

ID: 2017-02-1276-A-13114

Оригинальная статья

Маслякова Г.Н., Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Бучарская А.Б., Тычина С.А., Корчаков Н.В.

Морфологические изменения перевитого рака почки у крыс при введении флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного

ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России

Резюме

В экспериментах *in vivo* проведено исследование противоопухолевой активности экстракта аврана лекарственного при различных способах введения в дозе 110 мг/кг/сут на протяжении 12 дней у крыс с перевитым раком почки (РА). Установлено, что внутримышечное введение экстракта является наиболее эффективным, и приводит к замедлению темпов роста опухоли и уменьшению конечного объема опухоли на 40% по сравнению с размерами опухоли у животных без воздействия экстракта. При пероральном введении экстракта также происходит замедление темпов роста опухоли, а к окончанию эксперимента (14 сутки) объем опухоли уменьшается на 23% по сравнению с группой крыс без воздействия. Гистологические изменения в опухолевой ткани были более выражены при внутримышечном введении и проявлялись некробиотическими и атрофическими изменениями в клетках, снижением пролиферативной активности, отсутствием митозов и уменьшением экспрессии ядерной РНК, что может говорить о блокировке синтетических процессов на уровне ядра. Таким образом, наиболее выраженный патоморфоз перевитого рака почки под влиянием экстракта аврана лекарственного наблюдается при внутримышечном пути введения экстракта.

Ключевые слова: флавоноиды, рак почки, экстракт аврана лекарственного, патоморфоз

Введение

В настоящее время нет ни одного противоопухолевого препарата, который был бы безопасен в рекомендуемых для клинического применения дозах и не имел бы ограничений для использования [1]. Недостатками имеющихся противоопухолевых препаратов являются их токсическое влияние на неизменные органы и ткани организма и развитие к ним устойчивости опухолей [2]. Это делает необходимым поиск новых, более безопасных и высокоэффективных лекарственных средств.

Особое внимание уделяется созданию лекарственных средств растительного происхождения с минимальными побочными эффектами. Препараты из растительного сырья могут использоваться не только для уничтожения опухолевых клеток, но и защиты нормальных клеток (в том числе, и стволовых клеток костного мозга) при проведении стандартного курса химио- и радиотерапии [1,2,3].

Самой перспективной группой, по мнению ряда авторов, являются флавоноиды, так как обладают наибольшим количеством биологических эффектов, оказывающих положительное влияние на результат лечения новообразований [2,3]. Открытие в 2011 году способности растительного флавоноида вогонина к активации апоптоза в опухолевых клетках [4] позволило продолжить поиск и других биофлавоноидов, обладающих противоопухолевой активностью.

При различных способах извлечений из цветков и листьев аврана можно получать биологически активные композиции, обладающие различными свойствами: слабительным, рвотным, спазмолитическим, диуретическим, дигиталисоподобным действием на сердце, противовоспалительным, антиоксидантным, иммуномодулирующим, противотуберкулезным и др. [5-9].

Ранее на лабораторных животных с перевитыми опухолями нами было показано, что флавоноидсодержащий экстракт аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), наряду с малой токсичностью, обладает противоопухолевой активностью в отношении перевиваемого рака печени [10-14]. Исследований противоопухолевого действия экстракта аврана на перевитые опухоли почки у крыс ранее не проводили.

Цель исследования: в экспериментах *in vivo* исследовать противоопухолевую активность флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного на модели перевитого рака почки у крыс.

