

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ ИЗ ЛИСТЬЕВ *TARAXACUM MONGOLICUM*

Анисович М.В.¹, Афонин В.Ю.¹, Домаш В.И.², Иванов О.А.², Батсурэн Д.Т.Н.³,
Батхуу Ж.Г.⁴

¹ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск

² Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, г. Минск, 220072,
ул. Академическая, 27. e-mail: valdomash@mail.ru

³ Институт химии и химической технологии АН Монголии, e-mail: dubatsuren@yahoo.com

⁴ Монгольский национальный университет, г. Улан-Батор, хот-46, Бага тойруу-49

Заболеваемость населения онкологическими заболеваниями за последние 50 лет резко возросла во многих странах мира. В настоящее время в большинстве развитых стран рак легкого является наиболее распространенной формой опухоли у курящих мужчин и остается одной из важнейших медицинских и социально-экономических проблем. Развитие злокачественной опухоли – многофакторный и многостадийный процесс, в основе которого лежит каскадное накопление клетками различных генетических изменений, приводящих к злокачественной трансформации. При лечении заболевания в медицине применяются ряд таких химических препаратов как бевацизумаб, доцетаксел, доксорубицин и др. Применение химиотерапии имеет ряд побочных эффектов. В связи с этим важным представляется исследование антиканцерогенных свойств препаратов из растительного сырья. Ранее [1,2] нами было показана антиагрегационная и антикоагулянтная активность низкомолекулярных пептидов, экстрагированных из листьев *Taraxacum mongolicum*. Представляет интерес и изучение других свойств этого растения.

Цель работы- Исследование цитотоксичности экстракта из листьев одуванчика монгольского *in vitro* на культуре клеток рака легких человека А549.

Материалы и методы. Предварительно высушенные и измельченные на лабораторной мельнице в муку листья *Taraxacum mongolicum* экстрагировали 0,2 М NaCl течение 6 часов. Смесь центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин. Супернатант отделяли и доводили рН до 4,0, после осаждения балластных белков жидкость снова центрифугировали и в ней осаждали белки $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ при 85%-насыщении. Осадок белка после осаждения центрифугировали при 8000 g 30 мин, растворяли в дистиллированной воде, диализировали и получали обессоленный раствор, содержащий 1,1 мг/мл ингибиторов трипсина.

Исследование проводили в МТТ-тесте на культуре клеток рака легких человека (А549). Клетки выращивали в CO_2 инкубаторе (Herra Cell) при 37°C, 5% CO_2 , влажности 80%. Фиксировали непосредственное подавление клеточного роста и проводили колориметрические исследования. Для учета числа клеток использовали 6 луночные планшеты при плотности посева $5 \cdot 10^4$ кл./1 см². Для МТТ теста использовали 96 луночные планшеты (посевная доза – $5 \cdot 10^4$ кл./1 см²), многоканальную пипетку Eppendorf, набор CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega. На второй день после посева вносили изучаемые вещества, через 24 часа добавляли реактив, инкубировали 20 минут в термостате, измерения поглощение формазана при $\lambda=492$ нм проводили на приборе для иммуноферментного анализа фирмы Awareness, Microplate Rider Stat Fax 3200. Используемый тест основан на способности жизнеспособных клеток переводить соль тетразолина (MTS) в формазан, растворимый в среде культивирования. Превращение MTS в формазан происходит при участии ферментов, относящихся к группе гидрогеназ, имеющих в метаболически активных клетках. Поглощение формазана прямо пропорционально количеству живых клеток в культуре. Фоновое поглощение обычно составляет 0,1-0,2 при длине волны 490 нм после 4 часов культивирования, однако оно зависит от типа культуральной среды, сыворотки, рН и длины волны [3].

Результаты и обсуждение. Согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» соединение нового класса считается цитотоксически активным, когда ингибирование роста опухолевых клеток происходит на 50% при концентрациях данного вещества $\leq 10^{-4}$ М [4]. Исследование проводили для широкого диапазона доз в сравнении с положительным контролем – доксорубицином (адриамицин), известного противоопухолевого цитостатика.

