

## ЦИТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФИТОЭСТРОГЕНА ГЕНИСТЕИНА НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

© 2015 г. Т.А. Федотчева\* \*\*, К.Е. Широких\*, А.И. Матюшин\*,  
В.М. Ржезников\*\*\*, В.Ю. Ковтун\*\*\*\*, Н.Л. Шимановский\*

\*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,  
117997, Москва, ул. Островитянова, 1;

\*\*Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений,  
117216, Москва, ул. Грина, 7;

\*\*\*Институт экспериментальной эндокринологии, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1;

\*\*\*\*Научно-производственный центр «Фармзащита»,  
141400, Московская область, Химки, Вашутинское шоссе, 11

E-mail: tfedotcheva@mail.ru

Поступила в редакцию 27.08.15 г.

Изучено влияние синтетического изофлавоноида генистеина на опухолевые клетки HeLa, в которых представлены рецепторы эстрогена типа альфа и отсутствуют рецепторы эстрогена типа бета, с целью установления его цитотоксического либо цитопротекторного действия. Показано, что концентрация, при которой достигается полумаксимальное ингибирование жизнеспособности клеток HeLa ( $IC_{50} = 0,2$  мМ), в десятки раз выше, чем у препаратов сравнения с цитотоксическим действием тамоксифена и цисплатина. В микромолярных концентрациях (0,1–10 мкМ) генистеин снижал цитотоксическое действие тамоксифена и цисплатина. Обнаружено снижение экспрессии мРНК Вах и увеличение экспрессии мРНК Bcl-2 при инкубации клеток с генистеином, что также свидетельствует о его цитопротекторном, анти-апоптотическом действии. Генистеин даже в высоких концентрациях не влиял на мембранный потенциал и кальциевую емкость изолированных митохондрий, не активируя открытие  $Ca^{2+}$ -индуцируемой митохондриальной поры. Таким образом, полученные данные показывают протекторное действие изофлавоноида генистеина на клетки.

*Ключевые слова:* опухолевые клетки HeLa, изофлавоноиды, фитоэстрогены, генистеин, апоптоз.

Генистеин является распространенным фитоэстрогеном семейства изофлавоноидов, который содержится во многих соевых и бобовых продуктах. При высоком содержании генистеина в рационе питания он может действовать как агонист/антагонист эстрогенов, в зависимости от чувствительности клеток и тканей, которая зависит от наличия и количественного соотношения рецепторов эстрогенов типа альфа и бета [1].

Соответственно, в зависимости от соотношения рецепторов эстрогенов, генистеин может оказывать как цитотоксическое, так и цитопротекторное, антиоксидантное действие на различные гормонозависимые опухоли. Часть публикаций свидетельствует о цитотоксических эффектах генистеина, другая – о его защитных, цитопротекторных свойствах.

Так, эксперименты на клеточных культурах и на животных указывают на выраженное противоопухолевое действие генистеина и его аналогов, а также некоторых других флавоноидов в отношении гормонозависимых опухолей простаты, шейки матки, яичников, молочной железы [2–6]. Механизмы цитотоксического действия генистеина связаны с торможением клеточного цикла в фазе G2/M, ингибированием миграции опухолевых клеток и инвазии, ингибированием ангиогенеза в опухоли, а также индукцией апоптоза и аутофагоцитоза [7].

С другой стороны, было показано, что генистеин обладает химиопрофилактическим, антиоксидантным действием по отношению к широкому спектру опухолевых клеток [8]. Цитопротекторное, химиопрофилактическое действие генистеина связано с его способностью снижать уровень оксидантов, ингибировать перекисное окисление липидов, восстанавливать АТФазную активность [9]. Влияние генистеина

Сокращения: ERalpha – рецепторы эстрогена типа альфа, ERbeta – рецепторы эстрогена типа бета.

на индукцию митохондриальной поры, ключевую стадию в индукции митохондриального пути апоптоза, ранее не исследовалось. Также недостаточно изучено действие генистеина в сочетании с другими препаратами, обладающими цитотоксическим действием. Описаны разнонаправленные эффекты при его использовании в комбинации с цитостатиками. Было показано, что в присутствии генистеина цитотоксическое действие некоторых противоопухолевых соединений усиливается [10], в то время как цитотоксичность, связанная с окислительным стрессом, снижается [11].