Материал и методы

Использовали водные растворы экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), собранного в экологически чистом районе, на острове Чардым Саратовской области. Экстракты были получены нами авторским способом (Патент РФ 2482863), позволяющим существенно повысить выход биофлавоноидов и предусматривающим минимальный выход токсичных соединений (алкалоидов, гликозидов и др.) [15], что особенно актуально при получении нетоксичных экстрактов ядовитых растений, к которым относится авран лекарственный. Ранее в составе травы аврана была описана бетулиновая кислота, обладающая противоопухолевой активностью, но использованная нами технология получения экстракта исключала выход данного соединения [15]. Экстракт, полученный данным способом из аврана лекарственного имеет следующий химический состав: 4-винил-2-метоксифенол; 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он; 2,3-дигидробензофуран; 3-фуранкарбоновая кислота; 5-гидроксиметил-2-фуральдегид; этил-α-D-рибозид; 4-пропилфенол; пирокатехин; L-люксоза (пентоза); 6-деоксигексоза L-галактоза; бензоиллюксусной кислоты этиловый эфир; гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота); гомованилиновая кислота; глюкоза; 1,4-ангидро- D-маннитол; бензойная кислота; кверцетин. Среднее значение кверцетина в данном экстракте с использованием градуировочного графика стандартного образца кверцетина (98%) Sigma, составляет 0,66%. Установленное нами методом жидкостной хроматографии количество кверцетина в сухом остатке экстрактивных веществ (получаемого из 10 г сухой травы аврана) составило 350 мкг [15]. Экстракт получен на Кафедре общей биологии, фармакогнозии и ботаники СГМУ им. В.И. Разумовского, вводили животным в виде водного раствора (концентрация экстракта 100 мг/мл).

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащему Женевской Конвенции 1985 г. о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных». Протокол исследований одобрен этической комиссией ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол №13 от 3 мая 2011 г.).

В эксперименте, проведенном в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [17] на базе Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ, было использовано 30 самцов белых лабораторных крыс линии Wistar, массой 150 ± 50 г, которым имплантировали подкожно в области лопатки по 0,5 мл 25% опухолевой взвеси рака почки РА в растворе Хэнкса. Опухоль была получена из банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Животные с перевитым раком почки методом случайной выборки были разделены на три группы по 10 крыс: первую и вторую – опытные, крысы получали экстракт аврана либо перорально, либо внутримышечно в дозе 110 мг сухой массы экстракта/кг/сутки. Третью группу - сравнения, составили животные с перевитой опухолью, но без введения экстракта. В опытных группах через 72 ч после трансплантации опухоли крысам вводили физиологический раствор ежедневно в течение двух недель, после чего животных всех групп выводили из эксперимента путем декапитации и производили забор образцов ткани опухоли.

Динамику роста опухоли оценивали по изменению ее объема по формуле: $V = A \times B \times C$, где А – ширина, В – толщина, С – высота опухоли. Измерения проводили электронным штангенциркулем каждый день от начала эксперимента. Вычисляли индекс торможения роста опухоли (ИТРО) – показатель эффективности противоопухолевого препарата, вычисляемый по формуле: $ИТРО = [(M_{контр} - M_{опыт}) / M_{контр}] \times 100\%$, где $M_{контр}$ – средняя масса опухоли в группе контроль, а $M_{опыт}$ – опытной группы (Вычисляется масса опухоли, полученная на конец эксперимента).

Для изучения патоморфоза опухоли применяли морфологические и морфометрические методы с использованием стандартных гистологических методик окраски гематоксилином и эозином, по Романовскому-Гимзе; гистохимические методики: PAS реакция, а также окраска метиловым зеленым пиронином по Браше для выявления ДНК и РНК, иммуногистохимическое окрашивание на маркер пролиферации Ki-67. Индекс пролиферации рассчитывался, как отношение положительно окрашенных клеток (Ki67), к общему количеству клеток в поле зрения. Учитывали наличие дистрофических и некробиотических изменений в опухолевых клетках, а также такие цитоморфометрические показатели, как диаметр опухолевой клетки, диаметр ядра опухолевой клетки, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), среднее количество клеток в поле зрения. Подсчет проводили на 100 клеток в 10 полях зрения каждого микропрепарата, с помощью Микровизора медицинского проходящего света μ Vizo-103 на увеличении 774. При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения средних полученных показателей был использован критерий Крамера-Уэлча (Т), при котором разность средних арифметических двух выборок (контрольной и экспериментальной) делится на естественную оценку среднего квадратического отклонения этой разности. При данном методе разность средних с вероятностью в 95% определяется при $T \geq 1,96$. Весь статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения STATISTICA 10.0 Interprise.

