

CALENDULA OFFICINALIS (ASTERACEAE) КАК РАДИОСЕНСИБИЛИЗАТОР ДЛЯ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

© 2024 г. С. Д. Колдман^{1, *}, В. А. Колдман^{1, 2}, А. В. Белоусов², Л. И. Мазалецкая³

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина (ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России), г. Москва, Россия

²Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России), г. Москва, Россия

³Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН), г. Москва, Россия

*e-mail: epistularum@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Изучено действие водно-спиртовой настойки календулы лекарственной *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) на опухолевые клетки различного видового и тканевого происхождения, определен ее потенциал как радиосенсибилизатора в сочетании с γ -излучением. Установлено, что настойка календулы вызывает гибель опухолевых клеток независимо от их p53 и p21 статуса. Настойка календулы обладает антиоксидантными свойствами, однако для клеток с активным p21 проявляет радиосенсибилизирующие, а не радиопротекторные свойства. Для клеток с отсутствием p21 настойка календулы является радиопротектором, таким образом, гибель клеток является p21 опосредованной. Проведено исследование радиосенсибилизирующих свойств *C. officinalis* на модели меланомы *in vivo* у мышей. В сочетании с γ -излучением настойка вызывает значительное торможение роста опухоли (на 47%) по сравнению с облучением без препарата. Значительный радиосенсибилизационный эффект и преодоление устойчивости опухолевых клеток, вызванной деактивацией p53, обуславливают перспективность настойки в качестве средства для радиотерапии, позволяющего снизить эффективную дозу облучения в 1.7 раз.

Ключевые слова: *Calendula officinalis*, радиотерапия, меланома, растительные радиосенсибилизаторы

DOI: 10.31857/S0033994624010089, **EDN:** HAAVMG

Календула лекарственная, или ноготки лекарственные (*Calendula officinalis* L.) – травянистое растение семейства Сложноцветные или Астровые (Asteraceae), традиционно используемое для лечения различных заболеваний кожи и слизистых. Изучение химического состава *C. officinalis* впервые начато в конце XIX в. с исследования красящих пигментов цветков *C. officinalis*, однако регулярными исследования метаболитов этого вида и рода стали только во второй половине XX в. К настоящему времени идентифицировано 529 соединений, выделенных из *C. officinalis* [1]. Наиболее часто в фармакологии и косметологии используют цветки *C. officinalis*, поэтому они являются наиболее изученной частью (определено 403 соединения); в листьях, корнях и семенах обнаружено 138 соединений.

В настоящее время *C. officinalis* применяется в составе косметических средств [2], ранозаживляющих средств наружного применения [3, 4], а также используется в качестве противовоспалительного [5] и противомикробного средства при простудных заболеваниях, гепато- и рено-протектора [6, 7]. Современные исследования подтверждают, что экстракт *C. officinalis* улучшает заживление острых ран, обеспечивая более быстрое разрешение фазы воспаления с увеличением образования грануляционной ткани в испытуемых группах, получавших препарат *C. officinalis*, а также ускорение эпителизации и образование более мягкого рубца по сравнению с контрольной группой [8, 9]. Имеются данные об успешном использовании экстракта *C. officinalis* для предотвращения острого постлучевого дер-

матита [10–12], а также для предотвращения метастазирования меланомы в опытах на мышах [13, 14]. Описание свойств *C. officinalis* привлекло к ней наше внимание как к возможному компоненту наружного средства для радиотерапии кожных новообразований, способствующему уменьшению радиационных ожогов и ускоряющему заживление [15, 16]. Исследование антиоксидантных свойств настойки *C. officinalis* позволяло предположить радиопротекторные свойства, однако изучение эффектов настойки *C. officinalis* на опухолевых клеточных культурах в сочетании с γ -излучением в терапевтических дозах показало хороший радиосенсибилизирующий эффект. Также радиосенсибилизирующий эффект подтвердился *in vivo* на перевиваемой меланоме мыши В16 (ФИД = 0.57).

В данном исследовании впервые изучен экстракт *C. officinalis* как потенциальный радиосенсибилизатор для терапии злокачественных опухолей, что, в сочетании с регенеративным и ранозаживляющим потенциалом препарата, может повысить эффективность радиотерапии и снизить риск побочных эффектов – лучевых ожогов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали следующие линии клеток: А375 (меланома человека), НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки человека), НСТ116р53КО (изогенная сублиния с делецией гена *TP53*, кодирующего проапоптотический белок p53), НСТ116р21КО (изогенная сублиния с делецией гена *CDKN1A*, кодирующего проапоптотический белок p21). Источник клеточных линий – АТСС, Манассас, США. Реактивы приобретены в фирме “ПанЭко”, Россия (кроме особо оговоренных случаев). Клетки культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста. Для профилактики микоплазменного заражения использовался препарат Plasmacin (Invitrogen, Франция).

Было исследовано несколько настоек *C. officinalis* от разных производителей. Все настойки произведены стандартизованно, из 100 г растительного сырья на 1 л настойки на 70% этаноле. Между настойками разных произво-

дителей не выявлено значимой разницы в биологических эффектах (данные сравнения настоек не приведены).

Измерение антиоксидантной активности проводили в этилбензоле при 60°C. Эта система требует отсутствия следов воды, поэтому для исследования к 27 мг вещества было добавлено 0.3 мл этанола. Это не привело к полному растворению, но часть вещества перешла в раствор, что позволило провести оценку наличия антиоксидантов в настойке. Максимальный объем спиртовой пробы составил 0.05 мл на общий объем реакционной смеси, равный 4.5 мл (реакционная смесь). Ингибирующее действие содержащихся в настойке *C. officinalis* веществ изучали волюмометрическим методом в модельной реакции окисления этилбензола (333 К), инициированного динитрилом азаизомасляной кислоты, скорость инициирования составляла $W_i = 5 \times 10^{-8}$ моль/л с.

Этилбензол химически чистый перегоняли над металлическим натрием. Реакционную смесь этилбензола с инициатором предварительно термостатировали, затем вводили добавку антиоксиданта (АО). Из кинетической кривой поглощения кислорода определяли величину периода индукции (τ) по методу модельной цепной реакции [17, 18] и начальную скорость поглощения кислорода (W).

При расчете принимали, что на одной молекуле антиоксиданта обрывается один свободный радикал, т.е. это параметр $f[AO]$, где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, показывающий сколько радикалов гибнет на одной молекуле антиоксиданта, $[AO]$ – концентрация антиоксиданта. Из величины периода индукции определяли содержание антиоксиданта в реакционной смеси, используя уравнение:

$$f[AO] = \tau \times W_i,$$

где τ – величина периода индукции, W_i – скорость инициирования свободных радикалов.

Значение константы скорости взаимодействия антиоксиданта с пероксильными радикалами этилбензола k_7 рассчитывали по уравнению

$$W_0 / W - W / W_0 = f k_7 [AO]_0 / (k_6 W_i)^{0.5},$$

где W_0 и W – скорости окисления в отсутствие и присутствии добавок АО соответственно, k_6 – константа скорости квадратичной рекомбинации радикалов RO₂[•], равная 1.9×10^7 моль/л с [19].

