

АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ *IN VITRO*

Э.Ш. Соломко¹, Е.Р. Полосухина¹, А.М. Рабинович², А.В. Киселев¹, Е.В. Степанова¹

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, г. Москва

² ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН, г. Москва

Ключевые слова: цитотоксичность, клеточные линии меланомы, экстракты растений

Цель работы. Исследованы цитотоксические свойства водно-спиртовых экстрактов растений, предоставленные ГНУ ВИЛАР РАСХН, на четырех клеточных линиях метастатической меланомы кожи *in vitro*.

Материалы и методы. Цитотоксическая активность 18 водно-спиртовых экстрактов оценена на 5 клеточных линиях метастатической меланомы человека (mel Kog, mel P, mel II, mel Cher и Melur) МТТ тестом.

Результаты. 9 (50%) экстрактов растений не показали какой-либо значимой цитотоксичности в самой высокой концентрации (0,3% спирта). Только экстракты Эвкоммии вязолистной (*Eucommia ulmoides* L.) и Элеутерококка (*Eleutherococcus* L.) проявили цитотоксические свойства на четырех и более клеточных линиях.

Заключение. Цитотоксическая активность экстрактов растений и их отдельных фракций на культурах клеток метастатической меланомы требует дальнейшего углубленного изучения.

Введение

В настоящее время в клинической онкологии около 70% всех больных злокачественными опухолями получают комбинированное химиотерапевтическое лечение. Однако большинство новообразований являются или становятся резистентными к проводимой противоопухолевой химиотерапии [1]. Если для некоторых из них (например, рака молочной железы, толстой кишки) разработаны и внедрены новые противоопухолевые препараты [2], то метастатическая меланома кожи характеризуется резистентностью к химио- и иммунотерапии. Эффективность стандартных режимов химиотерапии, включающих дакарбазин и темозоломид, колеблется в пределах 20%, с частотой полных ремиссий только 2–5%, при средней длительности ответа 5–6 мес [3]. Совершенно ясно, что поиск новых соединений и новых биологических мишеней, блокирующих рост метастатических меланом, является актуальным.

В настоящее время основной методологией поиска веществ с определенным видом активности является проведение синтеза большого количества химически подобных веществ, которые затем исследуются на противоопухолевую биологическую

активность с помощью высокоэффективного скрининга (high throughput screening) [4]. В последнее время возрос интерес к другому, ставшему традиционным походу – к скринингу веществ природного происхождения [5–7]. Преимуществом данного подхода является то, что вещества-кандидаты уже обладают некоторыми свойствами, необходимыми для лекарств (например, абсорбцией в желудочно-кишечном тракте и соответствующим метаболизмом), а также высоким химическим разнообразием, необходимым для изучения корреляций активность-структура [7]. Выделенные из природных источников вещества в дальнейшем могут быть использованы в высокоэффективном скрининге, и лидерное соединение может быть оптимизировано с помощью методов комбинаторной химии. В настоящее время во многих странах (США, Южная Америка, Китай и др.) выполняются программы, направленные на разработку противоопухолевых препаратов на основе веществ, полученных из природных источников [8].

В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН проводится анализ противоопухолевых свойств экстрактов различных растений, в том числе произрастающих в Российской Федерации, на различных опухолевых моделях *in vitro*. На четырех клеточных линиях метастатической меланомы кожи изучены цитотоксические свойства 18 водно-спиртовых экстрактов растений, предоставленные ГНУ ВИЛАР РАСХН.

Адрес для корреспонденции

Степанова Евгения Владиславовна
E-mail: e_stepanova@nm.ru

Материалы и методы

Клеточные линии

В работе были использованы клеточные линии меланомы mel Kog, mel P, mel II и mel Cher, полученные из образцов диссеминированной меланомы кожи в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН [9], а также клеточная линия меланомы Melur. Две клеточные линии (mel P и mel II) имели умеренную степень дифференцировки клеток в культуре, две (mel Kog и mel Cher) – низкую.

Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, 2 mM L-глутамина, 100 IU/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все ПАНЭКО, Россия). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 2–3 дня. За день перед каждым экспериментом клетки разбавляли полной средой RPMI-1640 в соотношении 1:1.

Экстракты растений

Были использованы водно-спиртовые экстракты (30% этилового спирта), предоставленные Всероссийским научно-исследовательским институтом лекарственных и ароматических растений (ГНУ ВИЛАР РАСХН). Экстракты были приготовлены из листьев и стеблей высушенных растений: Боярышника кровавокрасного (*Crataegus sanguinea* L.), Валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L.), Лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.), Пиона узколистного (*Paeonia tenuifolia* L.), Репешка опушенного (*Agrimoniae heiba* L.), Сабельника болотного (*Comarum palustre* L.), Ноготков лекарственных (*Calendula officinalis* L.), Эхинацеи пурпуровой (*Echinacea purpurea* L.), Подофилла щитовидного (*Podophyllum peltatum* L.), Ректантеры душистой (*Rectanthera fragrans* L.), Заманихи высокой (*Oplopanax Elatus* L.), Эвкоммии вязолистной (*Eucommia ulmoides* L.), Пассифлоры инкарнатной (*Passiflora incarnata* L.), Женьшеня обыкновенного (*Panax girseng* L.), Будры плющевидной (*Glechoma hederacea* L.), Ореха грецкого (*Juglans regia* L.), Чистотела большого (*Chelidonium majus* L.) и Элеутерококка (*Eleutherococcus* L.).

