

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-5-32-35  
© Коллектив авторов, 2019

Е. Н. Амосова<sup>1</sup>, Е. П. Зуева<sup>1</sup>, К. А. Лопатина<sup>1, 2</sup>, Е. А. Сафонова<sup>1, 2</sup>,  
Т. Г. Разина<sup>1</sup>, О. Ю. Рыбалкина<sup>1, 2</sup>, Л. Н. Зибарева<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОИДОВ *LYCHNIS CHALCEDONICA* L. НА РАЗВИТИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЕЙ У МЫШЕЙ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е. Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Россия, 634028, Томск, проспект Ленина, д. 3.

<sup>2</sup> Томский государственный университет, Россия, 634050, Томск, проспект Ленина, д. 36.

\* e-mail: zep0929@mail.ru

Из интродуцированного в Сибирском ботаническом саду ТГУ *Lychnis chalconica* L. получен комплекс биологически активных веществ. Анализ с использованием метода ВЭЖХ свидетельствует о том, что выделенные вещества представляют собой комплекс флавоноидов с временами удерживания 10,40; 12,45; 13,29 и 15,47 мин. Мажорным компонентом флавоноидного комплекса является виценин, пик с  $t_r = 13,29$  мин, площадь которого составила 87,4 %. Изучение комплекса флавоноидов *Lychnis chalconica* L. проведено на 3 моделях перевиваемых опухолей: карцинома легких Льюис (LLC), меланома В-16 (В-16), рак легкого РЛ-67 (РЛ-67). Результаты экспериментов на мышях линии С57Вl/6 показали, что комплекс флавоноидов *Lychnis chalconica* ингибирует развитие меланомы В-16, а при сочетанном применении флавоноидов лихниса с циклофосфамидом увеличивает антибластомную активность цитостатика у животных с В-16, РЛ-67 и LLC.

**Ключевые слова:** флавоноиды *Lychnis chalconica* L.; перевиваемые опухоли; цитостатическая терапия.

В последние годы накопилось немало данных о влиянии флавоноидов на развитие опухолевого процесса. Эти вещества обладают антиканцерогенным и противоопухолевым действием, избирательно ингибируют ферменты, активирующие проканцерогены, модифицируют активирующую и детоксицирующую фазы метаболизма проканцерогенов, активируют систему адаптации клеток к окислительному стрессу, подавляют воспаление, являющееся одной из первых реакций организма на химический канцерогенез [1 – 10]. Флавоноиды индуцируют клеточный апоптоз в опухоли, являются индукторами дифференцировки и могут рассматриваться как перспективные средства для терапии лейкозов [3, 11, 12]. Выявлено, что флавоноиды повышают активность естественных киллерных клеток у мышей и индуцируют продукцию генов, определяющих синтез ряда цитокинов (интерферонов  $\gamma$  и  $\alpha$ , ФНО- $\alpha$ ) [10]. У антоцианинов из ягод (голубика, черника, клюква, бузина, малина, земляника) обнаружены антиангиогенные свойства. Обработка экстрактом, содержащим эти вещества, клеток эндотелиомы снижала их способность к образованию гемангиомы и подавляла развитие опухоли более чем на 50 % [13].

Лихнис халцедонский (*Lychnis chalconica* L.) — растение семейства *Caryophyllaceae*. Этот вид содержит различные биологически активные вещества: эйдистероиды [14], флавоноиды, которые представлены

С-гликозилированными производными апигенина — виценином и неовитексином, а также оксикоричные кислоты [15]. Установлено, что экстракт *Lychnis chalconica*, содержащий флавоноиды, обладает анаболическим, гипополипидемическим, противовоспалительным, гемореологическим [16, 17], противогрибковым и радиопротекторным действием [14].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния флавоноидов *Lychnis chalconica* на развитие перевиваемых опухолей у мышей и эффективность цитостатической терапии.

### Экспериментальная химическая часть

**Выделение флавоноидов из растительного сырья.** Экстракцию воздушно-сухого сырья (200 г), интродуцированного в Сибирском ботаническом саду ТГУ, *Lychnis chalconica* проводили трехкратно 70 % этиловым спиртом (4500 мл). Для удаления экстрагента объединенный экстракт концентрировали при температуре 50 °С с помощью вакуумного ротационного испарителя ИКА НВ 10 digital (Германия). Концентрированный экстракт разбавляли водой до соотношения 1:3 по объему и фильтровали. Фильтрат очищали от липофильных веществ при помощи *n*-гексана. Извлечение суммы биологически активных веществ из очищенного фильтрата осуществляли многократной экс-