Анализ цитотоксичности препарата проводился при помощи стандартного МТТ-теста в 96 луночных планшетах, с контролем в виде серийных разведений 70%-го этанола, соответствующих серийным разведениям исследуемого препарата. Окраску регистрировали с помощью спектрофотометра Multiskan FC (ThermoFisher Scientific, США) при длине волны 540 нм.

Для облучения клетки рассеивали в логарифмической фазе в культуральные флаконы площадью 25 см² и оставляли на сутки для прикрепления и распластывания. Через сутки в часть флаконов вносили *C. officinalis* в выбранных разведениях. Для удобства конечную концентрацию *C. officinalis* в эксперименте определяли через пересчет разведения на сухое вещество, полученное после вакуумного удаления растворителя. Через 24 часа после внесения клетки облучали рентгеновским излучением на установке РУСТ М-1 (Диагностика-М, Россия) с максимальной энергией фотонов в спектре 200 кэВ в дозах 1–4 Гр, с мощностью дозы 0.85 Гр/с.

Выживаемость клеток после облучения, в том числе в присутствии *C. officinalis*, исследовали методом клонотипического анализа. Облученные клетки подсчитывали и методом последовательных разведений рассаживали на чашки Петри диаметром 9 см в количестве 500 клеток на чашку, при объеме среды 20 мл на чашку. Чашки с клетками инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере 14 дней. После этого среду аккуратно убирали, клетки фиксировали ледяным метанолом (5 мл на чашку) и инкубировали в метаноле при температуре +4°C в течение 10 мин. Затем убирали метанол, фиксированные колонии в течение 10 мин окрашивали 0.5%-ным раствором кристаллического фиолетового (5 мл на чашку), трижды промывали водой очищенной для уменьшения фона красителя и подсчитывали окрашенные колонии визуально. Число колоний в контрольных чашках, не подвергавшихся облучению, принимали за 100%, относительно него вычисляли процент колониеобразования в остальных чашках эксперимента.

Фактор изменения дозы (ФИД) — критерий, используемый при количественной оценке эффекта, обусловленного применением радиомодификаторов (протекторов или сенситизаторов) [19]. ФИД вычисляется по формуле $ФИД = D_{оп} / D_k$, где $D_{оп}$ и D_k — дозы, вызывающие одинаковые по величине эффекты в опыте

(то есть с применением радиомодификатора) и в контроле (без применения радиомодификатора). В случае определения ФИД по биологической активности величиной эффекта выбран процент выживших колоний в клонотипическом анализе при различных воздействиях по отношению к контролю без воздействий. Оценку производили при помощи кривых выживания, построенных на основе результатов клонотипического анализа.

Для исследований *in vivo* использовали мышей самок линии С57В1/6, массой тела 18–20 грамм, полученных из питомника “Столбовая”. Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества о состоянии здоровья. Мышей содержали в специальных, просторных клетках по 7 особей при температуре воздуха 20°–23°C и относительной влажности 60–65% в условиях естественного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, стерилизованных в сухожаровом шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный и сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Доступ к корму не ограничивался. Сырую питьевую воду, помещенную в закрытые поилки, мыши получали в неограниченном количестве. Для питья использовали поилки на 250 мл с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре.

В качестве модельной опухоли была взята переносимая меланома мышей В16. Штамм поддерживается на мышах линии С57В1/6 подкожной перевивкой опухолевой взвеси на 16–20 сутки роста опухоли. В эксперименте использовали перевивку путем подкожного введения 0.3 мл взвеси опухолевой ткани 5×10^5 клеток в растворе Хенкса. Переносимость опухоли составляла 100%.

Лечение начинали при уверенной пальпации опухоли на бедре, при диаметре опухоли не менее 5 мм. Для введения использовали препарат *C. officinalis*, высушенный и ресуспендированный в стерильном 0.9%-ном растворе хлорида натрия. Препарат вводили подкожно в холку за полчаса до облучения. Мышей фиксировали в специальных защищенных ячейках, в которых проводили локальное облучение опухоли на рентгеновской установке РУСТ М-1 (Диагностика-М, Россия). Напряжение на лучевой трубке составляло 200 кВ, мощность дозы 0.2 Гр/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее распространенные лекарственные формы *C. officinalis*, не содержащие дополнительных действующих веществ — водно-спиртовая настойка и сухое лекарственное сырье. Для изучения нами выбрана водно-спиртовая настойка, т.к. ее производство стандартизировано, к тому же она не нуждается в дополнительной обработке и стерилизации, в отличие от сухого лекарственного сырья.

При удалении растворителя из настойки с помощью вакуумного насоса было установлено, что во всех исследованных образцах содержится 27 мг/мл “сухого” вещества *C. officinalis*. Из полученного “сухого” вещества растворяется в спирте 15.8 мг/мл, для полного обратного растворения необходимо снова добавлять воду до исходной концентрации.

Добавление раствора *C. officinalis* в этиловом спирте замедляет процесс окисления, т.е. растворимое в спирте вещество содержит антиоксиданты [16]. Из сравнения кинетических кривых (рис. 1) в отсутствие (контроль) и в присутствии *C. officinalis* вычислили величину τ , и далее с использованием уравнения $f[AO] = \tau W_i$ рассчитали количество содержащегося в растворе антиок-

сиданта, которое составило 2.4×10^{-5} ммоль/мл, что в пересчете на исходную настойку при $f = 1$ составляет 8×10^{-5} ммоль/мл. В том случае, если $f = 2$ (что наиболее характерно для антиоксидантов класса фенолов), $[AO]$ составит 4×10^{-5} ммоль/мл.

Из начальной скорости окисления в присутствии добавки настойки *C. officinalis* была проведена оценка величины константы скорости взаимодействия антиоксиданта с пероксильными радикалами этилбензола, которая составила $k_7 = 1.1 \times 10^5$ л/моль с, что сопоставимо с аналогичными константами алкилзамещенных фенолов и флавоноидов (кверцетина и дигидрокверцетина).

Ранее антирадикальную и антиоксидантную активность липидов из цветков *C. officinalis*, выделенных экстракцией хлороформом, изучали на моделях инициированного и автоокисления метилолеата [17]. Концентрацию АО в хлороформном липидном экстракте определили равной 4.35×10^{-5} моль/л, что сравнимо с результатом для водно-спиртовой настойки.

