

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИКВИРИТИГЕНИНА НА КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ HEL4, PC-3, MCF-7

Ключевые слова: изоликивиритигенин, флавоноид, халкон, противоопухолевая активность, антипролиферативная активность, линии опухолевых клеток.

В 2020 г. наиболее распространенным видом злокачественных новообразований явился рак молочной железы. По данным ВОЗ, в 2020 г. на данный вид рака пришелся каждый восьмой новый случай рака в мире и каждый четвертый – среди женщин: это заболевание диагностировали у 2,3 млн. Одним из факторов, влияющих на высокий уровень смертности среди пациентов с данным диагнозом, является повышение уровня резистентности опухолевых клеток к используемым химиотерапевтическим препаратам, поэтому на сегодняшний день крайне актуален поиск новых препаратов, обладающих высокой специфичностью в отношении злокачественных новообразований, низкой токсичностью и доступностью для пациентов. В связи с этим большое внимание исследователей привлекают соединения природного происхождения, в частности группа флавоноидов, к которой относится изоликивиритигенин. По результатам современных исследований данное соединение может обладать противоопухолевой активностью *in vitro* и *in vivo*, воздействуя на молекулярные механизмы регуляции роста и выживания опухолевых клеток. Целью настоящей статьи явилось изучение противоопухолевой антипролиферативной активности изоликивиритигенина на линиях опухолевых клеток HeLa, PC-3, MCF-7 *in vitro*. Оценка антипролиферативной активности осуществлялась с помощью МТТ-теста с экспозицией клеток с исследуемым соединением в течение 72 ч. В результате исследования изоликивиритигенин показал дозозависимый антипролиферативный эффект на человеческих опухолевых линиях PC-3, MCF-7 в диапазоне концентраций 10^{-4} – $2,5 \times 10^{-5}$ моль/л.

Актуальность. Злокачественные новообразования являются одной из основных причин смерти в мире. Так, в 2020 г. от различных злокачественных опухолей умерли около 10 млн человек. Во всем мире уровень летальности от рака молочной железы характеризуется крайне высокими показателями: в 2020 г. этот показатель составил 685 000 случаев [4]. Кроме того, среди наиболее распространенных видов рака (по количеству новых случаев) ВОЗ констатировал в 2020 г. рак молочной железы (2,26 млн случаев) и рак предстательной железы (1,41 млн случаев), что подтверждает актуальность разработки более активных методов профилактики и лечения злокачественных новообразований.

На сегодняшний день в схемах противоопухолевой фармакотерапии наряду с цитотоксическими противоопухолевыми химиотерапевтическими средствами (классические цитостатики) используют таргетные лекарственные препараты. Таргетные препараты – это лекарства, нацеленные в опухолевых клетках на определенные молекулярные мишени, которые отвечают за их рост и прогрессирование. По сравнению с классическими цитостатиками таргетные препараты характеризуются меньшей гематотоксичностью, но, к сожалению, они также имеют свои недостатки, такие как специфическая токсичность, необходимость выявления диагностических маркеров эффек-

тивности у конкретного больного, а также высокая стоимость курса терапии большинства биотехнологических противоопухолевых таргетных средств.

Поиски эффективных, безопасных и экономически выгодных таргетных препаратов активно продолжаются. В последнее время внимание исследователей обращено на группы полифенолов растительного происхождения. Одним из таковых является халкон изоликвиригенин (20,40,4-тригидроксиалкон), обладающий разнообразной биологической активностью и потенциальными механизмами воздействия на ключевые молекулы, играющие роль в росте и выживании опухолевых клеток [1, 2]. Настоящее исследование посвящено изучению эффектов изоликвиригенина (ИЛГ), его цель – оценка противоопухолевой активности ИЛГ на различных линиях человеческих опухолевых клеток.

Материалы и методы исследования

Тестируемый агент. В данном исследовании изучали антипролиферативную активность ИЛГ (Xi'An Yiyang Bio-Tech Co, Китай). Для этого ИЛГ растворяли в диметилсульфоксиде (Panreac, Испания), матричные растворы хранили при комнатной температуре в темноте. ИЛГ тестировали *in vitro* в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-6} моль/л, добавляя в контрольные лунки соответствующие объемы растворителя так, чтобы конечная концентрация диметилсульфоксида не превышала 1%.