тракцией *n*-бутанолом, при этом из водной фракции выпадал осадок желто-коричневого цвета, который отделяли. Контроль содержания БАВ во фракциях осуществляли методом ТСХ. Выход бутанольной фракции составил 5,8 %, флавоноидной фракции — 0,7 % (в расчете на сырье). В последующем комплекс флавоноидов подвергали очистке селективной экстракцией системами растворителей этилацетат — этанол в соотношении 5:1 и 3:1. Полученный порошок имел желтоватую окраску. Идентификация комплекса флавоноидов, выделенного из надземной части *Lychnis chalconica*, проведена методами ВЭЖХ и УФ-спектроскопии. ВЭЖХ-анализ свидетельствует о том, что очищенный порошок представляет собой комплекс флавоноидов. В УФ-спектрах 4 соединений, разделенных методом ВЭЖХ, с временем удерживания 10,40, 12,45; 13,29 и 15,47 мин присутствуют по 2 максимума поглощения — 270 и 347; 268 и 331; 271 и 336; 272 и 334 нм соответственно, обусловленные присутствием 2 ароматических колец А и В.

Мажорным компонентом флавоноидного комплекса является пик с  $t_r = 13,29$  мин, площадь которого составила 87,4 %, идентифицированный с С-дигликозидом апигенина — виценином, сахарными компонентами которого являются глюкоза и арабиноза. Другой флавоноид с временем удерживания 15,47 мин отождествлен с С-моногликозидом апегенина — неовитексином [14, 15].

#### Экспериментальная биологическая часть

Эксперименты выполнены на 232 мышах-самках линии С57В1/6 массой 19 – 24 г (возраст 2 – 3 мес), полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИФиРМ имени Е. Д. Гольдберга (сертификат качества № 18805). Содержание животных и манипуляции с ними осуществляли в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позво-

ночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [18]. Карциному легких Льюис (LLC), меланому В-16 (В-16), рак легкого РЛ-67 (РЛ-67) перевивали внутримышечно (в левую заднюю лапу)  $(4 \div 5) \cdot 10^6$  клеток в 0,1 мл физиологического раствора по общепринятым методам [19].

Флавоноиды лихниса халцедонского (ФЛ) вводили зондом в желудок в дозах 16, 24 и 1600 мкг/кг с 7 – 9 сут после перевивки в течение 10 – 12 сут.

При проведении цитостатической терапии использовали циклофосфамид (ЦФ) (Cyclophosphamide, циклофосфан, производитель ООО “Биохимик”, Саранск, Россия), который вводили однократно внутривентриально в дозе 125 мг/кг мышам с LLC и РЛ-67 на 10 или 11 сут после перевивки опухоли, животным с меланомой В-16 — на 21 сут.

Эффективность лечебных воздействий оценивали на 19 (РЛ-67), 20 – 21 (LLC) и 25 (В-16) сут эксперимента, при этом определяли массу опухоли, процент торможения её роста (ТРО), количество метастазов в легких и их площадь, частоту метастазирования в процентах к контролю, индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) [19, 20]. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики с использованием *t* критерия Стьюдента и непараметрических критериев Вилкоксона — Манна — Уитни (*U*) и углового преобразования Фишера ( $\phi$ ) с помощью программы “Statistica 6.0”. Значимость различий считали достоверной при  $p < 0,05$  [21, 22].

#### Результаты и их обсуждение

Результаты проведенного исследования показали, что ФЛ при их изолированном введении в дозах 16 и 1600 мкг/кг не оказывали влияния на развитие опухолевого процесса у мышей с LLC и РЛ-67 (табл. 1).

У животных с В-16 ФЛ ингибировали развитие опухолевого процесса. Так, масса опухоли при использо-