В результате исследования цитотоксичности *C. officinalis* на четырех линиях клеток показано, что опухолевые клетки различного генеза при

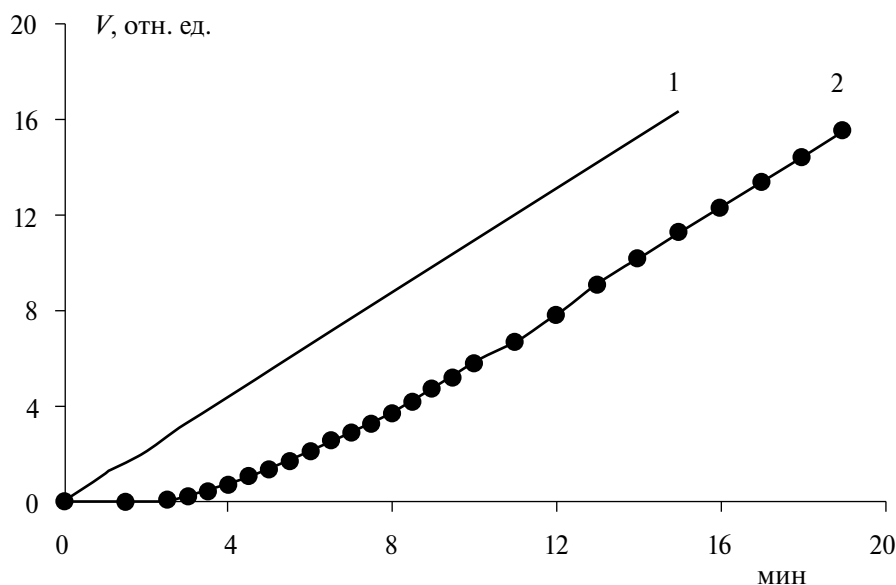


Рис. 1. Кинетические кривые поглощения кислорода в отсутствие (1) и в присутствии спиртовой вытяжки *Calendula officinalis* (2). Этилбензол, 333 К, $W_i = 5 \times 10^{-8}$ моль/л с.

По горизонтали — минуты, по вертикали — V , относительные единицы.

Fig. 1. Kinetic oxygen absorption curves in absence (1) and in presence of *Calendula officinalis* alcoholic extract (2). Ethylbenzene, 333 K, $W_i = 5 \times 10^{-8}$ mol/l s.

X-axis — minutes, y-axis — V , relative units.

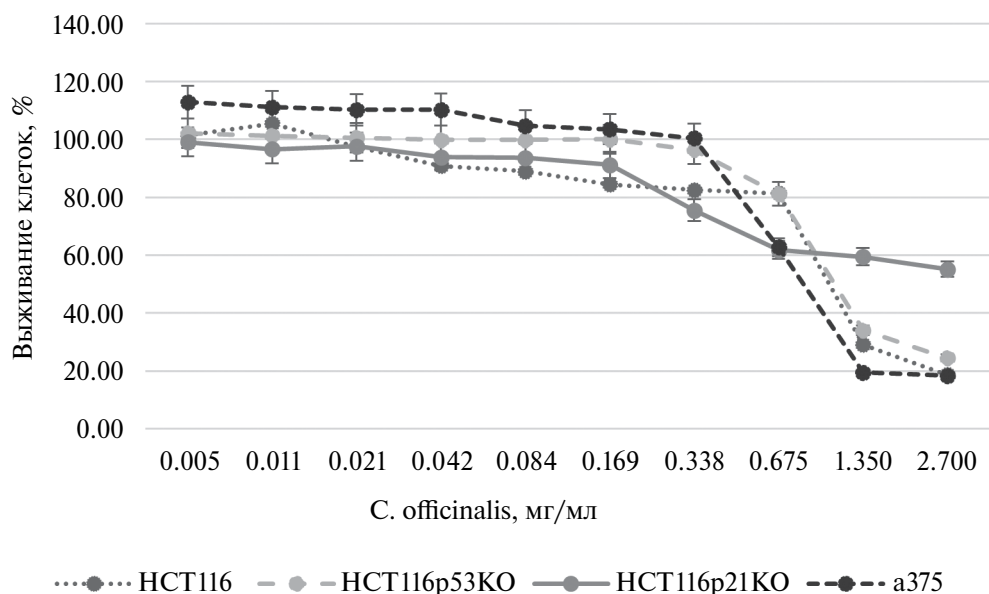


Рис. 2. Определение цитотоксичности *Calendula officinalis* по отношению к четырем линиям опухолевых клеток.

По горизонтали — концентрация *Calendula officinalis* в культуральной среде в пересчете с разведения водно-спиртовой настойки на сухое вещество, мг/мл. По вертикали — выживаемость клеток в % от контроля.

Fig. 2. Determination of *Calendula officinalis* cytotoxicity against four tumor cell lines.

X-axis — concentration of *Calendula officinalis* in the culture medium, calculated with reference to dry substance, mg/ml. Y-axis — cell survival as a percentage of control.

низких концентрациях экстракта в среде отвечают на воздействие практически одинаково (рис. 2). При концентрациях экстракта в среде более 1.2 мг/мл клетки с делецией *CDKN1A* приобретают преимущество в выживании, что может быть связано с отсутствием остановки клеточного цикла в ответ на воздействие. Делеция *TP53* при сохранении функции *CDKN1A* не влияет на выживаемость клеток при воздействии экстракта *C. officinalis*, что указывает на p53-независимый и одновременно p21-зависимый путь гибели клеток.

Для линии НСТ116 был проведен клоногенный анализ после облучения клеток дозой γ -излучения 1 Гр в присутствии двух различных концентраций экстракта *C. officinalis*, начиная с минимального нетоксичного разведения. При этом разница между сенсibiliзирующими эффектами концентраций *C. officinalis* 127 мкг/мл и 264 мкг/мл оказалась незначительной (табл. 1), что может указывать на механизм насыщения либо пороговый эффект, при котором после преодоления порога значительное увеличение воздействия незначительно влияет на результат. Для исследования радиомодифицирующих

свойств было выбрано разведение *C. officinalis*, не снижающее выживаемость клеток в клоногенном анализе при отсутствии облучения — 127 мкг/мл в пересчете на сухое вещество.

Для выбранной концентрации был проведен клоногенный анализ на линии НСТ116 при сочетанном воздействии разных доз радиации и 127 мкг/мл *C. officinalis* (рис. 3). Для γ -облучения в дозе 1 Гр выживаемость колоний через 2 недели составила 96%, для γ -облучения в дозе 1 Гр в присутствии *C. officinalis* — 49%. Для γ -облучения в дозе 2 Гр выживаемость колоний составила 37%, в присутствии *C. officinalis* — 2%. Таким образом, при более высокой дозе облучения количество колоний снизилось в 18 раз. ФИД для линии клеток НСТ116 составило 0.57 (что соответствует уменьшению необходимой дозы в 1.75 раз).

Также клоногенный анализ был проведен для линий НСТ116 с делециями генов, кодирующих ключевые белки, запускающие программируемую клеточную гибель — p53 (рис. 4, 5) и p21 (рис. 6).

