

## ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

### ПАТОМОРФОЗ ПЕРЕВИТОГО РАКА ПОЧКИ (РА) У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*GRATIOLA OFFICINALIS* L.)

Н. А. Наволокин, Д. А. Мудрак, Н. В. Полуконова, А. Б. Бучарская,  
С. А. Тычина, Н. В. Корчаков, Г. Н. Маслякова<sup>1</sup>

В эксперименте *in vivo* исследовали противоопухолевую активность флавоноидсодержащего экстракта цветков и листьев аврана лекарственного при пероральном и внутримышечном введении в дозе 110 мг/кг/сут на протяжении 12 дней. С помощью морфологических и биохимических методов изучено влияние экстракта аврана на опухоль и лейкоцитарную формулу крови лабораторных крыс с перевиваемым раком почки РА. Внутримышечное введение экстракта аврана является наиболее эффективным, и сопровождается замедлением темпов роста опухоли с уменьшением конечного объема опухоли на 40 % по сравнению с размерами опухоли у животных без воздействия экстракта, индекс торможения роста опухоли (ИТРО) составил 73 %. При пероральном введении экстракта аврана отмечали замедление темпов роста опухоли, а к окончанию эксперимента (14 сут) объем опухоли был меньше на 23 %, по сравнению с группой крыс без воздействия, ИТРО составил 71 %. Морфологические изменения в опухолевой ткани более выражены при внутримышечном введении и проявляются выраженными некробиотическими и атрофическими изменениями в клетках (уменьшением размеров ядра и клетки в 1,5 раза), отсутствием пролиферативной активности (индекс пролиферации Ki67 при обоих путях введения — 0, а в группе без воздействия — 0,48, уменьшение количества клеток в поле зрения в 2 раза,  $p \leq 0,05$ ), отсутствием митозов и уменьшением экспрессии ядерной РНК, что говорит о блокировке синтетических процессов на уровне ядра. Таким образом, отмечается выраженный патоморфоз рака почки под влиянием экстракта листьев и цветков аврана лекарственного, который наиболее выражен при внутримышечном введении.

**Ключевые слова:** биофлавоноиды; экстракт цветков и листьев; патоморфоз; авран; рак почки; *Gratiola officinalis*; апоптоз.

### ВВЕДЕНИЕ

До сих пор не существует ни одного противоопухолевого препарата, который был бы безопасен в рекомендуемых для клинического применения дозах и не имел бы ограничений для использования [2]. Недостатками синтезируемых противоопухолевых препаратов являются их токсическое влияние на неизмененные органы и ткани организма и развитие к ним устойчивости опухолей [1]. Это делает необходимым поиск новых, более безопасных и высоко эффективных лекарственных средств.

Особое внимание уделяется созданию лекарственных средств растительного происхождения с минимальными побочными эффектами. Препараты из растительного сырья могут использоваться не только для профилактики опухолей, но и защиты нормальных клеток (в том числе и стволовых клеток костного моз-

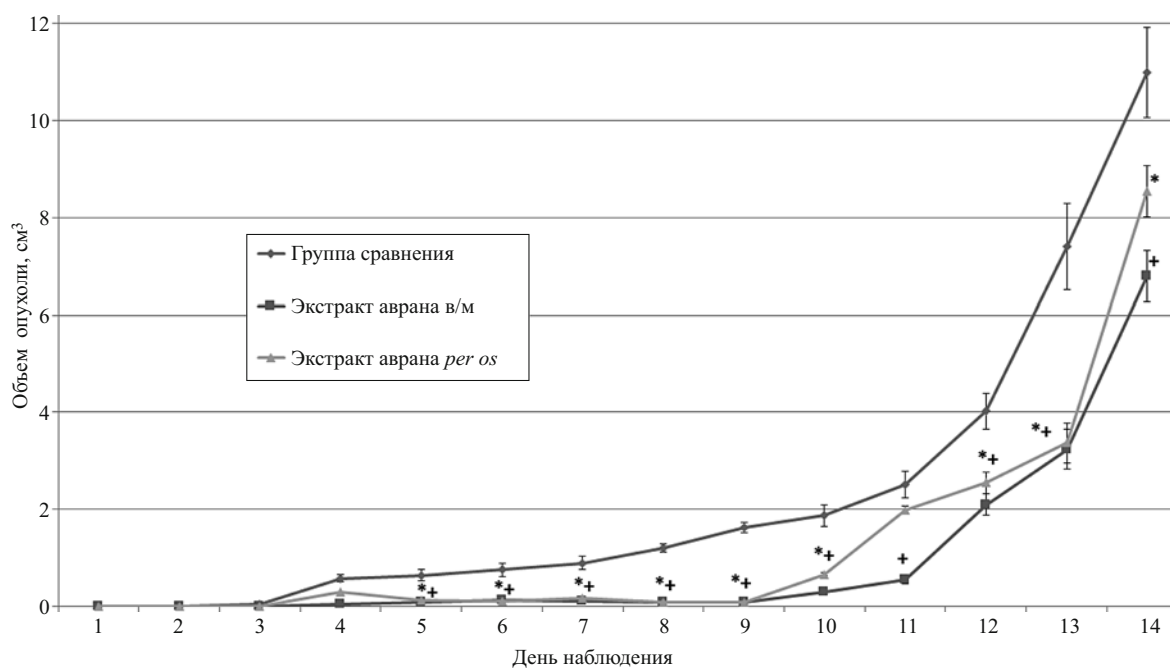
га) при проведении стандартного курса химио- и радиотерапии [1 – 3].

