітин 3333 ± 833 на 1 мл середовища на 72 год.) щодо *MDA-MB-231*, деструктивні зміни клітин відсутні, до 14 доби небагаточисельна популяція за дії софори японської гине. Істотно зменшує проліферативну здатність клітин 4T1 препарат софори японської: на 48 год. кількість клітин 5833 ± 833 на 1 мл середовища, що відповідає такому у контрольних зразках, та з 72 год. клітинна лінія 4T1 за дії даної дози екстракту софори японської поступово відмирає, на 168 год. культивування кількість клітин у 12,0 разів менша порівняно з такою у контролі (рис. 1, 2, 3), трипанпозитивних клітин не виявлено. Проліферативна активність та життєздатність клітин *BALB 3T3* за дії дози препарату софори японської 1 мкл/мл середовища подібна до такої у контролях.

За дії дози 0,1 мкл/мл середовища екстракту софори японської спостерігаємо низький приріст кількості клітин у культурі *MDA-MB-231* порівняно з контролем. На 72 год. культивування у цих зразках налічуємо на 67% клітин менше порівняно з кількістю клітин у контролі. Деструктивних змін клітин не спостерігаємо. За дії екстракту у дозі 0,1 мкл/мл середовища негативного впливу щодо клітин 4T1, *BALB 3T3* не досліджено.

Таким чином, в умовах *in vitro* показано здатність екстракту софори японської гальмувати проліферативну активність пухлинних клітин. Вплив препарату з софори японської є цитостатичного характеру за даних умов. Найбільш чутливою до дії досліджуваного препарату є лінія клітин *MDA-MB-231*, менш чутливою – *BALB 3T3*. Це розкриває нові можливості щодо застосування софори японської як антиоксидантного, протипухлинного засобу з вибірковою дією.

Апоптичні клітини за дії досліджуваних біологічно АКТИВНИХ речовин виявляли за характерною фрагментацією ДНК, яку виділяли і розділяли методом електрофорезу в 1% агарозному гелі (рис. 4).

Результати електрофореграми свідчать про виявлення фрагментації ДНК, а отже, загибель за механізмом апоптозу клітин лінії 4T1, що культивувались у присутності *Sophora japonica*. При цьому значна частина ДНК знаходиться у низькомолекулярній формі. У контролі (культивування без екстрактів) ДНК нефрагментована.

Механізми протипухлинної дії флавоноїдів включають модуляцію сигнальних шляхів, залучених до регуляції проліферації пухлинних клітин, індукцію апоптозу або диференціювання клітин, а також інгібування ангиогенезу та подолання лікарської резистентності. За рахунок існування семіхінонних, хінонних форм, поліфенольні сполуки (флавоноїди) здатні нейтралізувати вільні радикали, переривати ланцюг реакцій їх утворення у пухлинній клітині, тим самим пригнічуючи процеси росту і розмноження. Також вони блокують тканинні дихальні ферменти (особливо тих, які містять тіолові групи), вступаючи у відносно міцний зв'язок з центрами ферментів. Алкалоїди діють як нуклеофільний та електрофільний агент одночасно, здатні порушувати синтез АТФ у мітохондріях завдяки нейтралізуванню негативних зарядів зовнішньої сторони мембран мітохондрій, що виникають при їх енергізації, модифікувати тіолові групи органічних сполук завдяки реакції нуклеофільного заміщення при взаємодії тіолових груп органічних речовин з імінною групою. Алкалоїди – особлива група комплексоутворюючих сполук – мітозні отрути. Вони призупиняють поділ клітин шляхом руйнування мітотичного веретена. За механізмом електрофільних взаємодій діють сесквітерпенові лактони, сапоніни [8, 9, 10, 11].

Висновок

1. Екстракт з *Sophora japonica* спричиняє інгібування росту пухлинних клітин, але не виявляє пошкоджуючої дії на ріст і життєздатність даморталізованих фібробластів *BALB 3T3* за дози 0,1-1 мкл/мл середовища, які відібрано для дослідження як прототип нормальних клітин. Таким чином, створений тандем (пухлинні клітини – клітини з низьким рівнем експресії трансформованого фенотипу) дає можливість дослідити, виявити вибірковість дії біологічно активних речовин щодо клітин з різним рівнем експресії трансформованого фенотипу.

2. Досліджуваний екстракт володіє цитостатичною, проапоптичною активністю *in vitro* щодо ліній клітин *MDA-MB-231*, *4T1*. Результат обумовлений властивостями екстракту софори японської, роллю біологічно активних речовин, що входять до складу препарату, яку вони здійснюють у метаболізмі клітин.

Література

1. Пожарисский К.М., Леенман Е.Е. // Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний // Арх. пат. – 2000, – № 5, – С. 3-11.

2. Earle W.R. Cell L 929 // J. Nat. Cancer Inst. – 1943. – Vol.4. – P.165
3. Васильев Ю.М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток. 1. Сигнальные молекулы, вызывающие размножение и гибель клеток. // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №4. – С. 17 - 22.
4. Pulaski BA, et al. Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model // Cancer Res. – 2000. – Vol.60. – P.2710-2715.
5. Саїлова Д.Д. Дослідження і комплексне використання софори японської: Автореф. Дис...канд. технічних н. 15.00.01- технологія ліків. Харків – 1996.
6. Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела. – Львів: ПП. «Кварт», – 2005. – 554с.
7. Лікарські рослини / під. ред. Гродзинського А.М. [Енциклопедичний довідник] – Київ: в-тво «Українська енциклопедія» ім. М.П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп» – 1992. – 543с.
8. Рибалко К.С. Природные сесквитерпеновые лактоны. – М.: «Медицина», 1978. – 320с.
9. Горяев М.И. Растения, обладающие противоопухолевой активностью/ Горяев М.И., Шарикова Ф.С. – Алма-Ата: Наука, 1983. – 174с.
10. Балицкий К.П. Растительные растения и рак. / Балицкий К.П., Воронцова А.Л. – Киев: Наукова думка, 1982. – 376с.
11. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека / Вилен Абрамович Барабой. – М.: Наука, 1984. – 160с.

Summary

p.-g. st. N.Shemediuk, prof. V.I. Butsyak

TEST SYSTEM FOR EXPRESS-ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL EFFECT HERBAL MEDICINES WITH *SOPHORA JAPONICA*

Mechanisms to ensure inhibition of cell proliferation, was available for study in vivo. So, usually, in these studies using cell cultivation for the actions of the studied compounds. A test system for express-analysis of biological nature of plant medicine from Sophora japonica. Try the comparative results of the influence of biologically active herbal complex on the cell lines with different levels of expression of a transformed phenotype.

Key words: cell cultures, *Sophora japonica*, biologically active substances, proliferation.

Стаття надійшла до редакції 3.09.2010