Опухолевые клетки. Эксперименты проведены на линиях опухолевых клеток (таблица), любезно предоставленных научными сотрудниками Научно-образовательного центра фармацевтики (руководитель – профессор Ю.Г. Штырлин, Казань).

Характеристика опухолевых линий

Наименование	Происхождение	Клеточная морфология	Характеристика роста
HeLa (ATCC® CCL-2™)	аденокарцинома шейки матки	эпителиальные клетки	адгезирующая к подложке
PC-3(ATCC® CRL-1435™)	рак предстательной железы	эпителиальные клетки	адгезирующая к подложке
MCF-7(ATCC® HTB-22™)	рак молочной железы	эпителиальные клетки	адгезирующая к подложке

Культивирование опухолевых клеток. Опухолевые линии растили в пластиковых флаконах для клеточных культур (Corning Costar, США), используя питательную среду RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия), глутамина и антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина) при температуре 37°C, 5% CO₂, 100% влажности. При достижении монослоя клеток на дне флакона производилось пассирование клеток (1 раз в 3-4 дня) с использованием раствора трипсина (0,25%)-ЭДТА (ПанЭко, Россия), что приводило к «отлипанию» клеток со дна флакона и переходу их в суспензию. Все этапы проводились в условиях стерильного ламинарного потока (Lamsystems, Россия).

Подсчет абсолютного количества клеток. Для подсчета абсолютного числа клеток использовались камера Горяева и световой микроскоп (Микромед-1, Россия) с применением общепринятой стандартной методики. Для проведения эксперимента после подсчета клетки засеивали в концентрации 10^4 на 1 лунку.

МТТ-тест. Оценка противоопухолевой активности ИЛГ проводилась МТТ-методом [2]. Клетки высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning Costar, США) в концентрации 10^4 клеток в 200 мкл суспензии на лунку, через 24 ч инкубирования в термостате вносили различные концентрации ИЛГ, по 3 лунки на каждую концентрацию. Клетки культивировали в присутствии ИЛГ в течение 72 ч. После этого за 4 ч до окончания инкубации в лунки вносили 20 мкл раствора МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (Sigma, США)) с концентрацией 5 мг/мл. По истечении времени автоматической пипеткой отбирали содержимое лунок и добавляли в каждую 100 мкл ДМСО. Заключительным этапом данного метода являлась оценка результатов с помощью измерения оптической плотности на ИФА-ридере при длине волны 492 нм (Immunochem 2100, США). Подсчитывали долю жизнеспособных клеток в процентах к контролю.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета анализа данных программного обеспечения «Microsoft Excel 2018» путем подсчета средней арифметической (M) и средней ошибки средней арифметической (m). Для оценки достоверных различий использовали t -критерий Стьюдента, разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Данная работа посвящена исследованию противоопухолевой активности ИЛГ по отношению к опухолевым клеткам *in vitro*. Противоопухолевый эффект ИЛГ изучался в отношении человеческих опухолевых линий эпителиального происхождения: HeLa, PC-3, MCF-7 в МТТ-тесте. На рис. 1–3 представлены гистограммы зависимости доли жизнеспособных клеток после 72 ч экспозиции опухолевой линии HeLa, PC-3, MCF-7 с различными концентрациями ИЛГ. Жизнеспособность клеток выражена в процентах к контрольным значениям. Уровень жизнеспособных «контрольных» клеток, не обработанных препаратом, соответствует горизонтальной линии на уровне 100% по оси ординат.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что выраженность противоопухолевого ростиингибирующего эффекта ИЛГ проявлялась в разной степени. В отношении опухолевой линии HeLa в концентрации ИЛГ 10^{-4} моль/л отмечался максимальный эффект (рис. 1), который выражался в уменьшении доли жизнеспособных клеток в сравнении с контролем на 38% ($p < 0,05$), в концентрациях $2,5 \times 10^{-5}$ – 5×10^{-5} моль/л наблюдалась статистически незначимая тенденция к ингибированию роста опухолевых клеток на 8–9%, в концентрациях 10^{-5} – 10^{-6} моль/л данный эффект не отличался от контрольных значений.

По данным литературы, предполагаемый механизм антипролиферативного действия ИЛГ в отношении клеток аденокарциномы шейки матки может быть связан с индукцией апоптоза и остановкой роста опухолевых клеток в S или G2/M фазах клеточного цикла [8]. Молекулярные механизмы действия ИЛГ коррелировали со снижением экспрессии белка Bcl2 и повышением экспрессии каспаз. ИЛГ также индуцировал другие пути апоптоза в раковых клетках HeLa за счет увеличения генерации активных форм кислорода [4–6].