Влияние ФЛ на развитие перевиваемых опухолей у мышей-самок линии С57В1/6

Таблица 1

Группа наблюдения, режим введения препаратов (количество животных)	Масса опухоли ( $X \pm m$ ), г	ТРО, %	Частота метастазирования, %	Количество метастазов ( $X \pm m$ )	Площадь метастазов ( $X \pm m$ ), мм <sup>2</sup>	ИИМ, %
<b>LLC</b>						
1. Контроль (7)	7,39 ± 0,24		100	35,00 ± 4,88	96,0 ± 19,4	
2. ФЛ 16 мкг/кг × 11 (9)	7,53 ± 0,40	–2	100	28,78 ± 4,73	116,2 ± 18,9	18
3. ФЛ 1600 мкг/кг × 11 (9)	7,09 ± 0,31	4	100	35,44 ± 4,51	107,8 ± 17,8	–1
<b>В-16</b>						
1. Контроль (10)	5,89 ± 0,44	-	100	6,40 ± 2,38	3,3 ± 1,1	-
2. ФЛ 16 мкг/кг × 14, (10)	3,55 ± 0,36 $^{1-2}p < 0,01$	40	70 $^{1-2}p < 0,01$	1,80 ± 0,61 $^{1-2}p < 0,05$	0,3 ± 0,2 $^{1-2}p < 0,01$	80
3. ФЛ 1600 мкг/кг × 14 (9)	3,57 ± 0,32 $^{1-3}p < 0,01$	39	67 $^{1-3}p < 0,01$	3,89 ± 2,78 $^{1-3}p < 0,05$	1,4 ± 1,1 $^{1-3}p < 0,05$	59
<b>РЛ-67</b>						
1. Контроль (10)	5,81 ± 0,32		100	12,60 ± 2,97	34,4 ± 12,9	
2. ФЛ 16 мкг/кг × 10 (9)	6,30 ± 0,32	–8	100	11,11 ± 2,12	26,3 ± 4,8	12
3. ФЛ 1600 мкг/кг × 10 (10)	5,32 ± 0,22	8	100	9,50 ± 2,10	21,7 ± 4,0	25

Здесь и в табл. 3 перед уровнем значимости *p* указаны номера сравниваемых групп.

## Влияние ФЛ на развитие опухолевого процесса и эффективность цитостатического лечения

Экспериментальная модель, линия мышей (количество)	Критерии эффективности химиотерапии								
	ТРО, %			частота метастазирования, %			ИИМ, %		
	ФЛ	ЦФ	ЦФ + ФЛ	ФЛ	ЦФ	ЦФ + ФЛ	ФЛ	ЦФ	ЦФ + ФЛ
<b>ФЛ, 16 мкг/кг</b>									
LLC, C57Bl/6 (36)	-2	25*	26	100	80*	100**	18	95	88
B-16, C57Bl/6 (39)	40*	29*	49**	70*	70*	78	80	79	40
РЛ-67, C57Bl/6 (39)	-8	34*	46	100	40*	50	12	93	97
<b>ФЛ, 1600 мкг/кг</b>									
LLC, C57Bl/6 (36)	4	25*	19	100	80*	100**	-1	95	89
B-16, C57Bl/6 (39)	39*	29*	46**	67*	70*	90	59	79	58
РЛ-67, C57Bl/6 (40)	8	34*	52**	100	40*	40	25	93	97

\*  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\*  $p < 0,05$  по сравнению с группой, получавшей ЦФ.

вании ФЛ в дозе 16 мкг/кг уменьшилась в 1,7 раза по сравнению контрольной группой, при этом частота метастазирования снизилась до 70 % (против 100 % в контроле), уменьшилось количество метастатических узлов в легких (в 3,6 раза) и их площадь (табл. 1), ИИМ составил 80 %. Увеличение дозы ФЛ до 1600 мкг/кг не приводило к повышению антибластомного действия: ТРО и ИИМ составляли 39 и 59 % соответственно (табл. 1) и находились на уровне значений этих показателей в группе животных, которым ФЛ вводили в дозе 16 мкг/кг.

При исследовании влияния ФЛ на эффективность лечения мышей с перевиваемыми опухолями ЦФ обнаружено увеличение антибластомной активности цитостатика под влиянием ФЛ у животных с В-16 и РЛ-67, а при их назначении мышам с 3LL повышения противоопухолевого действия ЦФ не наблюдалось (табл. 2).

При включении в схему лечения животных с В-16 ФЛ в дозе 16 мкг/кг отмечалось достоверное уменьшение массы опухоли, ТРО составило 49 % против 29 % в группе, получавшей только ЦФ (табл. 2). Аналогичный эффект выявлен при использовании ФЛ в дозе 1600 мкг/кг у мышей с В-16 и РЛ-67; ТРО возросло до 46 и 52 % соответственно против 29 и 34 % у животных, леченных одним цитостатиком (табл. 2).

Сравнительное изучение действия ФЛ в дозах 16 и 24 мкг/кг в эксперименте на мышах с LLC показало, что ФЛ при их изолированном введении, как и в ранее проведенном на этой модели опыте, не оказывали влияния на развитие опухолевого процесса (табл. 3).

При сочетанном применении цитостатика с ФЛ отмечено увеличение антимагистатической активности ЦФ. У мышей, получавших цитостатик и ФЛ в дозе 16 мкг/кг, метастазов в лёгких оказалось в 2,6 раза меньше по сравнению с группой, которой вводили только ЦФ (табл. 3). Повышение дозы флавоноидов до 24 мкг/кг приводило к возрастанию антимагистатической активности; частота метастазирования достоверно снизилась до 80 % против 100 % в группе, получавшей цитостатик. При этом обнаружено уменьшение как количества метастазов (в 2,9 раза), так и их площади (в 2,1 раза) по сравнению с этими показателями у мышей, которые получали ЦФ.