В данной работе исследовано влияние синтетического генистеина (4',5,7-тригидроксиизофлавона) на опухолевые клетки HeLa и изолированные митохондрии. Исследовано влияние генистеина на экспрессию мРНК митохондриальных белков Bax и Bcl-2, участвующих в регуляции митохондриального апоптотического пути гибели клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследуемые соединения – синтетический высокоочищенный генистеин и антиэстрогеницистостатик цитестрола ацетат, предоставленные Институтом экспериментальной эндокринологии (Москва, Россия), цисплатин (Тева, Израиль), тамоксифен (Sigma, США) растворяли в диметилсульфоксиде до конечных концентраций  $10^{-2}$ – $10^{-9}$  М. Клеточная культура HeLa (эпителиоидный рак шейки матки человека) и культура фибробластов кожи крыс получены из ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Культивирование клеток осуществляли в стерильных условиях с использованием ламинарбокса ЛБ-В (Россия). Клетки инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в условиях 5%  $\text{CO}_2$ . При культивировании клеток использовали стандартную среду DMEM с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамин в концентрации 100 мкг/мл и антибиотиков гентамицина сульфата и стрептомицина сульфата в концентрации 40 мкг/мл. Клетки выращивали в культуральных флаконах с площадью поверхности 25  $\text{cm}^2$ , после достижения монослоя проводили трипсинизацию и вносили по 200 мкл в лунки плоскодонного планшета COSTAR. Вносили растворы соединений в среде DMEM до конечных концентраций  $10^{-9}$ – $10^{-2}$  М и проводили инкубацию в течение двух суток. По истечении этого времени оценивали жизнеспособность культуры при помощи стандартного МТТ-теста [12]. Определение оптической плотности образцов проводили при длине волны 530 нм на планшетном фотометре-анализаторе иммуноферментных реакций «УНИПЛАН»

АИФР-01 (Россия). Отношение средней оптической плотности после инкубации с генистеином и цитостатиками к средней оптической плотности в контроле принималось как доля выживших клеток.

Экспрессию мРНК Bax, Bcl-2 в клетках оценивали методом ПЦР в реальном времени. Выделение мРНК и получение кДНК проводили с помощью наборов «Рибо-преп» и «Реверта-L» («AmpliSens», Россия) соответственно. Для полимеразной цепной реакции в реальном времени использовали «Реакционную смесь 2,5x для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I» («Синтол», Россия) и соответствующие праймеры («Синтол», Россия). Амплификацию осуществляли на приборе iCycleriQ5 Real-time PCR («BioRad», США). В качестве гена сравнения использовали ген GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназы («Синтол», Россия). Для оценки числа копий мРНК применяли  $\Delta\text{Ct}$ -метод по формуле  $1/2^{-\Delta\text{Ct}}$  (для выявления различий) и  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (для определения кратности разницы), где  $\text{Ct}$  – пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции,  $\Delta\text{Ct}$  – разница между пороговым циклом исследуемого гена и геном сравнения (GAPDH),  $\Delta\Delta\text{Ct}$  – сравнение значений  $\Delta\text{Ct}$  контрольного и опытного образцов.

Митохондрии получали из печени взрослых крыс-самцов линии Wistar стандартным методом дифференциального центрифугирования [13]. Печень гомогенизировали в ледяном 10 мМ HEPES-трис-буфере (pH 7,4), содержащем 220 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 1 мМ ЭГТА. Гомогенат центрифугировали при 600  $g$  в течение 7 мин и  $4^{\circ}\text{C}$ , затем супернатант центрифугировали при 9000  $g$  в течение 10 мин для получения осадка с митохондриями. Митохондрии дважды промывали вышеуказанным буфером без ЭГТА. Конечный митохондриальный осадок суспендировали в промывочном буфере до получения 60–80 мг белка/мл. Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 120 мМ KCl, 1,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ HEPES (pH 7,25). Контрольные пробы с растворителем проводились в каждой серии экспериментов.