Оценка цитотоксичности соединений

Клетки (6×10^4 клеток/мл) вносили в 96-луночный планшет в полной среде RPMI-1640. Клетки инкубировали с экстрактами в различных концентрациях в течение 48 ч в триплетах, затем добавляли раствор МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали еще 4 ч, затем среду отбирали и добавляли к клеткам 200 мкл ДМСО. Клетки ресуспендировали и инкубировали 10 мин при 37 °C, после

чего определяли оптическую плотность раствора формазана на анализаторе иммуноферментных реакций «Униплан» при 540 нм, используя ДМСО как нулевой контроль. Для каждого соединения определяли среднюю ингибирующую константу IC_{50} (ингибирующая доза, при которой блокируется жизнеспособность 50% клеток) с помощью программы GraphPad Prism 5. Эксперименты повторяли не менее трех раз.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 5. Для анализа достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Анализ цитотоксичности водно-спиртовых экстрактов проводили на 5 клеточных линиях метастатической меланомы. Клеточные линии меланомы инкубировали с тестируемыми экстрактами в не менее 3 разведениях (от 0,3% спирта до 0,03%) в течение 2 дней, затем выживаемость клеток определяли с помощью МТТ теста. В качестве контроля служили клетки, инкубированные в среде, содержащей 0,3% спирта.

В таблице представлены данные о выживаемости клеток меланом при инкубации с экстрактами в концентрации, содержащей 0,3% спирта.

Среди исследованных водно-спиртовых экстрактов 9 (50%) не показали какой-либо значимой цитотоксичности в самой высокой концентрации (0,3% спирта). Только экстракты Эвкоммии вязолистной (*Eucommia ulmoides* L.) и Элеутерококка (*Eleutherococcus* L.) в концентрации 0,3% спирта проявили цитотоксические свойства на четырех и более клеточных линиях. Экстракты Валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L.) и Лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.) индуцировали цитотоксичность на 2 или 3 исследованных клеточных линиях метастатической меланомы. Пять водно-спиртовых экстрактов обладали цитотоксическими свойствами в отношении одной культуры клеток. Большинство исследованных экстрактов были не эффективны при более сильных разведениях (0,15 и 0,03% спирта).

Цитотоксические свойства различных экстрактов растений изучаются достаточно давно. О свойствах некоторых изученных нами растений было известно ранее. Опубликовано несколько исследований о цитотоксической, апоптотической и антипролиферативной активности экстрактов и отдельных фракций, выделенных из Лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.) в отношении различных клеточных линий опухолей человека *in vitro* [10–12]. Их противоопухолевая активность подтверждена также в экспериментах *in vivo* [10]. Показано, что

Таблица. Цитотоксическая активность экстрактов растений на культуре клеток меланомы

№	Экстракт растения	mel P	Mel II	Mel Kor	Mel Cher	Melur
1.	<i>Crataegus sanguinea L.</i>	20±2	52±4	29±3	61±5	58±5
2.	<i>Valeriana officinalis L.</i>	21±2	58±4	78±7	58±4	80±4
3.	<i>Arctium lappa L.</i>	37±4	42±4	35±4	64±4	77±5
4.	<i>Paeonia tenuifolia L.</i>	39±3	71±7	61±6	80±8	63±3
5.	<i>Agrimoniae heiba L.</i>	54±5	44±4	83±7	61±5	46±4
6.	<i>Comarum palustre L.</i>	68±7	82±7	56±5	64±5	71±7
7.	<i>Calendula officinalis L.</i>	73±7	65±5	42±4	69±5	51±3
8.	<i>Echinacea purpurea L.</i>	57±5	72±7	56±5	56±4	39±2
9.	<i>Podophylum peltatum L.</i>	38±3	63±5	68±6	60±5	66±4
10.	<i>Rectanthera fragrans L.</i>	72±7	64±6	63±6	76±6	77±7
11.	<i>Oplopanax elatus L.</i>	61±5	71±6	58±5	67±5	78±7
12.	<i>Eucommia ulmoides L.</i>	39±3	27±2	23±3	31±3	57±3
13.	<i>Passiflora incarnata L.</i>	71±7	56±4	54±5	60±5	77±7
14.	<i>Panax ginseng L.</i>	50±5	71±7	56±5	90±2	87±8
15.	<i>Glechoma hederacea L.</i>	79±7	61±6	62±6	59±4	72±7
16.	<i>Juglans regia L.</i>	81±7	54±5	74±7	63±5	86±8
17.	<i>Chelidonium majus L.</i>	50±5	59±5	29±3	80±4	81±5
18.	<i>Eleutherococcus L.</i>	28±2	20±1	11±2	24±2	38±2

одним из механизмов действия экстрактов может быть антиоксидантная активность экстракта и/или снижение синтеза NO в клетках [12]. Известно, что фракции, полученные из различных растений семейства боярышников (*Crataegus*), тоже проявляют цитотоксический эффект в различных культурах опухолевых клеток [13].