Как показали результаты исследований (табл.1) видно, что культура рака легких человека A549 чувствительна к доксорубину, который зависимо от введенной дозы угнетает рост ее клеток. Исследование цитостатических свойств раствора белковой фракции, полученной из *Taraxacum mongolicum*, показал ее способность угнетать рост опухолевых клеток *in vitro*.

Таблица - Цитотоксическое действие препарата *in vitro*

Вариант	Оптическая плотность	угнетение роста клеток по отношению к контролю, %
Контроль	0,88±0,02	
110,0 мкг/мл (100 мкл/мл эксп. р-ра)	0,16±0,08*#	81,61
77,0 мкг/мл (70 мкл/мл эксп. р-ра)	0,10±0,01*^	89,11
55,0 мкг/мл (50 мкл/мл эксп. р-ра)	0,54±0,03*	38,24
27,5 мкг/мл (25 мкл/мл эксп. р-ра)	0,49±0,03*	44,89
11,0 мкг/мл (10 мкл/мл эксп. р-ра)	0,84±0,04	4,05
5,5 мкг/мл (5 мкл/мл эксп. р-ра)	0,80±0,03	9,09
1,1 мкг/мл (1 мкл/мл эксп. р-ра)	0,90±0,02	-2,61
10,0 мкг/мл доксорубина (позитивный контроль)	0,16±0,02*	81,93
5,0 мкг/мл доксорубина (позитивный контроль)	0,13±0,01*	84,83
1,0 мкг/мл доксорубина (позитивный контроль)	0,25±0,01*	71,91
0,5 мкг/мл доксорубина (позитивный контроль)	0,52±0,03*	40,98
* различия с контролем при $P < 0,001$ (<i>двухвыборочный t-тест</i>) # различия с контролем при $P < 0,01$ (<i>двухвыборочный F-тест для дисперсии</i>) ^ различия с контролем при $P < 0,05$ (<i>двухвыборочный F-тест для дисперсии</i>)		

Как видно из таблицы препарат в концентрации 77 мкг/мл угнетает рост опухолевых клеток по отношению к контролю на 89%. Доксорубин угнетает рост клеток в дозе 0,5 мкг/мл. Возможно, что в экспериментальном препарате действуют имеющиеся в небольшом количестве примеси.

Заключение. Полученные предварительные сведения показывают способность экстракта из листьев одуванчика монгольского угнетать рост клеток рака легких. Для перспективности дальнейшего изучения противоопухолевых свойств *Taraxacum mongolicum* требуется более высокая степень очистки, а также сравнительные изучения с цитостатиками как на раковых культурах, так и нормальных клетках (эмбриональные фибробласты, стволовые клетки, СНО и др.). Отсутствие побочных действий *Taraxacum mongolicum* для

нормальных клеток позволит предлагать его биологически активные вещества для разработки новых противоопухолевых лекарственных средств.

Литература

1. Красненкова Т.П., Иванов О.А., Домаш В.И., Батхуу Ж.Г. Кардиопротекторная активность экстракта листьев *Taraxacum mongolicum* в эксперименте *in vivo*. //Материалы 1 Международной научной конференции «Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы. 21-22 мая 2013 г. г. Новосибирск. –С. 392-395.
2. Красненкова Т.П., Иванов О.А., Домаш В.И., Батсурэн Д.Т.Н., Батхуу Ж.Г. Антиагрегационная активность субстанций низкомолекулярных пептидных ингибиторов протеиназ из представителей семейства *Asteraceae Echinaceae purpurea* L.и *Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz. Тезисы докл. V11 Всероссийской конференции «Протеолитические ферменты: структура, функции, эволюция» Петрозаводск, 30 июня- 4 июля 2014 г. -С. 133.
3. Yamaue, H. Chemosensitivity testing with Highly purified fresh human tumor cells with the MTT – colorimetric assay / H. Yamaue [et al.] // Europ. J. Cancer. – 1991. – Vol. 27, N10. – P. 1258–1263.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунатяна и др. — М.: Гриф и К, 2012. — 244 с.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант Б13МН-003).