Результаты и обсуждение

При внутримышечном введении экстракта аврана отмечали статистически значимое ($T \geq 1,96$) замедление темпов роста перевиваемого рака почки, чем в группе сравнения во все дни измерений. На момент окончания эксперимента объем опухоли в этой группе составил $6,7 \pm 0,53$ см³ и был на 40 % меньше ($T \geq 1,96$), чем в группе сравнения ($11 \pm 0,92$ см³).

При пероральном ведении экстракта аврана наблюдали замедление темпов роста опухоли ($T \geq 1,96$) по сравнению с крысами группы сравнения с пятого по десятый день и с двенадцатого по четырнадцатый день введения экстракта. На момент окончания эксперимента объем опухоли в этой группе составил $8,55 \pm 0,26$ см³ и был на 23 % меньше ($T \geq 1,96$), чем в группе сравнения ($11 \pm 0,92$ см³). Следует отметить, что именно в этой группе животных с 9 по 11 день отмечали самый медленный темп прибавки массы опухоли. (Рис.1).

Индекс торможения по массе опухоли составил 71% для перорального введения и 73 для внутримышечного пути введения экстракта аврана лекарственного. (Табл. 1)

Патоморфоз рака почки

При гистологическом исследовании в ткани опухоли под действием аврана обнаружены обширные зоны некроза и дистрофические изменения опухолевых клеток, а также апоптозные тельца (рис. 2б). В группе сравнения (без лечения) встречали фигуры митозов (до 2 в поле зрения), чего не отмечали в опытных группах.

Таблица 1. Средняя масса опухоли на конец эксперимента (M±σ)

Группа	Масса опухоли	ИТРО (%)
Группа сравнения	11,52±2,34	0
Экстракт аврана в/м	3,1±1,16	73
Экстракт аврана per os	3,29±1,23	71

Примечание: ИТРО – индекс торможения роста опухоли по массе

Таблица 2. Морфометрические показатели клеток опухоли почки (РА) в контрольной группе и после внутримышечного и перорального введения экстракта аврана

Группа	Число кл. в п/зр (ув.774)	Диаметр ядра (мкм)	Диаметр клетки (мкм)	ЯЦИ	Индекс пролиферации
Группа сравнения	106,47 ±2,36	0,0104 ±0,0003	0,0164 ±0,001	0,63 ±0,024	0,48 ±0,053
Экстракт аврана в/м	52,33 ±4,8*	0,0062 ±0,0003*	0,0103 ±0,0005*	0,61 ±0,031	0,000 ±0,0000*
Экстракт аврана per os	63,0 ±2,43*	0,0088 ±0,0009*	0,0250 ±0,0120	0,60 ±0,079	0,01 ±0,0001*

Примечание: * – $T > 1,96$ достоверность различий более 95% между опытной группой и группой сравнения

При проведении морфометрии наблюдали статистически значимое снижение среднего числа клеток в поле зрения в два раза при внутримышечном введении и 1,6 раза при пероральном введении (табл. 2).



Рисунок 1. Динамика роста рака почки (РА), привитого крысам в группе сравнения и группах с пероральным и внутримышечным введением водного раствора экстракта аврана лекарственного. Примечание: * $T > 1.96$ достоверность различий более 95% при анализе значений группы с пероральным введением и группой сравнения. + - $T > 1.96$ достоверность различий более 95% при анализе значений группы с внутримышечным введением и группой сравнения.