Влияние генистеина на индукцию митохондриальной поры ионами кальция определяли с помощью селективных электродов для измерения мембранного потенциала и кальциевой емкости митохондрий, как описано ранее [14]. Определение кальциевой емкости основано на измерении концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , требуемой для необратимого снижения мембранного потенциала и выхода ионов кальция из митохондрий при последовательных добавках  $\text{Ca}^{2+}$  в концен-

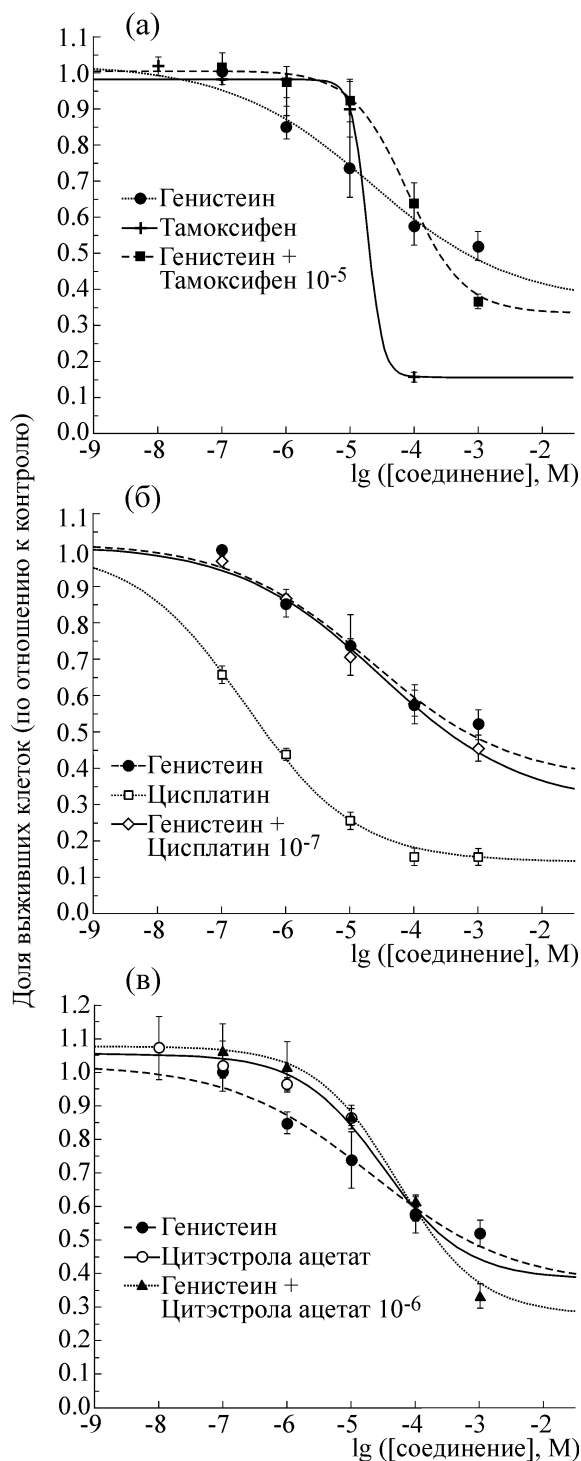
трациях 20–50 мкМ. Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 120 мМ КСl, 1,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 мМ HEPES (рН 7,25). Концентрация  $\text{TPP}^+$  в кювете составляла 1 мкМ. Все измерения проводили при постоянном перемешивании в термостатируемой кювете объемом 1 мл при 26°C. Представлены средние значения трех экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Влияние генистеина на жизнеспособность опухолевых клеток HeLa.** Для оценки цитотоксического действия на клетки культуры HeLa генистеин применяли как самостоятельный препарат, а также в его комбинации с цитостатиком цисплатином, антиэстрогеном тамоксифеном и препаратом, сочетающим цитостатическое и антиэстрогенное действия, цитестрола ацетатом. На рис. 1 приведены кривые выживаемости клеток в присутствии генистеина, препаратов сравнения и их комбинаций.

Полученная концентрация полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) для генистеина составляла  $(2,09 \pm 0,53) \cdot 10^{-4}$  М (табл. 1). Препараты сравнения вызывали гибель клеток при значительно более низких концентрациях, чем генистеин.  $IC_{50}$  для классического цитостатика цисплатина была в 100 раз меньше  $(2,39 \pm 0,41) \cdot 10^{-7}$  М. Для других противоопухолевых антиэстрогенов тамоксифена и цитестрола ацетата полумаксимальное ингибирование наблюдалось при концентрациях  $(1,84 \pm 0,33) \cdot 10^{-5}$  М и  $(3,05 \pm 0,72) \cdot 10^{-5}$  М соответственно (табл. 1). Более того, генистеин не оказывал химиосенсибилизирующего действия, так как не увеличивал цитотоксическое действие этих соединений. Напротив, как следует из данных табл. 1, генистеин снижал их токсическое действие на опухолевые клетки: цисплатина – в 100 раз, тамоксифена – в 4 раза, цитестрола ацетата – в 1,6 раза.

