

ПОРІВНЯННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ОКИСНЕННЯ ГЛЮКОЗИ ЛІНІЯМИ ПУХЛИННИХ КЛІТИН ЗА ДІЇ ЕКСТРАКТІВ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН

Н. П. Шемедюк, В. І. Буцяк

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій ім. С. З. Гжицького

Порівнювали інтенсивність процесу окиснення глюкози, використовуючи дві пухлинні лінії клітин: MDA-MB-231, 4T1. Клітини культивувались у середовищі з екстрактами лікарських рослин: POTENTILLA ERECTA, SOPHORA JAPONICA, CHELIDONIUM MAJUS. У культурах пухлинних клітин відбувається гальмування утилізації глюкози за дії екстрактів перстачу прямостоячого, софори японської, чистотілу звичайного та відповідно проліферативної активності клітин за дії певних досліджуваних концентрацій.

Отриманий результат впливу екстрактів зумовлений тим, що досліджувані рослини володіють антиоксидантними властивостями — нейтралізують вільнорадикальні процеси у пухлинних клітинах, а отже, мають вплив на процеси канцерогенезу. Сапоніни, флавоноїди здатні до інгібування сульфгідрильних комплексів цистеїну, який входить до активних центрів ферментів, пригнічують активність ферментних систем аеробного і анаеробного окиснення, швидкість поділу та синтезу білків у пухлинних клітинах.

Ключові слова: КУЛЬТУРА КЛІТИН, ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ, ОКИСНЕННЯ ГЛЮКОЗИ

Ще у 1924 р. Отто Варбург показав, що пухлинні клітини отримують енергію шляхом гліколізу і перехід на безкисневу енергетику призводить до автономного та безконтрольного їх існування. Важлива роль гліколізу та пов'язаних з ним процесів у канцерогенезі, де кожен із метаболічних шляхів, які беруть участь у регуляції обміну глюкози, може перехрещуватися з іншими (наприклад, тими, що регулюють передачу онкогенних сигналів, забезпечують ухиляння клітин від апоптозу, активують ангиогенез, змінюють рухливість клітин, тощо) [1].

Пухлинні клітини при посиленій проліферації потребують значної кількості енергії; хоч у процесах окисного фосфорилування з молекули глюкози утворюється більше молекул АТФ, її синтез при гліколізі проходить значно швидше і залежить, майже виключно, від надходження у клітину глюкози, тоді як в реакціях окисного фосфорилування утворення АТФ обмежено повільним транспортом НАДН з цитозолу до електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. У випадку гальмування гліколізу компенсаторне підвищення інтенсивності окисного фосфорилування все ж було неспроможне повністю задовільнити метаболічні потреби пухлинної клітини — в них знижувався рівень АТФ, трансмембранний потенціал мітохондрій та проліферативний ріст. Інша причина, з якої гальмування гліколізу призводить до гальмування проліферації, полягає у тому, що продукти обміну глюкози забезпечують підтримку проліферації пухлинних клітин шляхом використання кінцевих продуктів гліколізу для синтезу нуклеїнових кислот, а також ліпідів, які необхідні для формування мембран [2–4].

Ліки рослинного походження використані у дослідженні містять природні сполуки, до яких людина еволюційно пристосувалась. У складі рослинних тканин знаходиться величезна кількість близьких за структурою речовин, взаємно посилюючи, доповнюючи дію один одного, побічні та токсичні ефекти яких мізерні або й відсутні. Сесквітерпенові лактони, сапоніни, флавоноїди здатні до інгібування сульфгідрильних комплексів цистеїну, який входить до активних центрів ферментів, пригнічують активність ферментних систем аеробного і анаеробного окиснення, швидкість поділу та синтезу білків у пухлинних клітинах [5–7].

З метою з'ясування інтенсивності процесів обміну вуглеводів у культурах клітин при дії екстрактів лікарських рослин перстачу прямостоячого (*Potentilla erecta*), софори японської (*Sophora japonica*), чистотілу звичайного (*Chelidonium majus*) провели порівняльні дослідження рівня утилізації глюкози.

Матеріали і методи

Дослід проведено на лінії пухлинних клітин MDA-MB-231 (пухлина молочної залози людини) та 4Т1(пухлина молочної залози мишей), клітини отримано у Природничому університеті у Вроцлаві (Польща).

Рівень утилізації глюкози визначали глюкозооксидазним методом, виміри проводили на фотометрі Multiscan RC за $\lambda=540\text{nm}$ на 24, 48, 72 годину культивування клітин з екстрактами. До уваги взято показник оптичної густини середовища (проба без клітин).