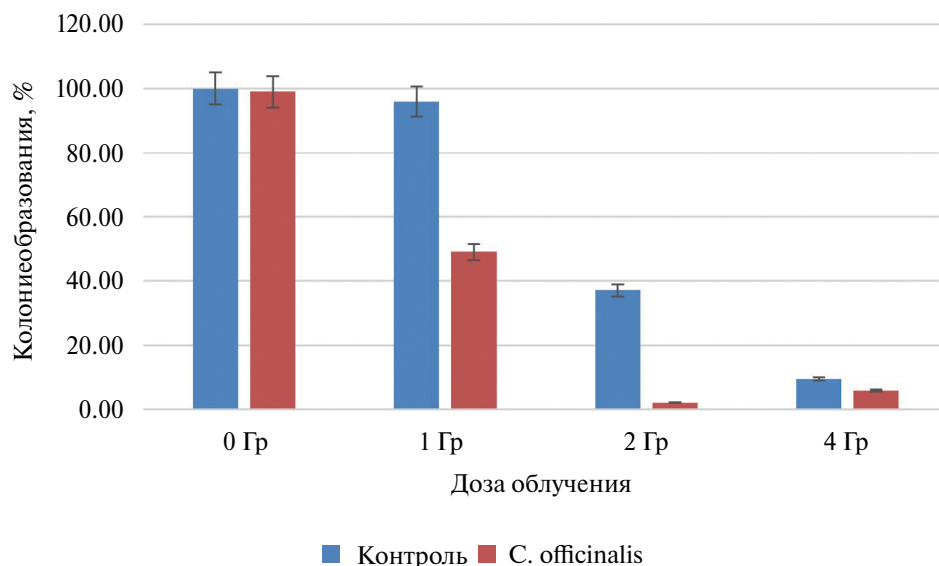
p53 — один из основных белков апоптотического каскада. Он активируется в ответ на

Таблица 1. Определение радиосенсибилизирующей эффективности экстракта *Calendula officinalis* в различных концентрациях**Table 1.** Determination of radiosensitizing effectiveness of *Calendula officinalis* extract in different concentrations

Концентрация вещества Substance concentration	Дозы облучения Radiation doses	
	Без облучения No irradiation	1 Гр, 0,85 Гр/мин 1 Gy, 0.85 Gy/min
Без препарата Without substance	100 ± 2	96 ± 5
<i>C. officinalis</i> 127 мкг/мл <i>C. officinalis</i> 127 µg/ml	99 ± 2	49 ± 6
<i>C. officinalis</i> 264 мкг/мл <i>C. officinalis</i> 264 µg/ml	92 ± 2	47 ± 6

Примечание. Клоногенный анализ линии НСТ116 при воздействии облучения в дозе 1 Гр с предварительной обработкой в течение 24 часов экстрактом *Calendula officinalis* в двух концентрациях. Показано процентное соотношение выживших колоний к количеству колоний в контроле без воздействий (100%).

Notes. Clonogenic analysis of the HCT116 line when exposed to radiation dose 1 Gy and pretreated for 24 hours with two concentrations of *Calendula officinalis*. The table represents the percentage of surviving colonies to the number of colonies in the untreated control group (100%).

**Рис. 3.** Клоногенный анализ линии НСТ116 при воздействии облучения в дозе 1, 2 и 4 Гр с предварительной обработкой в течение 24 ч 127 мкг/мл *Calendula officinalis*. Количество колоний в контроле без воздействий взято за 100%.

По горизонтали – доза облучения, по вертикали – колониобразование, %.

Синий – контроль; красный – с предварительной обработкой *C. officinalis*.

Fig. 3. Clonogenic assay of HCT116 line when exposed to radiation doses of 1, 2 and 4 Gy with pre-treatment for 24 hours with 127 µg/ml *Calendula officinalis*. The number of colonies in untreated control sample was set as 100%.

X-axis – total radiation dose, y-axis – clonogenicity, %.

Blue – control; red – with *C. officinalis* pretreatment.

повреждение ДНК и приводит к остановке пролиферации клеток или апоптозу. То есть, у поврежденных клеток появляется возможность репарировать поврежденную ДНК, либо они удаляются из популяции. Установлено, что p53 необходим для апоптоза при повреждении

клетки ионизирующим излучением, однако при апоптозе, вызванном глюкокортикоидами, и при старении он не требуется. p53 выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, поэтому в клинической практике его делеция часто связана с плохими прогнозами.

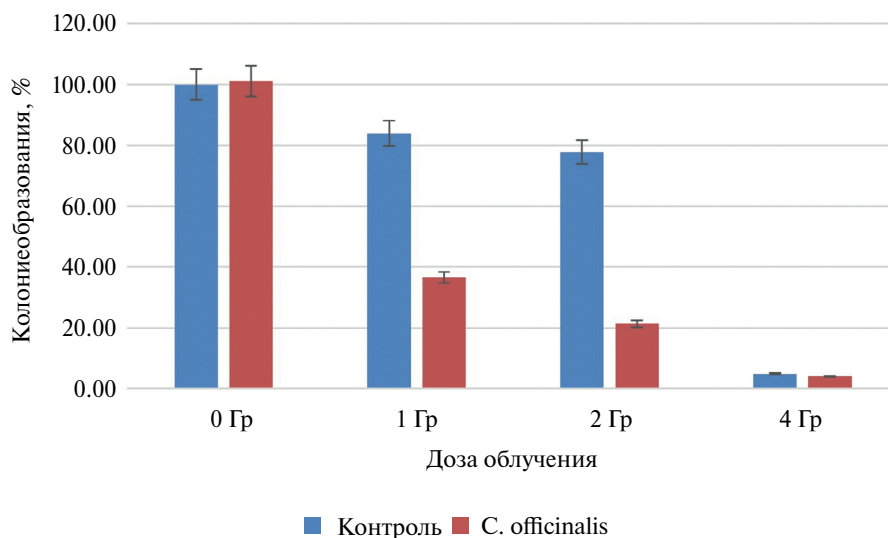


Рис. 4. Клоногенный анализ линии НСТ116р53КО при воздействии облучения в дозе 1, 2 и 4 Гр с предварительной обработкой в течение 24 ч 127 мкг/мл *Calendula officinalis*. Количество колоний в контроле без воздействий взято за 100%.

По горизонтали – доза облучения, по вертикали – колониеобразование, %.

Синий – контроль; красный – с предварительной обработкой *C. officinalis*.

Fig. 4. Clonogenic assay of HCT116p53KO line exposed to radiation doses of 1, 2 and 4 Gy with pre-treatment for 24 hours with 127 µg/ml *Calendula officinalis*. The number of colonies in untreated control sample was set as 100%.

X-axis – total radiation dose, y-axis – clonogenicity, %.

Blue – control; red – with *C. officinalis* pretreatment.