Для выяснения характера взаимодействия генистеина с тамоксифеном, цисплатином и цитестрола ацетатом (синергизм – антагонизм) был использован метод определения синергизма веществ в их комбинациях по значениям комбинаторного индекса сочетаний генистеина с цитостатиками согласно методу ChouTalalay [15]. Значения комбинаторных индексов (табл. 1) свидетельствуют об антагонизме во взаимодействии генистеина и используемых противоопухолевых соединений, так как  $CI$  их комбинаций во всех случаях больше единицы, причем в комбинации с цисплатином и тамоксифеном отмечается выраженный антагонизм.



**Рис. 1.** Кривые выживаемости клеток HeLa в присутствии генистеина, препаратов сравнения и их комбинаций. (а) – Влияние генистеина, тамоксифена и их комбинации; (б) – влияние генистеина, цисплатина и их комбинации; (в) – влияние генистеина, цитестрола ацетата и их комбинации.

**Сравнение влияния генистеина и цитостатиков на жизнеспособность фибробластов кожи крыс.** Для оценки специфичности цитотоксиче-

**Таблица 1.** Показатели  $IC_{50}$  и комбинаторный индекс ( $CI$ ) для генистеина и цитостатиков на опухолевых клетках

Соединение	$IC_{50}$ , М	$CI$
Генистеин	$(2,09 \pm 0,53) \cdot 10^{-4}$	
Тамоксифен	$(1,84 \pm 0,33) \cdot 10^{-5}$	
Цисплатин	$(2,39 \pm 0,41) \cdot 10^{-7}$	
Цитестрола ацетат	$(3,05 \pm 0,72) \cdot 10^{-5}$	
Тамоксифен + Генистеин	$(7,92 \pm 0,12) \cdot 10^{-5}$ *	12,283
Цисплатин + Генистеин	$(2,83 \pm 0,59) \cdot 10^{-5}$ **	12,806
Цитестрола ацетат + Генистеин	$(5,14 \pm 0,92) \cdot 10^{-5}$	2,626

Примечание: \*  $p < 0,05$  в сравнении с тамоксифеном, \*\*  $p < 0,05$  в сравнении с цисплатином;  $CI < 1$  – синергизм,  $CI = 1$  – суммация,  $CI > 1$  – антагонизм.

**Таблица 2.** Показатели  $IC_{50}$  для генистеина и цитостатиков на фибробластах кожи крыс

Соединение	$IC_{50}$ , М
Генистеин	$(1,47 \pm 0,05) \cdot 10^{-4}$
Цисплатин	$(1,47 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$
Тамоксифен	$(2,0 \pm 0,6) \cdot 10^{-5}$
Цитестрола ацетат	$(5,01 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$

ского действия генистеина нами было изучено его действие на нормальные нетрансформированные клетки – фибробласты кожи крыс. Данные представлены в табл. 2. Как видно из табл. 2,  $IC_{50}$  для генистеина на опухолевых клетках и фибробластах кожи крыс практически совпадают ( $2,09 \cdot 10^{-4}$  М и  $1,4 \cdot 10^{-4}$  М соответственно). Эти данные показывают, что генистеин в концентрациях, значительно превышающих физиологические, действует как неспецифический ингибитор клеточной пролиферации. В отличие от генистеина, токсическое действие цитостатиков на фибробласты проявлялось при более высоких концентрациях, чем на опухолевых клетках.

