

**МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА  
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ИНГИБИТОРОВ  
ПРОТЕИНКИНАЗ**

**Терпинская Т.И.**

*кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник  
государственного научного учреждения Институт физиологии НАН  
Беларуси, г. Минск, Беларусь  
terpinskayat@mail.ru;*

**Янченко Т.Л.**

*младший научный сотрудник государственного научного учреждения  
Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
tanyaya190@gmail.com;*

**Полукошко Е.Ф.**

*научный сотрудник государственного научного учреждения Институт  
физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
efpoluko@list.ru;*

**Аннотация.** Исследовали модулирующее действие бетулиновой кислоты на противоопухолевый эффект ингибиторов протеинкиназ. Показано, что ингибиторы протеинкиназ генистеин и стауроспорин оказывают дозозависимый противоопухолевый эффект в отношении клеток Hela и глиомы С6. Бетулиновая кислота значительно снижает противоопухолевое действие генистеина в отношении обоих типов клеток, несколько ослабляет противоопухолевое действие стауроспорина в отношении клеток Hela и усиливает или не изменяет эффект стауроспорина в отношении клеток глиомы С6.

**Ключевые слова:** опухоль; протеинкиназы; бетулиновая кислота; генистеин; стауроспорин

**MODULATING EFFECT OF BETULINIC ACID ON THE ANTI-  
TUMOR EFFECT OF PROTEIN KINASE INHIBITORS**

**Terpinskaya T.I.**

*Candidate of Biology, Leading Researcher, Institute of Physiology, National  
Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
terpinskayat@mail.ru*

**Yanchanka T.L.**

*Junior Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of  
Belarus, Minsk, Belarus  
tanyaya190@gmail.com;*

***Palukoshka A.F.***

*Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus  
efpoluko@list.ru;*

***Annotation.*** *The modulating action of betulinic acid on the antitumor effect of protein kinase inhibitors was studied. Protein kinase inhibitors genistein and staurosporine have been shown to have a dose-dependent antitumor effect on Hela cells and glioma C6. Betulinic acid significantly reduces the antitumor effect of genistein in relation to both cell types, somewhat weakens the antitumor effect of staurosporine on Hela cells, and enhances or does not change the effect of staurosporine on glioma C6 cells.*

***Keywords:*** *tumor; protein kinases; betulinic acid; genistein; staurosporine*

Протеинкиназы – подкласс киназ, которые фосфорилируют белки по определенным аминокислотным остаткам, что способствует изменению функций белков. Это, в свою очередь, может приводить к активации или ингибированию путей передачи биохимических сигналов, изменению клеточного метаболизма, ускорению пролиферации или дифференцировки, повышению выживаемости или, напротив, чувствительности к индукторам клеточной гибели. Ряд протеинкиназ, в том числе тирозинкиназы и серинтреониновые протеинкиназы, включены в онкогенные сигнальные каскады. Ингибиторы этих протеинкиназ обладают противоопухолевым эффектом [1].

Бетулиновая кислота – биологически активное соединение природного происхождения, оказывающее противоопухолевое действие. Бетулиновая кислота и ее производные продемонстрировали способность модулировать многие каскады онкогенной трансдукции [2]. Исходя из этого, можно предполагать, что бетулиновая кислота будет оказывать влияние на противоопухолевый эффект протеинкиназ. Исследование отдельного и сочетанного действия бетулиновой кислоты и ингибиторов протеинкиназ позволит выяснить роль активности протеинкиназ в противоопухолевом действии бетулиновой кислоты, а также выявить возможные пути усиления противоопухолевого действия при комбинировании различных препаратов.

Цель данной работы – исследовать эффект отдельного и совместного применения бетулиновой кислоты и ингибиторов протеинкиназ на рост опухолевых клеток *in vitro*.

### **Материалы и методы.**

*Реактивы:* бетулиновая кислота (Glentham Life Sciences, Великобритания), генистеин, стауроспорин, пропидиум йодид, (все Sigma Aldrich, США), флуоросферы FLOW-COUNT™ (Beckman Coulter, США).

*Клетки.* Использовали клетки линий Hela (рак шейки матки человека) и глиомы С6 (глиома крысы) из Белорусской коллекции культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Беларусь. Клетки выращивали в питательной среде DMEM (Sigma, Великобритания), дополненной 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Capricorn, Южная Америка).