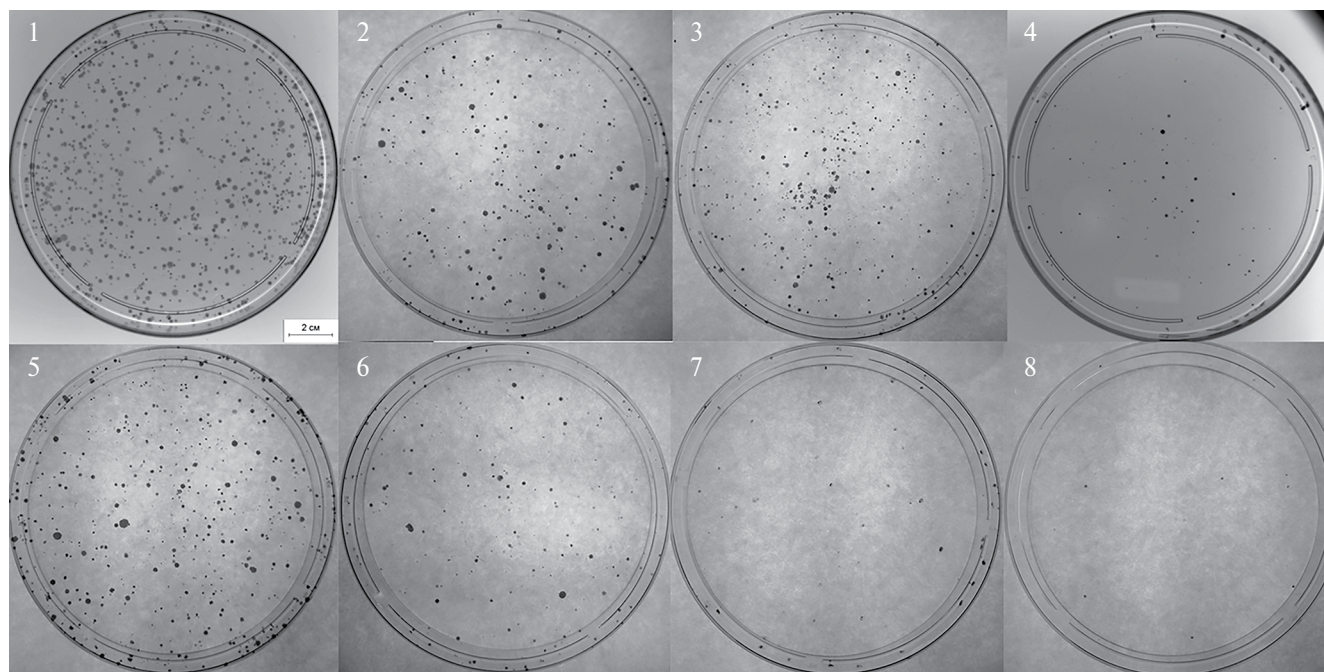


Рис. 5. Фото колоний линии НСТ116р53КО. 1 – образец без воздействий, 2 – облучение в дозе 1 Гр, 3 – 2 Гр, 4 – 4 Гр, 5 – с предварительной обработкой в течение 24 ч 127 мкг/мл *Calendula officinalis*, 6 – 127 мкг/мл *Calendula officinalis* + облучение в дозе 1 Гр, 7 – 127 мкг/мл *Calendula officinalis* + облучение в дозе 2 Гр, 8 – 127 мкг/мл *Calendula officinalis* + облучение в дозе 4 Гр.

Fig. 5. Photos of colonies of HCT116p53KO cell line. 1 – a sample without exposure, 2 – irradiation at a dose of 1 Gy, 3 – 2 Gy, 4 – 4 Gy, 5 – with pretreatment for 24 hours 127 µg/ml *Calendula officinalis*, 6 – 127 µg/ml *Calendula officinalis* + irradiation at a dose of 1 Gy, 7 – 127 µg/ml *Calendula officinalis* + irradiation at a dose of 2 Gy, 8 – 127 µg/ml *Calendula officinalis* + irradiation at a dose of 4 Gy.

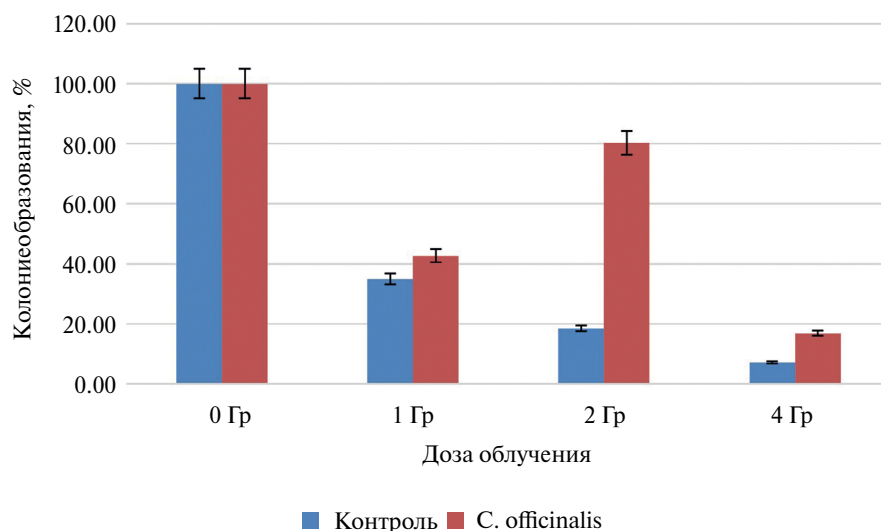


Рис. 6. Клоногенный анализ линии HCT116p21KO при воздействии облучения в дозе 1, 2 и 4 Гр с предварительной обработкой в течение 24 ч 127 мкг/мл *Calendula officinalis*. Количество колоний в контроле без воздействий взято за 100%.

По горизонтали — доза облучения, по вертикали — колониобразование, %.

Синий — контроль; красный — с предварительной обработкой *C. officinalis*.

Fig. 6. Clonogenic assay of HCT116p21KO line exposed to radiation doses of 1, 2, and 4 Gy with pretreatment for 24 hours with 127 µg/ml *Calendula officinalis*. The number of colonies in untreated control sample was set as 100%.

X-axis — total radiation dose, y-axis — clonogenicity, %.

Blue — control; red — with *C. officinalis* pretreatment.

При этом мутации *TP53* (гена, кодирующего белок p53) в зависимости от вида опухоли могут встречаться в диапазоне от 5 до 90% случаев [20]. Преодоление устойчивости опухолей к терапии, вызванной нефункционирующим p53, является одной из важных задач поиска лекарственных средств.

Для культуры с делецией *TP53* (рис. 4, 5) ФИД составил 0.32 (что соответствует уменьшению необходимой дозы в 3,1 раза). Относительно культуры с p53 дикого типа, чувствительность культуры с делецией *TP53* выше в 1,7 раза, что делает *C. officinalis* перспективным компонентом радиотерапии опухолей независимо от их p53-статуса.

p21 — ингибитор клеточного цикла, реагирующий на повреждение ДНК и останавливающий клеточный цикл, как в G1, так и в G2 фазах, чтобы клетка могла репарировать ДНК. Активация p21 является важным ответом клетки на радиационные повреждения, при этом данные о функционале p21 противоречивы и сильно зависят от типа клеток [21], субклеточной локализации p21, его посттрансляционных изменений. Например, накопление p21 в цитоплазме опухолевых клеток способствует метастазированию и ухуд-

шает клинический прогноз. p21 является одним из основных медиаторов остановки клеточного цикла, вызванной активацией p53, однако активация p21 в ответ на γ-облучение может происходить как по p53-зависимому, так и по p53-независимому пути — например, через NF-κB. Также p21 участвует в клеточном старении. В нашем исследовании ФИД по отношению к культуре опухолевых клеток с делецией *CDKN1A* (рис. 6) составляет 4 для дозы 1 Гр и 2 для дозы 4 Гр, что указывает на p21 как на ключевой фактор гибели клеток в случае сочетанного действия γ-излучения и настоек *C. officinalis*. Клетки карциномы толстой кишки с делецией *CDKN1A* показали большую чувствительность к γ-излучению, чем клетки дикого типа и клетки с делецией *TP53*, однако настойка *C. officinalis* именно по отношению к этой линии клеток проявила себя как радиопротектор. Вероятно, *C. officinalis* активизирует гибель клеток после облучения через p21-зависимый путь, а при неактивном p21 на первый план выходят антиоксидантные свойства настойки. Конкретный путь воздействия *C. officinalis* на раковые клетки, как самого по себе, так и в сочетании с γ-излучением, требует дальнейшего уточнения.