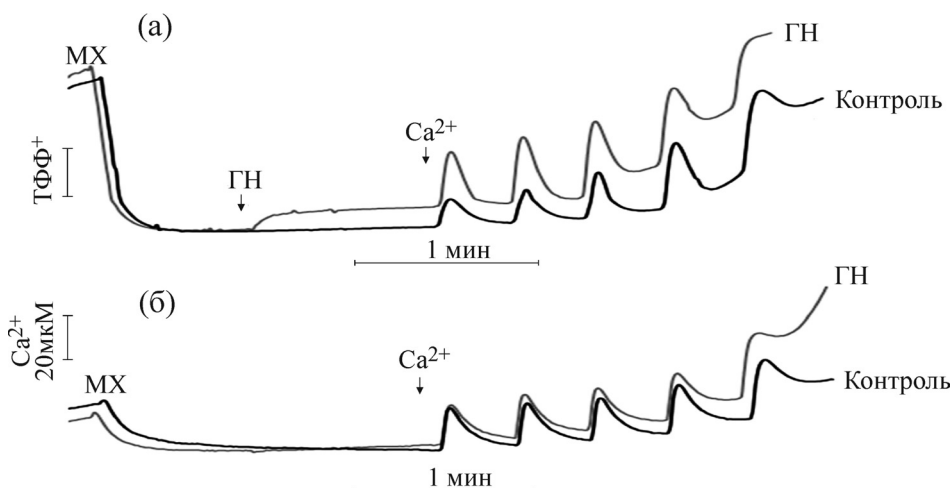
**Влияние генистеина на экспрессию мРНК Вах и Bcl-2 в клетках HeLa.** Для оценки влияния генистеина на процессы апоптоза в клетках культуры HeLa методом ПЦР в реальном времени был измерен уровень экспрессии митохондриальных про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2, участвующих в регуляции апоптоза.

Полученные данные показывают, что при инкубации клеток HeLa с генистеином (0,1 мМ) в течение 48 ч происходит увеличение экспрессии гена антиапоптотического белка Bcl-2 в 3,68 раза и уменьшение экспрессии гена проапоптотического белка Вах в 22,32 раза, что позволяет судить о проявлении цитопротекторных свойств генистеина.

**Влияние генистеина на индукцию митохондриальной поры ионами кальция.** Для оценки влияния генистеина на индукцию внутреннего пути апоптоза, который осуществляется с участием митохондрий, было исследовано влияние генистеина на индукцию митохондриальной поры ионами кальция на изолированных митохондриях печени крыс. Генистеин в диапазоне концентраций от 20 до 100 мкМ не оказывал влияния на открытие индуцированной ионами кальция митохондриальной поры. На рис. 2 показано, что в присутствии 50 мкМ генистеина кальциевая емкость митохондрий печени крыс не изменялась по сравнению с контролем. Падение мембранного потенциала (рис. 2а) и выход ионов кальция (рис. 2б) в присутствии генистеина происходили при том же количестве добавок  $CaCl_2$ , как и в контроле.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время существуют противоречивые данные относительно механизмов действия изофлавоноидов, и в частности генистеина, на пролиферацию опухолевых клеток. Противоречие заключается в том, что генистеин, с одной стороны, может ингибировать пролиферацию опухолевых клеток и индуцировать апоптоз, а с другой – защищает клетки от токсических метаболитов, проявляя антиоксидантные свойства [8]. В аналитических обзорах описано как химиосенсибилизирующее, так и цитопротекторное действие генистеина. Различное действие генистеина, структура которого сходна с эстрадиолом (рис. 3), может быть объяснено различиями в рецепторном статусе ткани-мишени. В женских репродуктивных органах преобладают рецепторы эстрогена альфа (ERalpha), в костной ткани и простате – рецепторы эстрогена бета (ERbeta). Сродство генистеина к ERbeta в 20–30 раз выше, чем к ERalpha. Предполагается, что свя-



**Рис. 2.** Влияние генистеина на индукцию митохондриальной поры ионами кальция. Индукция митохондриальной поры последовательными добавками  $\text{CaCl}_2$  по 20 мкМ каждая (конечная концентрация) в контроле и в присутствии 50 мкМ генистеина, определяемая ТФФ<sup>+</sup>-селективным электродом по снижению мембранного потенциала митохондрий (а) и  $\text{Ca}^{2+}$ -селективным электродом по выходу ионов кальция (б). Среда инкубации содержала 125 мМ КСl, 15 мМ НЕРЕС, рН 7,4; 5 мМ сукцината, митохондрии (1 мг белка/мл).

зывание ERbeta с лигандом ведет к торможению пролиферации, а связывание ERalpha – к индукции пролиферации [16].