Використовували нерозведені екстракти 10 мкл на 1 мл середовища, екстракти у розведенні 1:10 у воді у кінцевій концентрації 1 мкл на 1 мл середовища, у розведенні 1:100 у воді у кінцевій концентрації 0,1 мкл на 1 мл середовища. Екстракти вносились через 24 год після висіву клітин на 96-лункові планшети.

Контролем слугувала інтактна культура клітин. Також до уваги брали 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.

Дослід проводився у трьох паралелях.

Дані опрацьовані методом варіаційної статистики за критерієм t-Стюдента.

Результати й обговорення

Високі концентрації глюкози у середовищі та низький рівень її утилізації за дії 10 мкл/мл екстрактів перстачу прямостоячого, чистотілу звичайного (рис. 1). Ці показники можуть підтверджувати низьку проліферативну здатність досліджуваних популяцій MDA-MB-231 та 4Т1. На 24 год концентрація глюкози у середовищі, де культивуються MDA-MB-231, за дії перерахованих екстрактів низька (показник оптичної густини поглинання 0,6–0,7 для різних екстрактів) на 48, 72 год майже не змінюється. Аналогічні результати культивування клітин 4Т1 за відповідних умов.

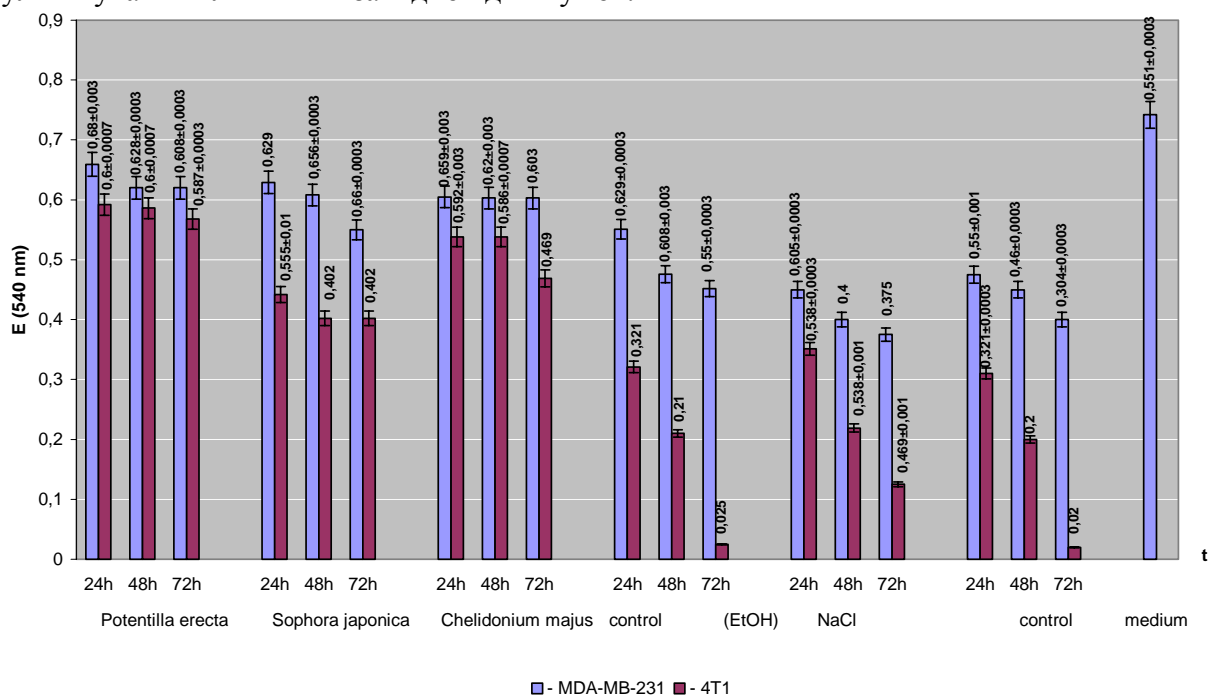


Рис. 1. Динаміка зміни рівня утилізації глюкози за дії екстрактів рослин у концентрації 10 мкл/мл середовища

За дії 10 мкл/мл середовища екстракту софори японської на клітини MDA-MB-231 показник оптичної густини поглинання середовища $0,629 \pm 0,0003$ (24 год), на 48 год — $0,608 \pm 0,0003$, на 72 год — $0,55 \pm 0,0003$, що свідчить про значно нижчий рівень утилізації глюкози, порівняно з контролем (рис. 1). Але зменшення концентрації глюкози у часовому відрізку свідчить про існування життєздатної, молочисельної популяції. Аналогічна поведінка клітин 4T1 за дії цього екстракту. Початкова кількість глюкози у середовищі характеризується показником поглинання оптичної густини середовища $0,742$.