В эксперименте *in vivo* *C. officinalis* вводили в дозе 20 мг/кг подкожно в холку с последующим облучением. В предварительных экспериментах было использовано как подкожное, так и интратуморальное введение препарата (данные не приведены). Однако поскольку интратуморальное введение приводит к нарушению целостности опухоли и менее перспективно с точки зрения терапии, остановились на подкожном введении препарата.

Для фракционирования была использована локально подводимая суммарная доза γ -облучения 20 Гр с фракционированием по 4 Гр ежедневно.

Для этого эксперимента использовали 4 группы по 12 мышей; контрольная группа с интактным ростом опухоли, группа с препаратом без облучения, группа с облучением без препарата, группа с комбинированным воздействием препарата и облучения.

Эксперимент был начат, когда опухоли достигли среднего диаметра 0.8 см и устойчиво определялись пальпированием. Введение препарата проводили перед каждым облучением, меж-

ду введением и облучением проходило не менее получаса.

Объем опухоли измеряли ежедневно и определяли торможение роста опухоли (ТРО) в процентах от объема опухоли контрольной группы. По итогам эксперимента определена средняя продолжительность жизни (СПЖ).

СПЖ для контрольной группы составила 23 дня, для группы с облучением 21 день, для группы с препаратом 21 день, с облучением и препаратом 30 дней. СПЖ для группы с облучением и препаратом статистически значимо (на уровне 0.05) отличалась от всех остальных, все остальные группы по СПЖ между собой статистически значимо (на том же уровне 0.05) не различались.

Максимальное ТРО наблюдалось через 5 дней после последнего облучения и составляло 57% в эксперименте с препаратом и 98% — для комбинации препарата и облучения (рис. 7). Мыши, у которых наблюдалась полная видимая редукция опухоли (4 мыши из 12 в группе), на 22 день после облучения были умерщвлены и препарированы. В легких и на месте прививки при препарировании и осмотре видимых очагов меланомы обнаружено не было (рис. 8).

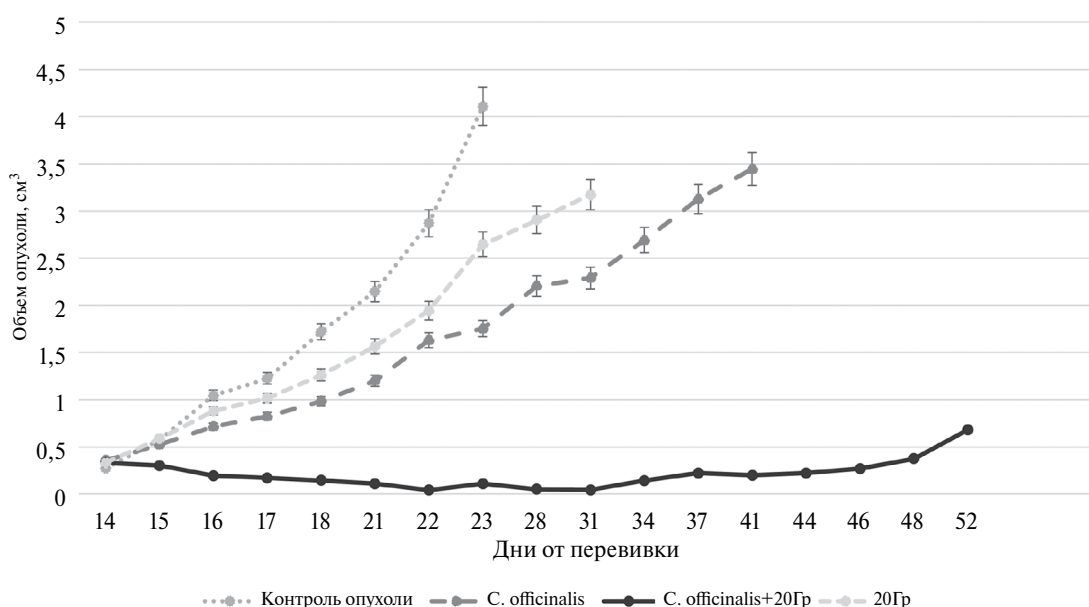


Рис. 7. Торможение роста перевиваемой меланомы мыши В16 при различных воздействиях.

По горизонтали — дни от перевивки, по вертикали — объем опухоли, см³.

Слева направо: первая строка — контроль; вторая — календула лекарственная; третья — *C. officinalis* + 20 Гр; далее — 20 Гр.

Fig. 7. Inhibition of the growth of transplantable murine melanoma B16 under different conditions.

X-axis — days after grafting, y-axis — tumor volume, cm³.

Left to right: first line — control; second — *Calendula officinalis*; third — *C. officinalis* + 20 Gy; forth — 20 Gy.

ВЫВОДЫ

Впервые изучен водно-спиртовой настойка календулы лекарственной *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) как потенциальный радиосенсибилизатор для терапии злокачественных опухолей.

Показано:

1. *C. officinalis* является радиосенсибилизатором.

2. Водно-спиртовая настойка *C. officinalis* повышает эффективность облучения по отношению к линии клеток карциномы толстой кишки человека на 35–47%, что позволит снизить терапевтическую дозу в 1.7 раза.

3. Отсутствие значимой разницы в цитотоксичности по отношению к НСТ116р53КО, по сравнению с НСТ116 дикого типа, указывает на р53-независимый путь клеточной гибели при действии *C. officinalis*. Преимущества в выживании у клеток НСТ116р21–/– при сохранном р53 указывают на р21-зависимый путь клеточной гибели. В присутствии *C. officinalis* значительно увеличивается ответ НСТ116р53КО на радиационные повреждения, и снижается ответ НСТ116р21–/–, что также указывает на р21 как на ключевой элемент, решающий судьбу клетки. Радиосенсибилизационные свойства *C. officinalis* и механизмы клеточной гибели, задействованные в этом процессе, требуют дальнейшего изучения.