*Проведение экспериментов.* Клетки высевали в лунки 96-луночных планшетов (Corning, США) в среде DMEM с добавлением 10% ЭТС и антибиотика. Через 24 ч вносили в лунки бетулиновую кислоту (60 мкМ) и/или ингибиторы протеинкиназ (дозы указаны при описании экспериментов), в контроле - растворитель (диметилсульфоксид в конечной концентрации 0,1%). Общий объем клеточной суспензии в лунках составлял 220 мкл. Культивировали 48 ч 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем снимали клетки с планшета. Для определения жизнеспособности клетки окрашивали пропидий йодидом. Для оценки клеточной пролиферации определяли концентрацию клеток в пробах с помощью флуоросфер FLOW-COUNT™ (Beckman Coulter, США согласно рекомендациям производителей. Пробы анализировали методом проточной цитометрии с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II с программным обеспечением Diva 7.0 (Becton Dickinson, США).

### **Результаты.**

В качестве ингибиторов протеинкиназ использовали ингибитор тирозинкиназ генистеин (вещество растительного происхождения, относящееся к изофлавонам) и ингибитор широкого спектра действия стауроспорин (вещество природного происхождения, полученное из *Streptomyces staurosporeus*).

В эксперименте на клетках Hela генистеин в концентрации 10 мкМ не снижал клеточной жизнеспособности, но в то же время оказывал антипролиферативное действие, подавляя рост клеток в 1,5 раза. Бетулиновая кислота в концентрации 60 мкМ подавляла пролиферацию и снижала количество жизнеспособных клеток в пробах в 1,2 раза %. При совместном действии бетулиновой кислоты и генистеина наблюдалось слабое подавление пролиферации (в 1,1 раза) без цитотоксического эффекта (данные не показаны).

Аналогичный эксперимент на клетках глиомы С6 показал, что бетулиновая кислота (60 мкМ) подавляла пролиферацию в 1,3 раза, а генистеин в концентрации 10 мкМ – в 1,7 раза. Увеличение концентрации генистеина до 100 мкМ привело к подавлению роста клеток в 2,3 раза, рис. 1.

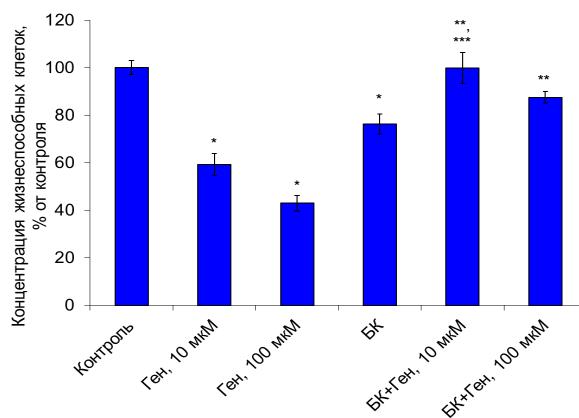


Рисунок 1 – Влияние генистеина (Ген) и бетулиновой кислоты (БК) на рост клеток глиомы С6; \* -  $p < 0,05$  при сравнении с контролем; \*\* -  $p < 0,05$  при сравнении с генистеином; \*\*\* -  $p < 0,05$  при сравнении с БК

Бетулиновая кислота нивелировала эффект генистеина – при применении 10 мкМ генистеина в присутствии бетулиновой кислоты эффекта ингибирования опухолевого роста не наблюдали, при применении 100 мкМ генистеина наблюдалась тенденция к подавлению роста клеток, не достигшая статистической значимости. Отметим также, что эффект бетулиновой кислоты в присутствии генистеина снижался или имел тенденцию к снижению, рис. 1. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что активность тирозинкиназ вовлечена в реализацию эффекта бетулиновой кислоты.

Таким образом, бетулиновая кислота значительно снизила антипролиферативное действие генистеина в отношении клеток Hela и глиомы С6, а генистеин способствовал ослаблению эффекта бетулиновой кислоты.

Еще одним используемым нами соединением, характеризующимся ингибиторной активностью в отношении протеинкиназ, явился стауроспорин. В наномолярных дозах стауроспорин ингибирует активность различных семейств серин-треониновых протеинкиназ – протеинкиназы С, А, cdc2, некоторые тирозинкиназы, а в более высоких, микромолярных дозах, ингибирует широкий спектр протеинкиназ.

При концентрации стауроспорина 0,01 мкМ наблюдалась тенденция к подавлению роста клеток Hela (снижение их количества в пробах в 1,2 раза), бетулиновая кислота не изменяла этот эффект. В концентрации 0,4; 1 и 4 мкМ стауроспорин подавлял рост Hela в 2,3; 3,6 и 4,2 раза соответственно. В присутствии бетулиновой кислоты ингибирующее действие стауроспорина

несколько снизилось, наблюдалось подавление роста клеток в 2,0; 2,7 и 3,6 раза по сравнению с контролем (данные не показаны).