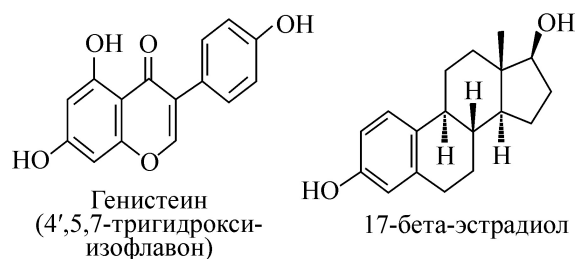
В данной работе было изучено влияние синтетического генистеина на опухолевые клетки HeLa, в которых представлены ERalpha и отсутствуют ERbeta. Полученная нами концентрация полумаксимального ингибирования, равная  $(2,09 \pm 0,53) \cdot 10^{-4}$  М, полностью согласуется с литературными данными [17]. Поскольку физиологическая концентрация генистеина в крови при умеренном содержании сои в рационе питания колеблется в области  $10^{-6}$  М [18], для осуществления противоопухолевого эффекта необходима доза генистеина, превышающая физиологическую как минимум в 100 раз. С целью поддержания высокой концентрации генистеина в плазме крови разработаны его конъюгаты с наночастицами [17].

Следует отметить, что для используемых в практике противоопухолевых средств константы полумаксимального ингибирования жизнеспособности клеток гораздо ниже.

Как следует из полученных данных, генистеин не оказывал химиосенсибилизирующего действия, не увеличивая токсическое действие противоопухолевых цитостатиков, как можно было ожидать, основываясь на некоторых данных [10]. Напротив, генистеин снижал их токсическое действие на опухолевые клетки. Подобным образом действует дегидроэпиандростерон – стероидный гормон и цитопротектор: в комбинации с дегидроэпиандростероном  $IC_{50}$  для цисплатина увеличивалась в десятки раз [19]. Согласно методу

Chou–Talalay, взаимодействие генистеина с исследуемыми в работе цитостатиками можно охарактеризовать как антагонистическое.

Хотя в высоких концентрациях генистеин индуцирует клеточную гибель, данные о его влиянии на факторы апоптоза носят противоречивый характер. Было показано, что генистеин является ингибитором ДНК-топоизомеразы II, ингибирует каспазы 3-8-9, увеличивает экспрессию Вах в клетках HeLa [20]. Есть данные о том, что генистеин способен запускать как внутренний, так и внешний пути индукции апоптоза [21]. С другой стороны, генистеин может увеличивать экспрессию Bcl-2 и ингибировать блеббинг [22]. Нами показано, что генистеин в концентрации 100 мкМ при 48-часовой инкубации увеличивает экспрессию мРНК антиапоптотического белка Bcl-2 и уменьшает экспрессию гена проапоптотического белка Вах, что также свидетельствует о преобладании у генистеина цитопротекторных свойств. В этих концентрациях генистеин не влиял на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую циклоспорин-чувствительную пору митохондрий, т.е. не индуцировал внутренний митохон-



**Рис. 3.** Структуры генистеина и 17-бета-эстрадиола.

дриальный апоптотический путь. В аналогичных экспериментальных условиях стероидный гормон прогестерон в таких же концентрациях индуцировал открытие поры и клеточную гибель [14].