C. officinalis хорошо показала себя по отношению к линии опухолевых клеток с деактивацией р53, являющейся одним из факторов устой-

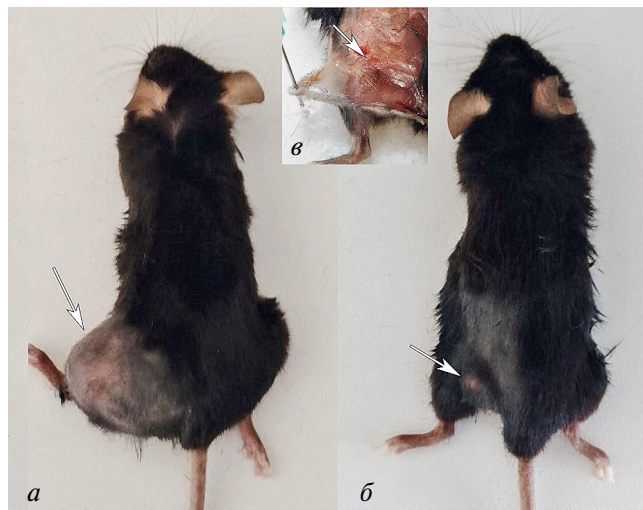


Рис. 8. А – контрольная опухоль на 18 день после перевивки, Б – через 31 день после перевивки, 22 дня после воздействия 20 Гр γ -излучения в сочетании с *Calendula officinalis*, В – место прививки опухоли через 22 дня после облучения в сочетании с *Calendula officinalis*.

Fig. 8. А – control tumor on day 18 after grafting, Б – 31 days after grafting, 22 days after exposure to 20 Gy of γ -radiation in combination with *Calendula officinalis* pre-treatment, В – site of tumor inoculation 22 days after irradiation in combination with *Calendula officinalis* pre-treatment.

чивости опухолей к терапии, а также на модели меланомы мышей *in vivo*. Поскольку *C. officinalis* является ранозаживляющим средством и средством, предупреждающим лучевые дерматиты, может быть целесообразно сочетать предобработку препаратом *C. officinalis* со стандартными схемами лечения опухолей при помощи радиотерапии, особенно в случае опухолей поверхностного расположения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. 2022. Marigold metabolites: Diversity and separation methods of *Calendula* genus phytochemicals from 1891 to 2022. – *Molecules*. 27(23): 8626. <https://doi.org/10.3390/molecules27238626>
2. Jadoon S., Karim S., Hassham M., Asad H.B., Akram M.R., Khan A.K., et al. 2015. Antiaging potential of phytoextract loaded-pharmaceutical creams for human skin cell longevity. – *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID709628. <https://doi.org/10.1155/2015/709628>
3. Nicolaus C., Junghanns S., Hartmann A., Murillo R., Ganzera M., Merfort I. 2017. *In vitro* studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. – *J. Ethnopharmacol.* 196: 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.006>
4. Dinda M., Mazumdar S., Das S., Ganguly D., Dasgupta U.B., Dutta A., et al. 2016. The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates *in vitro* and *in vivo* proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. – *Phytother. Res.* 30(10): 1696–1707. <https://doi.org/10.1002/ptr.5678>
5. Preethi K.C., Kuttan G., Kuttan R. 2009. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn and its possible mechanism of action. – *Indian J. Exp. Biol.* 47(2): 113–120. <https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/3072>

6. Preethi K.C., Kuttan R. 2009. Hepato and reno protective action of *Calendula officinalis* L. flower extract. — Indian J. Exp. Biol. 47(3): 163–168.
<https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/3293>
7. Barajas-Farias L.M., Pérez-Carreón J.I., Arce-Popoca E., Fattel-Fazenda S., Alemán-Lazarini L., Hernández-García S., et al. 2006. A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. — Planta Med. 72(3): 217–21.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-916196>
8. Giostri G.S., Novak E.M., Marcelo Buzzi, Guarita-Souza L.C. 2022. Treatment of acute wounds in hand with *Calendula officinalis* L.: A randomized trial. — Tissue Barriers. 10(3): 1994822.
<https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1994822>
9. Chandran P.K., Kuttan R. 2008. Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. — Clin. Biochem. Nutr. 43(2): 58–64.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.2008043>
10. Givol O., Kornhaber R., Visentin D., Cleary M., Haik J., Harats M. 2019. A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. — Wound Repair Regen. 27(5): 548–561.
<https://doi.org/10.1111/wrr.12737>
11. Pommier P., Gomez F., Sunyach M.P., D'Hombres A., Carrie C., Montbarbon X. 2004. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. — J. Clin. Oncol. 22(8): 1447–1453.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2004.07.063>
12. Simões F.V., Santos V.O., da Silva R.N., da Silva R.C. 2020. Effectiveness of skin protectors and *Calendula officinalis* for prevention and treatment of radiodermatitis: an integrative review. — Rev. Bras. Enferm. 73(suppl 5): e20190815.
<https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0815>
13. Jiménez-Medina E., García-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A., Garrido F. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. — BMC Cancer. 6: 119.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-119>
14. Preethi K.C., Siveen K.S., Kuttan R., Kuttan G. 2010. Inhibition of metastasis of B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice by an extract of *Calendula officinalis* L. flowers. — Asian Pac. J. Cancer Prev. 11(6): 1773–1779.
https://journal.waocp.org/article_25449.html
15. Hormozi M., Gholami M., Babaniazi A., Gharravi A.M. 2019. *Calendula officinalis* stimulate proliferation of mouse embryonic fibroblasts via expression of growth factors TGFβ1 and bFGF. — Inflamm. Regen. 39: 7.
<https://doi.org/10.1186/s41232-019-0097-x>
16. Cordova C.A.S., Siqueira I.R., Netto C.A., Yunes R.A., Volpato A.M., Filho V.C., et al. 2002. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. — Redox Rep. 7(2): 95–102.
<https://doi.org/10.1179/135100002125000325>
17. Шишкина Л.Н., Мазалецкая Л.И., Смирнова А.Н., Швыдкий В.О. 2021. Ингибирующая эффективность липидного компонента растительных объектов в зависимости от полярности элюента. — Биофизика. 66(3): 482–488.
<https://doi.org/10.31857/S000630292103008X>
18. Цепалов В.Ф., Харитонов А.А., Гладышев Г.П., Эммануэль Н.М. 1977. Определение констант скорости и коэффициентов ингибирования фенолов—антиоксидантов с помощью модельной цепной реакции. — Кинетика и катализ. 18(5): 1261–1267.
19. Цепалов В.Ф., Шляпинтох В.Я. 1962. Константы скорости элементарных реакций процесса окисления этилбензола молекулярным кислородом. — Кинетика и катализ. 6(3): 870–876.
20. Donehower L.A., Soussi T., Korkut A., Liu Y., Schultz A., Cardenas M., et al. 2019. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. — Cell Rep. 28(5): 1370–1384.E5.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.001>
21. Kuang Y., Kang J., Li H., Liu B., Zhao X., Li L., et al. 2021. Multiple functions of p21 in cancer radiotherapy. — J. Cancer Res. Clin. Oncol. 147(4): 987–1006.
<https://doi.org/10.1007/s00432-021-03529-2>