В опытах с глиомой С6 наблюдалось усиление клеточной пролиферации на 20% при действии стауроспорина в концентрации 0,01 мкМ и тенденция к подавлению роста клеток (снижение их количества в пробах на 7%) при действии 0,4 мкМ стауроспорина. Стауроспорин в концентрации 1 мкМ подавлял рост клеток в 1,3 раза, в концентрации 4 мкМ - вдвое, рис. 2. В последнем случае зарегистрировано также снижение жизнеспособности на 3,6%. В опытах с клетками глиомы С6, в отличие от экспериментов с клетками Hela, бетулиновая кислота способствовала усилению противоопухолевого эффекта стауроспорина в концентрации 0,4 и 1 мкМ, рис. 2. Причины такой разницы не ясны. Вероятно, в клетках Hela и С6 механизмы регулирования клеточной пролиферации имеют отличия.

Одной из возможных причин усиления противоопухолевого эффекта при совместном применении стауроспорина и бетулиновой кислоты в отношении клеток глиомы С6 может быть ингибирование бетулиновой кислотой или ее производным каких-либо изоформ протеинкиназы С или других киназ, способствующих росту опухолевых клеток и слабо чувствительных к стауроспорину. В литературе имеются данные о том, что бетулиновая кислота ингибирует H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированную мембранную транслокацию протеинкиназы С, связанную с активацией этого фермента, и фосфорилирование протеинкиназ ERK1/2 и c-Fos [3], задействованных в обеспечении выживаемости и пролиферации клеток. Для уточнения ответа на этот вопрос необходимы дальнейшие исследования с использованием высокоселективных ингибиторов протеинкиназ.

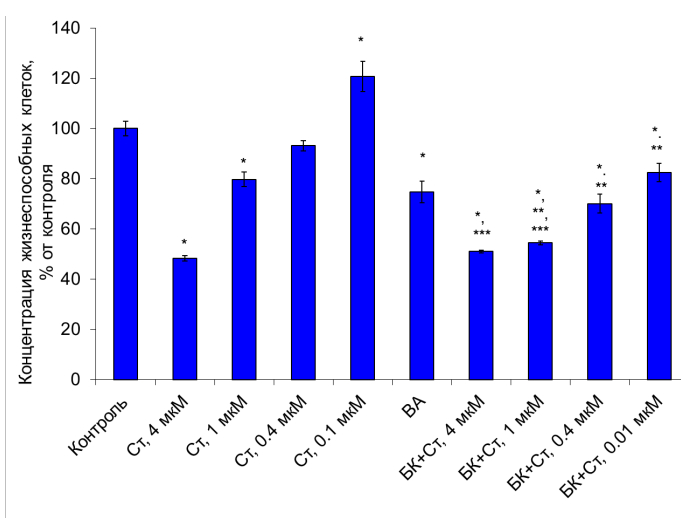


Рисунок 2 – Влияние стауроспорина (Ст) и бетулиновой кислоты (БК) на рост клеток глиомы С6; \* -  $p < 0,05$  при сравнении с контролем; \*\* -  $p < 0,05$  при сравнении с соответствующей дозой стауроспорина; \*\*\* -  $p < 0,05$  при сравнении с БА

В присутствии стауроспорина не происходило статистически значимого снижения противоопухолевой активности бетулиновой кислоты. Это позволяет полагать, что активность стауроспорин-чувствительных протеинкиназ не играет существенной роли в противоопухолевом действии бетулиновой кислоты.

**Заключение.** Ингибиторы протеинкиназ генистеин и стауроспорин оказывают дозозависимое противоопухолевое действие на клетки Hela и глиомы С6. Бетулиновая кислота значительно снижает противоопухолевое действие генистеина в отношении обоих типов клеток, несколько ослабляет противоопухолевое действие стауроспорина на клетки Hela и усиливает или не изменяет эффект стауроспорина на клетки глиомы С6.

### Список литературы

1. Roskoski, R Jr. Small molecule protein kinase inhibitors approved by regulatory agencies outside of the United States / R Jr. Roskoski // *Pharmacol Res.* - 2023. – V. 194:106847.
2. Farooqi, A.A. Multifunctional Roles of Betulinic Acid in Cancer Chemoprevention: Spotlight on JAK/STAT, VEGF, EGF/EGFR, TRAIL/TRAIL-R, AKT/mTOR and Non-Coding RNAs in the Inhibition of Carcinogenesis and Metastasis / A.A. Farooqi, A. Turgambayeva, G. Tashenova et al. // *Molecules.* – 2022. – V. 28, №1:67.
3. Peng, J. Betulinic acid downregulates expression of oxidative stress-induced lipoprotein lipase via the PKC/ERK/c-Fos pathway in RAW264.7 macrophages / J. Peng, Y.C. Lv, P.P. He // *Biochimie.* – 2015. – V.119. – P. 192-203.