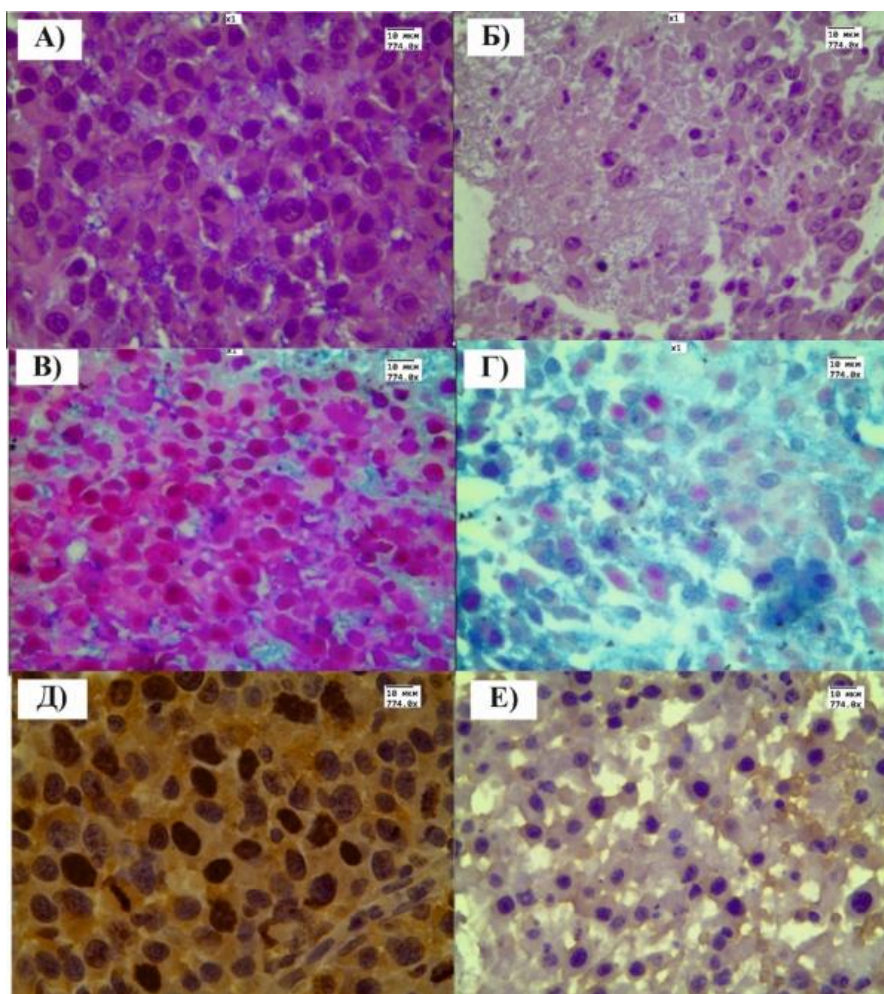


Рисунок 2. Морфологические изменения в перевитом раке почки. А – контрольная группа, Н&Е; Б – дистрофические и некротические изменения, апоптотные тельца, при в/м введении экстракта аврана, Н&Е; В – контрольная группа, окраска по Браше; Г – снижение экспрессии окраски на ДНК при в/м введении экстракта аврана, окраска по Браше; Д – ядерная экспрессия Ki67 клеток рака почки в контроле; Е – отсутствие экспрессии Ki67 при в/м введении экстракта аврана, апоптотные тельца. Ув. x774.

Выявили уменьшение размеров диаметра ядра при внутримышечном введении в 1,8 раза и в 1,2 раза - при пероральном введении и статистически значимое уменьшение среднего диаметра клетки при внутримышечном введении в 1,5 раза по сравнению с группой без воздействия, что свидетельствовало об атрофических изменениях в клетках.

При этом ядерно-цитоплазматический индекс не менялся при введении экстракта. При окраске по Браше отмечали уменьшение экспрессии ядерной РНК в ткани опухоли крыс, как в группе перорального, так и внутримышечного введения, что возможно говорит о снижении ее транскрипционной активности.