Calendula Officinalis* (Asteraceae) As A Radiosensitizer In Radiotherapy Of Tumors*S. D. Koldman^{1, *}, V. A. Koldman², A. V. Belousov³, L. I. Mazaletskaya⁴**^{1,2}*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine
of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia*³*Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia*⁴*Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*e-mail: epistularum@yandex.ru

Abstract — The effect of aqueous-alcoholic tincture of *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) on tumor cells of different species and tissue origin was studied. Its potential as a radiosensitizer in combination with γ -radiation was determined. It has been established that *C. officinalis* tincture causes the death of tumor cells regardless of their p53 and p21 status. *C. officinalis* tincture has antioxidant properties, but for cells with active p21 it exhibits radiosensitizing rather than radioprotective properties. For cells lacking p21, *C. officinalis* tincture is a radioprotector, so the cell death is p21 mediated. A study of the radiosensitizing properties of *C. officinalis* was carried out on a mouse melanoma model *in vivo*. In combination with γ -radiation, it led to a significant inhibition of tumor growth (by 47%), as compared to irradiation only. The significant radiosensitizing effect and capability of overcoming the tumor cells resistance induced by p53 inactivation make *C. officinalis* tincture promising as an add-on to radiotherapy, allowing to reduce the effective radiation dose 1.7 times.

Keywords: radiotherapy, melanoma, plant radiosensitizers, *Calendula officinalis*

REFERENCES

1. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. 2022. Marigold metabolites: Diversity and separation methods of *Calendula* genus phytochemicals from 1891 to 2022. — *Molecules*. 27(23): 8626.
<https://doi.org/10.3390/molecules27238626>
2. Jadoon S., Karim S., Hassham M., Asad H.B., Akram M.R., Khan A.K., Malik A., Chen C., Murtaza G. 2015. Anti-aging potential of phytoextract loaded-pharmaceutical creams for human skin cell longevity. — *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID709628.
<https://doi.org/10.1155/2015/709628>
3. Nicolaus C., Junghanns S., Hartmann A., Murillo R., Ganzera M., Merfort I. 2017. *In vitro* studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. — *J. Ethnopharmacol.* 196: 94–103.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.006>
4. Dinda M., Mazumdar S., Das S., Ganguly D., Dasgupta U.B., Dutta A., et al. 2016. The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates *in vitro* and *in vivo* proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. — *Phytother. Res.* 30(10): 1696–1707.
<https://doi.org/10.1002/ptr.5678>
5. Preethi K.C., Kuttan G., Kuttan R. 2009. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn and its possible mechanism of action. — *Indian J. Exp. Biol.* 47(2): 113–120.
<https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/3072>
6. Preethi K.C., Kuttan R. 2009. Hepato and reno protective action of *Calendula officinalis* L. flower extract. — *Indian J. Exp. Biol.* 47(3): 163–168.
<https://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/3293>
7. Barajas-Farias L.M., Pérez-Carreón J.I., Arce-Popoca E., Fattel-Fazenda S., Alemán-Lazarini L., Hernández-García S., et al. 2006. A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. — *Planta Med.* 72(3): 217–21.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-916196>
8. Giotri G.S., Novak E.M., Marcelo Buzzi, Guarita-Souza L.C. 2022. Treatment of acute wounds in hand with *Calendula officinalis* L.: A randomized trial. — *Tissue Barriers.* 10(3): 1994822.
<https://doi.org/10.1080/21688370.2021.1994822>
9. Chandran P.K., Kuttan R. 2008. Effect of *Calendula officinalis* flower extract on acute phase proteins, antioxidant defense mechanism and granuloma formation during thermal burns. — *Clin. Biochem. Nutr.* 43(2): 58–64.
<https://doi.org/10.3164/jcbrn.2008043>

10. Givol O., Kornhaber R., Visentin D., Cleary M., Haik J., Harats M. 2019. A systematic review of *Calendula officinalis* extract for wound healing. – Wound Repair Regen. 27(5): 548–561.
<https://doi.org/10.1111/wrr.12737>
11. Pommier P., Gomez F., Sunyach M.P., D'Hombres A., Carrie C., Montbarbon X. 2004. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. – J. Clin. Oncol. 22(8): 1447–1453.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2004.07.063>
12. Simões F.V., Santos V.O., da Silva R.N., da Silva R.C. 2020. Effectiveness of skin protectors and *Calendula officinalis* for prevention and treatment of radiodermatitis: an integrative review. – Rev. Bras. Enferm. 73(suppl 5): e20190815.
<https://doi.org/10.1590/0034-7167-2019-0815>
13. Jiménez-Medina E., García-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A., Garrido F. 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. – BMC Cancer. 6: 119.
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-119>
14. Preethi K.C., Siveen K.S., Kuttan R., Kuttan G. 2010. Inhibition of metastasis of B16F-10 melanoma cells in C57BL/6 mice by an extract of *Calendula officinalis* L. flowers. – Asian Pac. J. Cancer Prev. 11(6): 1773–1779.
https://journal.waocp.org/article_25449.html
15. Hormozi M., Gholami M., Babaniazi A., Gharravi A.M. 2019. *Calendula officinalis* stimulate proliferation of mouse embryonic fibroblasts via expression of growth factors TGFβ1 and bFGF. – Inflamm. Regen. 39: 7.
<https://doi.org/10.1186/s41232-019-0097-x>
16. Cordova C.A.S., Siqueira I.R., Netto C.A., Yunes R.A., Volpato A.M., Filho V.C., et al. 2002. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. – Redox Rep. 7(2): 95–102.
<https://doi.org/10.1179/135100002125000325>
17. Shishkina L.N., Mazaletskaya L.I., Smirnova A.N., Shvydkiy V.O. 2021. Inhibitory efficiency of the lipid component of plant objects depending on the polarity of the eluent. – Biophysics. 66(3): 409–414.
<https://doi.org/10.1134/S0006350921030179>
18. Tsepalov V.F., Kharitonova A.A., Gladyshev G.P., Emanuel, N.M. 1977. Determination of rate constants and inhibition coefficients of phenol antioxidants with aid of model chain reactions. – Kinet. Catal. 18(5): 1034–1039.
19. Tsepalov V.F., Shlyapintokh V. Ya. 1962. [Rate constants for elementary reactions in the oxidation of ethylbenzene with molecular oxygen]. – Kinetika i Kataliz. 3(6): 870–876. (In Russian)
20. Donehower L.A., Soussi T., Korkut A., Liu Y., Schultz A., Cardenas M., et al. 2019. Integrated Analysis of TP53 Gene and Pathway Alterations in The Cancer Genome Atlas. – Cell Rep. 28(5): 1370–1384.E5.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.001>
21. Kuang Y., Kang J., Li H., Liu B., Zhao X., Li L., et al. 2021. Multiple functions of p21 in cancer radiotherapy. – J. Cancer Res. Clin. Oncol. 147(4): 987–1006.
<https://doi.org/10.1007/s00432-021-03529-2>