Досліджуючи рівень утилізації глюкози за дії на клітини $0,9\% \text{ NaCl}$, істотної різниці відносно контролю не спостерігаємо. Незначні відмінності, відносно контролю, результату культивування клітин з етанолом у різних концентраціях. Ці дані свідчать про можливість дослідження дії біологічно активних речовин екстрактів рослин.

Досліджуючи вплив екстрактів перстачу прямостоячого, софори японської, чистотілу звичайного у концентрації 1 мкл/мл середовища на клітини MDA-MB-231 спостерігаємо низький рівень використання глюкози на 24 год, на 48 год не відбувається утилізації глюкози. Дані (рис. 2), можливо, свідчать про відсутність проліферації клітин, поступове відмирання популяцій.

Лінія клітин 4T1 є менш чутливою до дії екстракту перстачу прямостоячого, оскільки концентрація глюкози у середовищі різко зменшується (на 72 год показник оптичної густини поглинання середовища $\approx 0,1$, у контролі — $0,02$). За дії софори японської використання глюкози майже зупиняється на 48 год (показник оптичної густини поглинання середовища $0,413 \pm 0,0003$, $0,337 \pm 0,0013$ відповідно). Низький рівень утилізації глюкози за дії екстракту чистотілу звичайного у концентрації 1 мкл/мл середовища порівняно з контролем.

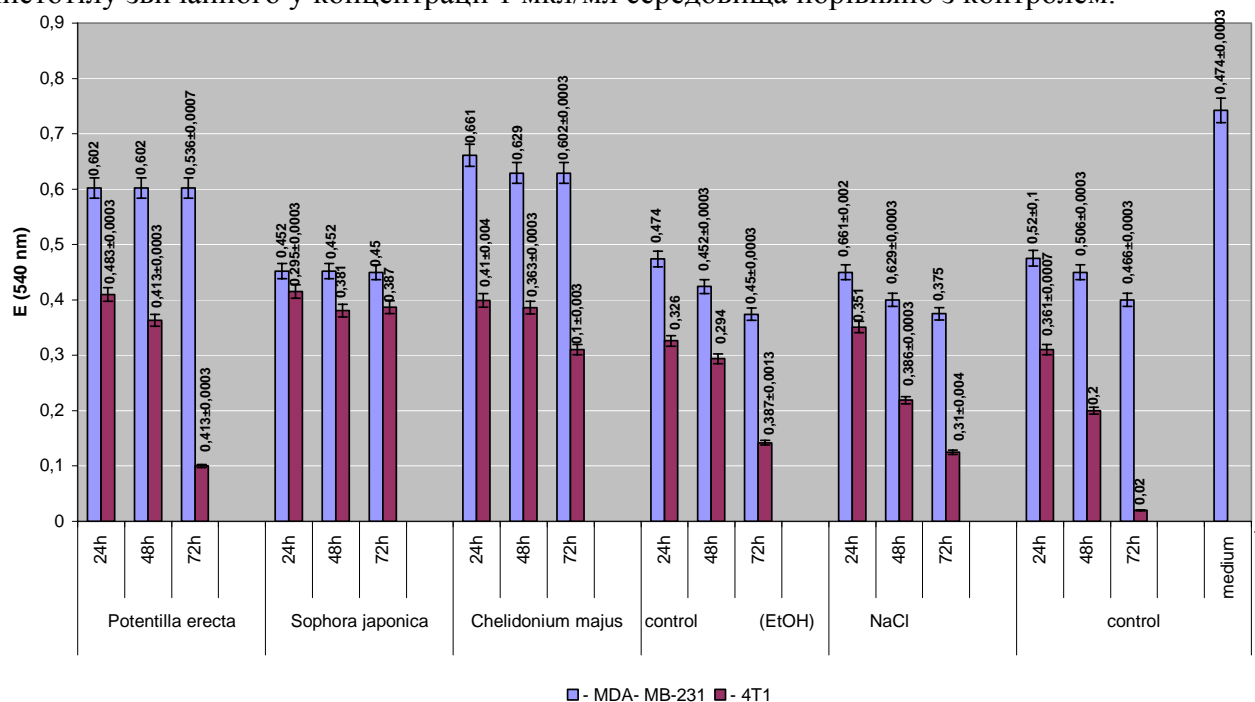


Рис. 2. Динаміка зміни рівня утилізації глюкози за дії екстрактів рослин у концентрації 1 мкл/мл середовища

Досліджуючи вплив екстрактів перстачу прямостоячого, софори японської, чистотілу звичайного у концентрації $0,1$ мкл/мл середовища на клітини MDA-MB-231, спостерігаємо низький рівень використання глюкози на 24 год (рис. 3), який залишається таким і на 72 год культивування.