Проведенные исследования показали, что комплекс ФЛ, содержащий С-дигликозид апигенина (виценин) и С-моногликозид атегенина (неовитексин), при его изолированном использовании ингибирует развитие опухолевого процесса у мышей с В-16. Обнаружено увеличение антибластомной активности ЦФ у животных с В-16, РЛ-67 и LLC в результате сочетанного применения ФЛ с цитостатиком.

## Влияние ФЛ на развитие карциномы легких Льюис и эффективность цитостатического лечения у мышей-самок линии C57Bl/6

Группа наблюдения, режим введения препаратов (количество животных)	Масса опухоли ( $X \pm m$ ), г	ТРО, %	Частота метастазирования, %	Количество метастазов ( $X \pm m$ )	Площадь метастазов ( $X \pm m$ ), мм <sup>2</sup>	ИИМ, %
1. Контроль (10)	6,7 ± 0,3		100	29,3 ± 3,1	78,6 ± 15,1	
2. ЦФ 125 мг/кг × 1 (10)	5,4 ± 0,3 <sup>1-2</sup> $p < 0,01$	19	100	15,1 ± 2,95 <sup>1-2</sup> $p < 0,01$	6,9 ± 2,4 <sup>1-2</sup> $p < 0,01$	48,5
3. ФЛ 16 мкг/кг × 11 (10)	6,8 ± 0,3	-1	100	31,9 ± 4,97	81,9 ± 26,6	-8,9
4. ФЛ 24 мкг/кг × 11 (10)	6,1 ± 0,4	9	100	35,0 ± 7,7	87,9 ± 36,6	-19,5
5. ЦФ 125 мг/кг × 1 + ФЛ 16 мкг/кг × 11 (10)	5,0 ± 0,4	25	90	5,8 ± 2,0 <sup>2-5</sup> $p < 0,01$	6,1 ± 2,3	82,2
6. ЦФ 125 мг/кг × 1 + ФЛ 24 мкг/кг × 11 (10)	5,2 ± 0,4	22	80 <sup>2-6</sup> $p < 0,01$	5,2 ± 1,8 <sup>2-6</sup> $p < 0,01$	3,3 ± 1,7 <sup>2-6</sup> $p < 0,05$	85,8

Обнаруженные эффекты, по-видимому, обусловлены апигенином, который в исследованиях *in vitro* на клеточных линиях рака молочной железы и рака поджелудочной железы человека оказывал выраженное антипролиферативное действие, повышая уровень апоптоза в культуре клеток [15, 19, 23, 24]. При этом установлено, что активация апоптоза при инкубации клеток с этим флавоноидом связана с высвобождением цитохрома С и активацией каспазы 3 [15]. Существуют данные о том, что апигенин вызывает повышение экспрессии рецепторов клеточной смерти DR4/DR5, активацию каспазы 8, таким образом активируя апоптоз. Кроме того, под влиянием апигенина происходит экспрессия и активация белка Bid, который запускает реакцию, приводящую к образованию пор в митохондриях и высвобождению цитохрома С, что также приводит к инициации апоптоза [12]. Как известно, в опухолевых клетках снижен уровень индукции апоптоза [25] и активация этого процесса под действием гликозидов апегинина, выделенных из ФЛ, может являться одним из механизмов их антибластомного действия.

Важную роль в регуляции межклеточных контактов, адгезии и миграции клеток играют интегрины. Апигенин может блокировать интегрин  $\beta 5$  и, таким образом, ингибировать процесс метастазирования [12].

Полученные нами результаты и данные литературы свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения ФЛ и создания на их основе средства для увеличения эффективного цитостатического лечения.

Работа выполнена в рамках программы конкурентоспособности Томского государственного университета.

## ЛИТЕРАТУРА

1. П. Б. Цыдендамбаев, Б. С. Хышиктуев, С. М. Николаев, *Бюл. ВСНЦ СО РАМН*, **52**(6), 229 – 233 (2006).
2. В. Ф. Корсун, В. М. Лахтин, Е. В. Корсун, А. Мицконас, Фитолектины, *Практическая медицина*, Москва (2007).
3. Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрашилов, Е. Н. Музафаров, *Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина*, Synchronbook, Пушино (2013).