Сравнительный анализ двух различных методов введения экстракта аврана показал, что внутримышечное введение является наиболее эффективным, и сопровождается плавной положительной динамикой снижения роста опухоли, с уменьшением конечного объема опухоли на 40% по сравнению динамикой изменения опухоли в группе сравнения.

При пероральном введении экстракта аврана динамика роста опухоли статистически значимо отличалась только до девяти суток, а к окончанию эксперимента объем опухоли стал приближаться к показателям группы сравнения. Влияние экстракта аврана лекарственного на морфологию опухолевой ткани проявлялся выраженными некробиотическими и атрофическими изменениями в опухолевых клетках. Эти данные подтверждаются также отсутствием митозов и уменьшением экспрессии ядерной РНК, снижением пролиферативной активности клеток, что говорит о снижении синтетической активности ядра и отсутствии активного деления опухолевых клеток. Также при воздействии экстракта отмечали появление признаков апоптоза в опухолевых клетках в виде апоптозных телец. Все описанные изменения были более выражены при внутримышечном пути введения.

Заключение

Экстракт аврана лекарственного в дозе 110 мг/кг/сут при внутримышечном пути введения вызывает торможение роста перевитого рака почки (РА) крыс и приводит к развитию некробиотических и дистрофических процессов в опухолевых клетках, появлению признаков апоптоза, снижению пролиферативной активности клеток и уменьшения ядерной РНК.

Литература

1. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. Москва: Практическая медицина, 2014.
2. Корсун В.Ф., Корсун Е.В., Лактин В.М., Фитолектины: руководство по клинической фитотерапии. Москва: Практическая медицина, 2007.
3. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Растения в комплексной терапии опухолей. Москва: Издательство РАМН, 2008.
4. Polier, Ding, Konkimalla, et al., Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1. //Cell Death Dis. 2011. №2. P. e182
5. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В. Изменения лейкоцитарной формулы, красного костного мозга и опухоли лабораторных крыс с перевитой саркомой-45 при введении экстрактов аврана лекарственного, бессмертника песчаного, кукурузы антоциановой. //Саратовский научно-медицинский журнал. 2015. Т. 11. № 3. С. 328-332.
6. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н. и др., Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды. // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т.12. №2. С. 59-59а.
7. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н. и др., Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени РС-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea mays* L.) //Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т.9. №2. С.213-220.
8. Наволокин Н.А., Скворцова В.В., Полуконова Н.В. и др. Противотуберкулезная активность экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) *In vitro*. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. Т. 78. №4. С.10-13.
9. Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Райкова С.В. и др., Противовоспалительная, жаропонижающая и антимикробная активность флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. –Т.-78. - №1, С.34 -38
10. Наволокин Н.А., Павлова А.В. Морфологические изменения в мышцах у лабораторных крыс и определение токсичности при введении экстракта аврана // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2012. Т. 2. № 2. С. 82.
11. Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Бибикина О.А. Цитотоксическая активность *in vitro* экстракта аврана на культуре клеток почек эмбрионов свиньи, зараженных онковирусом. // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013.Т.3. № 2. С.375.
12. Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Бибикина О.А. и др. Цитоморфологические изменения в культуре клеток почки эмбриона свиньи при воздействии экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). //Фундаментальные исследования. 2014. №10-17. С. 1369-1374.
13. Скворцова В.В., Наволокин Н.А. Патоморфоз саркомы s45 при внутримышечном введении флавоноидсодержащего экстракта лабораторным крысам//Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т.3. 2. С. 258.
14. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., et al. A new extraction method of bioflavonoids from poisonous plant (*Gratiola officinalis* L.). //Russian Open Medical Journal. 2014. V3. 3. P. 304.
15. Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). //Химия растительного сырья. 2013. №4. С.165–173.
16. Boryczka, Bebenek, Jastrzebska etc., Crystal structure of betulinic acid-DMSO solvate. Crystalline Materials. – 2012. – V.227. - №6. – pp. 379-384
17. Мионов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Москва: Гриф и К, 2012.