Концентрація глюкози у середовищі, де культивуються клітини 4T1, за дії перстачу прямостоячого, софори японської, чистотілу звичайного у концентрації $0,1$ мкл/мл середовища неістотно відрізняється від такої у контрольних зразках.

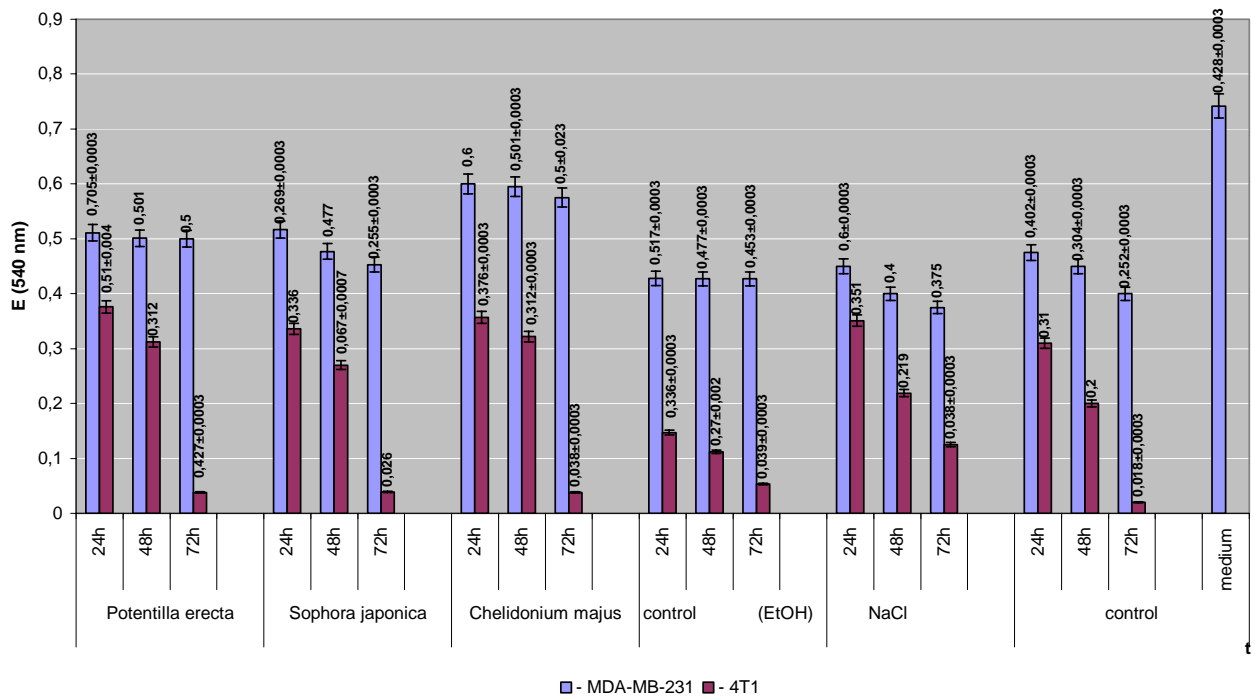


Рис. 3. Динаміка зміни рівня утилізації глюкози за дії екстрактів рослин у концентрації 0,1 мкл/мл середовища. При культивуванні клітин у середовищі з екстрактами лікарських рослин, рівень утилізації глюкози у культурах залежить від часу культивування з діючою речовиною, виду лікарської рослини, концентрації екстракту, клітинної культури.

Отриманий результат впливу екстрактів зумовлений токсичністю найвищої діючої дози. Вплив мінімальної діючої дози зумовлений тим, що *Potentilla erecta* володіє антиоксидантними властивостями — нейтралізує вільнорадикальні процеси у пухлинних клітинах. *Potentilla erecta* вважається протипухлинним засобом, оскільки одною з біологічно активних речовин є сангвінарин [8]. Сапоніни, флавоноїди здатні до інгібування сульфгідрильних комплексів цистеїну, який входить до активних центрів ферментів, пригнічують активність ферментних систем аеробного і анаеробного окиснення, швидкість поділу та синтезу білків у пухлинних клітинах.