4. Г. А. Белицкий, К. И. Кирсанов, Е. А. Лесовая, М. Г. Якубовская, *Успехи молек. онкол.*, **1**(1), 56 – 68 (2014).
5. В. Ю. Богачев, О. В. Голованова, А. Н. Кузнецов, А. О. Шекочян, *Ангиология и сосуд. хирургия*, **19**(1), 73 – 81 (2013).
6. V. Martino, *Fcta Farm. Bonaerense*, **19**(4), 303 – 308 (2000).
7. W. B. Grant, *J. Nutr. Environ. Med.*, **12**(3), 187 – 196 (2002).
8. Z. R. S. Rosenberg, D. J. A. Jenkin, E. P. Diamandis, *J. Chromatogr. B.*, **777**(1 – 2), 219 – 232 (2002).
9. В. Н. Зиновьева, А. А. Спасов, *Биомед. химия*, **58**(2), 160 – 175 (2012).
10. H. Wie, L. Tye, E. Bresnick, *Cancer Res.*, **50**(3), 499 – 502 (1990).
11. Huang Hua-yi, Zha Xi-liang, *Chin J. New Drugs Clin. Rem.*, **21**(7), 428 – 433 (2002).
12. М. Н. Kim, *J. Cell. Biochem.*, **89**(3), 529 – 538 (2003).
13. Д. Багхи, К. К. Сен, М. Багхи, М. Аталай, *Биохимия*, **69**(1), 95 – 102 (2004).
14. Л. Н. Зибарева, *Фитоэкдистероиды растений семейства Caryophyllaceae*, Lambert, Германия (2012).
15. И. М. Смолякова, С. Н. Авдеев, Г. И. Калинин и др., *Химия раст. сырья*, **3**, 95 – 102 (2010).
16. О. А. Федина, Т. М. Плотникова, А. В. Ямкин, *Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии*, Томск (2002), сс. 153 – 157.
17. М. Б. Плотников, О. И. Алиев, А. С. Васильев и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **139**(1), 68 – 71 (2005).
18. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other scientific purposes, Council of Europe, Strasburg (1986).
19. З. П. Софьина, А. Б. Сыркин, А. Голдин, А. Кляйн, *Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США*, Медицина, Москва (1980).
20. С. А. Архипов, В. М. Юнкер, Е. В. Грунтенко, *Исследование по индукции и метастазированию опухолей у экспериментальных животных*, Новосибирск (1984).
21. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1999).
22. В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева, Е. И. Маевский, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств*, Медицина, Москва (2005).
23. А. М. Щербачков, О. Е. Андреева, *Acta Naturae*, **7**(3(26)), 149 – 155 (2015).
24. J. L. Johnson, E. G. Mejia, *Mol. Nut. Food Res.*, **57**(12), 2112 – 2227 (2013).
25. Д. Г. Заридзе, *Канцерогенез*, Медицина, Москва (2004).

Поступила 23.01.17

## A STUDY OF THE INFLUENCE OF FLAVONOIDS ISOLATED FROM *LYCHNIS CHALCEDONICA* ON THE DEVELOPMENT OF TRANSFER TUMORS IN MICE AND THE EFFECTIVENESS OF CYTOSTATIC THERAPY

E. N. Amosova<sup>1</sup>, E. P. Zueva<sup>1\*</sup>, K. A. Lopatina<sup>1,2</sup>, E. A. Safonova<sup>1,2</sup>, T. G. Razina<sup>1</sup>, O. Y. Rybalkina<sup>1,2</sup>, and L. N. Zibareva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> E. D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634028 Russia

<sup>2</sup> Tomsk State University, Tomsk, 654050 Russia

\* e-mail: zep0929@mail.ru

A complex of biologically active substances was isolated from plants of *Lychnis chalconica* (L.) introduced in culture at the Siberian Botanical Garden of Tomsk State University. HPLC analysis of the obtained peeled yellow precipitate showed that it represented a complex of flavonoids with retention times  $t_r = 10.40, 12.45, 13.29$  and  $15.47$  min. The major component of the flavonoid complex is vicenin with  $t_r = 13.29$  min and a peak area of 87.4. The activity of the polyphenol compounds of *L. chalconica* was studied on three models of tumors: Lewis lung carcinoma (LLC), melanoma B-16, and lung cancer 67. Results of experiments conducted on female mice of the C57BL/6 line showed that the isolated complex inhibited tumor growth in mice with B-16, and in combination with cyclophosphamide enhanced the antitumor effect of cytostatic in mice with melanoma B-16, lung cancer 67, and LLC.

**Keywords:** flavonoids; *Lychnis chalconica* (L.); transplanted tumors; cytostatic therapy.