Результаты исследований в отношении опухолевой линии PC-3 свидетельствуют о том, что ИЛГ подавляет пролиферацию в концентрациях 10^{-4} – $2,5 \times 10^{-5}$ моль/л дозозависимо на 37%, 28% и 15%, соответственно, ($p < 0,05$) в сравнении с контрольными значениями (рис. 2). В концентрациях 10^{-5} – 5×10^{-5} моль/л была только лишь недостоверная тенденция к ростиингибирующей активности ИЛГ по отношению к опухолевым клеткам рака простаты *in vitro* на 13%, 27% и 2%, соответственно, в концентрациях 10^{-6} моль/л данный эффект не проявлялся.



Рис. 1. Влияние изоликувиритигенина на жизнеспособность клеток опухолевой линии HeLa



Рис. 2. Влияние изоликувиритигенина на жизнеспособность клеток опухолевой линии PC-3



Рис. 3. Влияние изоликувиритигенина на жизнеспособность клеток опухолевой линии PC-3

Исследование ИЛГ в отношении клеток рака молочной железы (опухолевая линия MCF-7) показало достоверный дозозависимый антипролиферативный эффект ИЛГ в концентрациях 10^{-4} – 5×10^{-5} моль/л, который составил 36% и 11%, соответственно, ($p < 0,05$) к контрольным значениям (рис. 3). В концентрации $2,5 \times 10^{-5}$ моль/л наблюдалась незначительная тенденция (4%) к антипролиферативной активности, в концентрациях 5×10^{-6} – 10^{-6} моль/л данный эффект практически не выражен.

По данным литературы, механизм действия ИЛГ в отношении клеток рака молочной железы может быть связан также с ингибированием роста, подавлением пролиферации клеток, индукцией апоптоза и аутофагии. Промонстрировано, что ИЛГ ингибирует в клетках рака предстательной железы ключевые молекулы PI3K/AKT-сигнального пути, а также изменяет экспрессию p62/каспаза-8 [7].

Таким образом, полученные в ходе исследования данные и анализ современной научной литературы позволяют с уверенностью сказать, что изоликирителигенин потенциально может являться дополнением к традиционной химиотерапии или использоваться в качестве таргетного химиотерапевтического средства против различных видов рака, однако это требует дальнейших как фундаментальных, так и клинических исследований.

Выводы. 1. В экспериментальных моделях *in vitro* с использованием человеческих опухолевых линий клеток рака предстательной железы и молочной железы, PC-3 и MCF-7, соответственно, изоликирителигенин обладал дозозависимой ростингибирующей активностью в диапазоне концентраций 10^{-4} – $2,5 \times 10^{-5}$ моль/л.

2. В результате исследования было выявлено, что в отношении линии клеток аденокарциномы шейки матки Hela изоликирителигенин обладал ростингибирующей активностью в концентрации 10^{-4} моль/л.

3. Концентрация ингибирующая рост опухолевых клеток на 50% составила более 10^{-4} моль/л для опухолевых линий Hela, PC-3 и MCF-7.

Литература

1. Белицкий Г.А., Курсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. Механизмы антиканцерогенного действия флавоноидов // Успехи молекулярной онкологии. 2014. № 1(1). С. 56–68.
2. Павлова С.И. Исследование экстракта корня солодки для повышения эффективности терапии злокачественных новообразований: дис. ... канд. мед. наук. М., 2005. 106 с.
3. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / под ред. Ю.С. Тараховского, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилова, Е.Н. Музафарова. Пушино: Synchronbook, 2013. 310 с.
4. Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M. et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today>.
5. Mather J.P., Roberts P.E. Introduction to cell and tissue culture. Theory and technique. New York, Plenum Press, 1998, pp. 175–194.
6. Peng F., Du Q., Peng C., Wang N., Tang H., Xie X., Shen J., Chen J. A review: the pharmacology of isoliquiritigenin. *Phytotherapy Research*, 2015, no. 29, pp. 969–977.
7. Tian T., Sun J., Wang J., Liu Y., Liu H. Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and migration through the PI3K/AKT signaling pathway in A549 lung cancer cells. *Oncology letters*, 2018, vol. 16(5), pp. 6133–6139.
8. Wang K.L., Yu Y.C., Hsia S.M. Perspectives on the Role of Isoliquiritigenin in Cancer. *Cancers (Basel)*, 2021, vol. 13(1), p. 115. DOI: 10.3390/cancers13010115.

БОРТНИКОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА – ассистент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и биохимии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (stolga2502@mail.ru).

ПАВЛОВА СВЕТЛАНА ИВАНОВНА – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и биохимии, Чувашский государственный университет, Россия, Чебоксары (flavonoid@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9976-7866>).

Olga A. BORTNIKOVA, Svetlana I. PAVLOVA

STUDY OF THE ANTITUMOR ACTIVITY OF ISOLIQUIRITIGENIN ON THE HELA, PC3, AND MCF-7 TUMOR CELL LINES

Key words: *isoliquiritigenin, flavonoid, chalcon, antitumor activity, antiproliferative activity, tumor cells lines.*

In 2020, the most common type of malignancy was breast cancer. According to WHO, in 2020, this type of cancer accounted for one in eight new cases of cancer in the world and one in four – among women: this disease was diagnosed in 2.3 million people. One of the factors influencing a high mortality rate among patients with this diagnosis can be attributed to an increase in the level of tumor cells resistance to the chemotherapeutic preparations used, so today it is extremely important to search for new preparations that have high specificity for malignant neoplasms, low toxicity and availability for patients. In this regard, a lot of researchers' attention is attracted by compounds of natural origin, in particular the group of flavonoids, which includes isoliquiritigenin. According to the results of modern studies, this compound can have antitumor activity in vitro and in vivo, affecting the molecular mechanisms of regulating the growth and survival of tumor cells. The aim of this article is to study the antitumor antiproliferative activity of isoliquiritigenin on the HELA, PC-3, and MCF-7 tumor cells lines in vitro. The antiproliferative activity was evaluated using the MTT test with the exposure of cells with the test compound for 72 hours. As a result of the study, isoliquiritigenin showed a dose-dependent antiproliferative effect on human tumor lines PC-3, MCF-7 in the concentration range 10^{-4} – $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l.

References

1. Belitskii G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. *Mekhanizmy antikantse-rogenogo deystviya flavonoidov* [Mechanisms of anticarcinogenic action of flavonoids]. *Uspekhi molekulyarnoi onkologii*, 2014, no. 1(1), pp. 56–68.
2. Pavlova S.I. *Issledovanie ekstrakta kornya solodki dlya povysheniya effektivnosti terapii zlokachestvennykh novoobrazovaniy: dis. ... kand. med. Nauk* [Research of licorice root extract to improve the effectiveness of treatment of malignant neoplasms. Cand. Diss.] Moscow, 2005, p. 106.
3. Tarakhovskii Yu.S., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov E.N., eds. *Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina* [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino, 2013, p. 310.
4. Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M. et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today>.
5. Mather J.P., Roberts P.E. *Introduction to cell and tissue culture. Theory and technique*. New York, Plenum Press, 1998, pp. 175–194.
6. Peng F., Du Q., Peng C., Wang N., Tang H., Xie X., Shen J., Chen J. A review: the pharmacology of isoliquiritigenin. *Phytotherapy Research*, 2015, no. 29, pp. 969–977.
7. Tian T., Sun J., Wang J., Liu Y., Liu H. Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and mi-gration through the PI3K/AKT signaling pathway in A549 lung cancer cells. *Oncolog. letters.*, 2018, vol. 16(5), pp. 6133–6139.
9. Wang K.L., Yu Y.C., Hsia S.M. Perspectives on the Role of Isoliquiritigenin in Cancer. *Cancers (Basel)*, 2021, vol. 13(1), p. 115. DOI: 10.3390/cancers13010115.

OLGA A. BORTNIKOVA – Assistant Lecturer, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Biochemistry, Chuvash State University, Russia, [Cheboksary \(stolga2502@mail.ru\)](mailto:stolga2502@mail.ru).

SVETLANA I. PAVLOVA – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Biochemistry, Chuvash State University, Russia, Cheboksary (flavonoid@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9976-7866>).

Формат цитирования: *Бортникова О.А., Павлова С.И.* Изучение противоопухолевой активности изоликирителигена на клеточных линиях HeLa, PC-3, MCF-7 [Электронный ресурс] // *Acta medica Eurasica.* – 2021. – № 2. – С. 28–33. – URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2021/2/4>. DOI: 10.47026/2413-4864-2021-2-28-33.