Можно предполагать, что цитотоксическое действие генистеина при высоких концентрациях носит неспецифический характер, поскольку наблюдается не только на опухолевых клетках, но и на нормальных фибробластах. В микромолярных концентрациях, близких к физиологическим, генистеин снижает антипролиферативное действие цистостатиков, проявляя цитопротекторное действие. Полученные результаты указывают на возможность применения изофлавоноида генистеина для снижения токсического действия цитостатиков на здоровые клетки.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. G. Pons, M. Nadal-Serrano, M. Torrens-Mas, et al., *J. Cell Biochem.* **22** (2015). doi: 10.1002/jcb.25268.
2. P. Xiong, R. Wang, X. Zhang, et al., *Anticancer Agents Med. Chem.* **20** (2015).
3. G. Ouyang, L. Yao, K. Ruan, et al., *Cell Biol. Int.* **33**, 1237 (2009).
4. A. Hussain, G. Harish, and S. A. Prabhu, *Cancer Epidemiol.* **36**, e387 (2012).
5. А. В. Семейкин, Т. А. Федотчева, И. С. Левина и др., *Хим.-фарм. журн.* **48** (6) 9 (2014).
6. Э. Е. Нифантьев, А. М. Коротеев и А. М. Поздеев *Хим.-фарм. журн.* **49** (2), 8 (2015).
7. H. Q. Li, Y. Luo, and C. H. Qiao, *Mini Rev. Med. Chem.* **12**, 350 (2012).
8. S. Aufderklamm, F. Miller, A. Galasso, et al., *Cancer Res.* **202**, 101 (2014). doi: 10.1007/978-3-642-45195-9\_12.
9. D. K. Gong, B. H. Liu, and X. Tan, *Human Drug Res. (Stuttg.)* **65** (2) 65 (2015). doi: 10.1055/s-0034-1372595.
10. K. Sahin, M. Tuzcu, N. Basak, et al., *J. Oncol.* 2012: 461562 (2012). doi: 10.1155/2012/461562.
11. E. K. Kim, K. B. Kwon, M. Y. Song, et al., *Mol. Cell. Endocrinol.* **278** (1–2) 18 (2007).
12. Т. А. Федотчева, Н. И. Федотчева, В. В. Теплова и др., *Вопр. биол. мед. и фарм. хим.* **11** (11), 158 (2013).
13. Т. А. Федотчева, А. Г. Акопджанов, Н. Л. Шимановский и др., *Биофизика* **59** (5), 902 (2014).
14. Т. А. Федотчева, А. Г. Круглов, В. В. Теплова и др., *Биофизика* **57** (6) 1014 (2012).
15. J. C. Ashton, *Cancer Res.* **75** (11), 2400 (2015). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3763.
16. K. Morito, T. Hirose, J. Kinjo, et al., *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 351 (2001).
17. H. Zhang, G. Liu, X. Zeng, et al., *Int. J. Nanomedicine* **10**, 2461 (2015). doi: 10.2147/IJN.S78988.
18. L. Varinska, P. Gal, G. Mojzisoava, and L. Mirossay, *Int. J. Mol. Sci.* **16** (5) 11728 (2015). doi: 10.3390/ijms160511728.
19. Т. А. Федотчева, Н. Л. Шимановский, А. И. Сендерович и др., *Хим.-фарм. журн.* **41** (7), 3 (2007).
20. M. W. Lee, J. H. Bach, H. J. Lee, et al., *Cancer Invest.* **23** (7) 586 (2005).
21. S. H. Kim, S. H. Kim, S. C. Lee, and Y. S. Song, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1171**, 196 (2009). doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04902.x.
22. P. Krejbich-Trotot, M. Denizot, J. J. Hoarau, et al., *FASEB J.* **25** (1) 314 (2011). doi: 10.1096/fj.10-164178.

## Cytoprotective Effects of Phytoestrogen Genistein against Cancer Cells

**T.A. Fedotcheva\* \*\*, K.E. Shirokih\*, A.I. Matyushin\*, V.M. Rzheznikov\*\*\*, V.Y. Kovtun\*\*\*\*, and N.L. Shimanovskii\***

\*Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

\*\*All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, ul. Grina 7, Moscow, 117216 Russia

\*\*\*Institute of Experimental Endocrinology, ul. Moskvorech'e 1, Moscow, 115478 Russia

\*\*\*\*Research and Production Center "Farmzaschita", Vashutinskoe shosse 11, Moscow Region, Khimki, 141400 Russia

In this paper we study the effect of synthetic isoflavonoid genistein against cancer HeLa cells, which contain estrogen receptors alpha but not beta, with the aim to determine the cytotoxic or cytoprotective effect of genistein. It is shown that the half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) value of genistein (0.2 mM) for the growth inhibition of HeLa cells is at least ten times higher than that one of tamoxifen and cisplatin – drugs, used in cervical cancer treatment. In micromolar concentrations (0.1–10  $\mu$ M) genistein decreased the cytotoxic effects of cisplatin and tamoxifen. The decreased Bax mRNA expression and increased Bcl-2 mRNA expression after incubation of the cells with genistein also demonstrate the cytoprotective, anti-apoptotic effect of genistein. Genistein, even in high concentrations, had no effect on membrane potential and calcium capacity of isolated mitochondria, without activating the opening of  $Ca^{2+}$ -induced mitochondrial pore. Thus, these data demonstrate a cytoprotective effect of isoflavonoid genistein against this type of cancer cells.

*Key words: cancer HeLa cells, isoflavonoids, phytoestrogens, genistein, apoptosis*