В литературе отсутствуют сведения о влиянии экстрактов Эвкоммии на культуры опухолевых клеток. Сообщается только, что растение обладает противовоспалительными и антиоксидантными свойствами [14]. Однако недавно было показано, что сапонин — активное вещество, содержащееся в Эвкоммии, — обладает цитотоксической и антиангиогенной активностью *in vitro* [15, 16]. Нами не обнаружено литературных данных о цитотоксическом действии экстрактов Валерианы лекарственной на культуры опухолевых клеток. Представляется интересным продолжить эти исследования.

Таким образом, цитотоксическая активность экстрактов растений и их отдельных фракций на культурах клеток метастатической меланомы требует дальнейшего углубленного изучения.

ЛИТЕРАТУРА

- Fodale V., Pierobon M., Liotta L., Petricoin E. Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer J.* 2011, v. 17, No. 2, p. 89-95.
- Conte P., Guarneri V. The next generation of biologic agents: therapeutic role in relation to existing therapies in metastatic breast cancer. *Clin. Breast. Cancer.* 2012, v. 12, No. 3, p. 157-166.
- Lee M.L., Tomsu K., Von Eschen K.B. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. *Melanoma Res.* 2000, No. 10, p. 81-92.
- Hogan J.C. Directed combinatorial chemistry. *Nature.* 1996, No. 384 (suppl), p. 17-19.
- Cragg G.M., Newmann D.J., Snader K.M. Natural products in drug discovery and development. *Nat. Prod.* 1997, v. 60, p. 52-60.
- Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии. *Российский Биотерапевтический Журнал.* 2010, № 4, т. 9, с. 3-10.
- Harvey A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends Pharmacol. Sci.* 1999, v. 20, p. 196-198.
- Mans D.A., Rocha A.B., Schwartzmann G. Anti-Cancer Drug Discovery and Development in Brazil: Targeted Plant Collection as a Rational Strategy to Acquire Candidate Anti-Cancer Compounds. *The Oncologist.* 2000, v. 1, No. 5, p. 185-198.
- Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю., Бурова О.С., Морозова Л.Ф., Палкина Т.Н., Козлов А.А., Голубева В.А., Черемушкин Е.А., Дорошенко М.Б., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Ларин С.С., Георгиев Г.П. Клеточные линии меланомы — основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник Российской Академии медицинских наук.* 2005, № 7, с. 37-40.
- Awale S., Lu J., Kalauni S.K., Kurashima Y., Tezuka Y., Kadota S., Esumi H. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer. Res.* 2006, v. 66, No. 3, p. 1751-1757.
- Matsumoto T., Hosono-Nishiyama K., Yamada. Anti-proliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Med.* 2006, v. 172, No. 3, p. 276-278.

12. Predes F.S., Ruiz A.L., Carvalho J.E., Foglio M.A. Antioxidative and *in vitro* antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. BMC Complement Altern. Med. 2011, v. 11, p. 25.
13. Min B.S., Kim Y.H., Lee S.M. et al. Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. Arch. Pharm. Res. 2000, v. 23, No. 2, p. 55-58.
14. Deyama T., Nishibe S., Nakazawa Y. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and Siberian ginseng. Acta Pharmacol. Sin. 2001, v. 22, No. 12, p. 1057-1070.
15. Man S., Gao W., Zhang Y., Huang L., Liu C. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. Fitoterapia. 2010, v. 81, No. 7, p. 703-714.
16. Jiang Y.L., Liu Z.P. Natural products as anti-invasive and anti-metastatic agents. Curr. Med. Chem. 2011, v. 18, No. 6, p. 808-829.

Статья поступила 23.11.2012 г., принята к печати 10.01.2013 г.
Рекомендована к публикации Е.А. Сушенцовым

ANALYSIS OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF BOTANICAL EXTRACTS IN MELANOMA CELL LINES *IN VITRO*

Solomko E.Sh.¹, Polosuhina E.R.¹, Rabinovich A.M.², Kiselev A.V.¹, Stepanova E.V.¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Science, Moscow, Russian Federation

² GSI VILAR RASHN

Key words: cytotoxicity, melanoma cell lines, botanical extracts

Background. We analyzed cytotoxic properties of different aqueous-alcoholic extracts from plants on 4 metastatic skin melanoma cell lines *in vitro*.

Methods. The cytotoxic activity of 18 aqueous-alcoholic extracts was assessed on 5 metastatic melanoma cell lines (mel Kor, mel P, mel II, mel Cher and Melur) by a MTT test.

Results. 9 (50%) plant extracts demonstrated no significant cytotoxic effect at the highest tested concentration (0,3% alcohol). Only extracts from *Eucommia ulmoides* L. and *Eleutherococcus* L. had noteworthy cytotoxic effects in four and more cell lines tested.

Conclusion. The cytotoxic activities of botanical extracts and their fractions on metastatic melanoma cell lines require further closer investigations.