Характер впливу екстракту *Sophora japonica* у меншій мірі пов'язаний з токсичністю рослини. Негативний вплив на пухлинні клітини зумовлений тим, що *Sophora japonica* володіє антиоксидантними властивостями — нейтралізує вільнорадикальні процеси. Протипухлинна дія *Sophora japonica*, можливо, пов'язана з лектином насіння [9]. Алкалоїд софокаргин може бути причиною проапоптотичних змін, низького приросту кількості клітин у популяціях пухлинних клітин.

Оскільки *Chelidonium majus* є протипухлинною лікарською рослиною, зменшення приросту кількості клітин у популяціях досліджуваних ліній зумовлене наявністю антиоксидантів, алкалоїдів у відповідному екстракті.

Висновки

- У культурі клітин MDA-MB-231 відбувається гальмування утилізації глюкози за дії екстрактів перстачу прямостоячого, софори японської, чистотілу звичайного та відповідно проліферативної активності клітин за дії усіх досліджуваних концентрацій.
- Культура 4T1 є менш чутливою до дії біологічно активних речовин рослин. Відбувається гальмування утилізації глюкози за дії екстрактів софори японської, чистотілу звичайного у концентрації 10 мкл, 1 мкл на 1 мл середовища, за дії екстракту перстачу прямостоячого у концентрації 10 мкл на 1 мл середовища та інгібування проліферативної активності клітин.

Перспективи подальших досліджень. Результати досліджень можуть бути використані у трактуванні механізмів протипухлинної дії досліджуваних препаратів у дослідах *in vitro* (культура пухлинних клітин МДА-МВ-231, 4Т1) та *in vitro*.

N. Shemediuk, V. I. Butsyak

GLUCOSE OXIDATION INTENSITY IN TUMOR CELLS WHILE PLACING MEDICINAL PLANT TINCTURE IN THE NUTRIENT MEDIUM

S u m m a r y

Glucose oxidation intensity processea using two tumor lines: MDA-MB-23I, 4T1 were compared. Level of utilization of glucose in cells was researchede under the influence of medicinal plants: potentilla erecta, rosa majalis, fagopyrum sagittatum, sophora japonica, hypericum perforatum, valiriana officinalis, chelidonium majus.

Н. П. Шемедюк, В. И. Буцяк

СРАВНЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ ШТАМАМИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

А н н о т а ц и я

В нашей работе значительное внимание уделено исследованию влияния лекарственных растений, биологически активные вещества (БАВ) (витамины, фенольные соединения, терпеноидов) которых активизируют антиокислительные, антирадикальные процессы. Согласно современным представлениям, свободно-радикальные процессы и регуляция их уровня играют существенную роль в условиях канцерогенеза и злокачественного роста.

1. *Мишуніна Т. М.* Механізми, переваги та наслідки активації гліколізу у пухлинних клітинах / Т. М. Мишуніна // Журн. АМН України. — 2009. — Т. 15, № 3. — С. 417–448.
2. *Bui T.* Cancer's sweet tooth / T. Bui, C. Thompson // Cancer Cell. — 2006. — 9, № 6. — P. 419–420.
3. *DeBerardinis R.* Brick by brick: metabolism and tumor cell growth / R. DeBerardinis, N. Sayed, D. Ditsworth, C. Thompson // Curr. Opin. Genet. Dev. — 2008. — 18. — P. 54–61.
4. *Homen de Bittencourt P.* Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture: evidence for a lipid exporting capax / P. Homen de Bittencourt, C. Peres, M. Yano // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1993. — 30, № 4. — P. 631–641.
5. *Robak J.* Bioactivity of flavonoids / J. Robak, R. J. Gryglewski // J. Pol. Pharmacol. — 1996. — Vol. 48, № 6. — P. 555–564.
6. *Балицкий К. П.* Растительные растения и рак / К. П. Балицкий, А. Л. Воронцова. — К. : Наукова думка, 1982. — 376 с.
7. *Барабой В. А.* Растительные фенолы и здоровье человека / В. А. Барабой. — М. : Наука, 1984. — 160 с.
8. *Godowski K. C.* Antimicrobial action of sanguinarine / K. C. Godowski // J.Clin. Dent. — 1989. — V. 1, № 4. — P. 96–101.
9. *Антонюк В. О.* Лектини та їх сировинні джерела / В. О. Антонюк. — Львів : ПП. «Кварт», 2005. — 554 с.

Рецензент: доктор біологічних наук, професор Антоняк Г. Л.