Самой перспективной группой, по мнению ряда авторов, являются флавоноиды, так как обладают наибольшим количеством биологических эффектов, оказывающих положительное влияние на результат лечения новообразований [1, 5]. Открытие в 2011 г. способности растительного флавоноида вогонина к активации апоптоза в опухолевых клетках [14] 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. [6, 8 – 10, 12].

Ранее на лабораторных животных с перевиваемыми опухолями нами показано, что флавоноидсодержащий

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского Минздрава России, Россия, 410012, Саратов, ГСП ул. Большая Казачья, 112.



**Рис. 1.** Динамика роста объема рака почки (РА), привитого крысам в группе сравнения и группах с пероральным и в/м 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.

экстракт аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), наряду с малой токсичностью, обладает противоопухолевой активностью в отношении перевиваемого рака печени [6]. Исследований экстракта аврана в экспериментах с перевиваемым раком почки ранее не проводили.

Целью исследования в экспериментах *in vivo* стало изучение противоопухолевой активности флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного и его влияния на перевитой рак почки РА и лейкоцитарную формулу крови лабораторных крыс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованы 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.) [7, 13], что особенно важно 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 [11]. Экстракт, полученный данным способом из аврана лекарственного, имеет следующий химический состав: 4-винил-2-метоксифенол; 2,3-дигид-

ро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он; 2,3-дигидробензофуран; 3-фуранкарбоновая кислота; 5-гидроксиметил-2-фуральдегид; этил- $\alpha$ -D-рибозид; 4-пропилфенол; пирокатехин; L-люксоза (пентоза); 6-деоксигексоза L-галактоза; бензоилуксусной кислоты этиловый эфир; гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота); гомованилиновая кислота; глюкоза; 1,4-ангидро-D-маннитол; бензойная кислота; кверцетин. Среднее значение содержания 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 [7].

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащих Женевской конвенции 1985 г. о “Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных”. Тема и описания экспериментов одобрены этической комиссией ГБОУ ВПО СГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава РФ (протокол № 13 от 3 мая 2011 г.).

В эксперименте, проводимом в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [4], использованы 30 самцов белых лабораторных крыс линии Вистар, массой  $(150 \pm 50)$  г (виварий и центр коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии, ФГБОУ ВО СГМУ им

В. И. Разумовского Минздрава РФ), которым имплантировали подкожно в области лопатки по 0,5 мл 25 % опухолевой взвеси рака почки РА в растворе Хэнкса. Опухоль получена из банка опухолевых штаммов ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Животные с перевитым раком методом случайной выборки разделены на 3 группы по 10 крыс: первую и вторую — опытные, в которых крысы получали экстракт аврана либо перорально, либо внутримышечно в дозе 110 мг сухой массы экстракта/кг. Экстракт, полученный на кафедре общей биологии, фармакогнозии и ботаники СГМУ им В. И. Разумовского, вводили животным в виде водного раствора (концентрация экстракта 100 мг/мл). Третью группу — группу сравнения — составили животные с перевиваемой опухолью, но без введения экстракта. В опытных группах через 72 ч после трансплантации опухоли крысам раствор вводили ежедневно в течение 2 недель, после чего животных всех групп выводили из эксперимента декапитацией и производили забор образцов ткани опухоли и кровь.

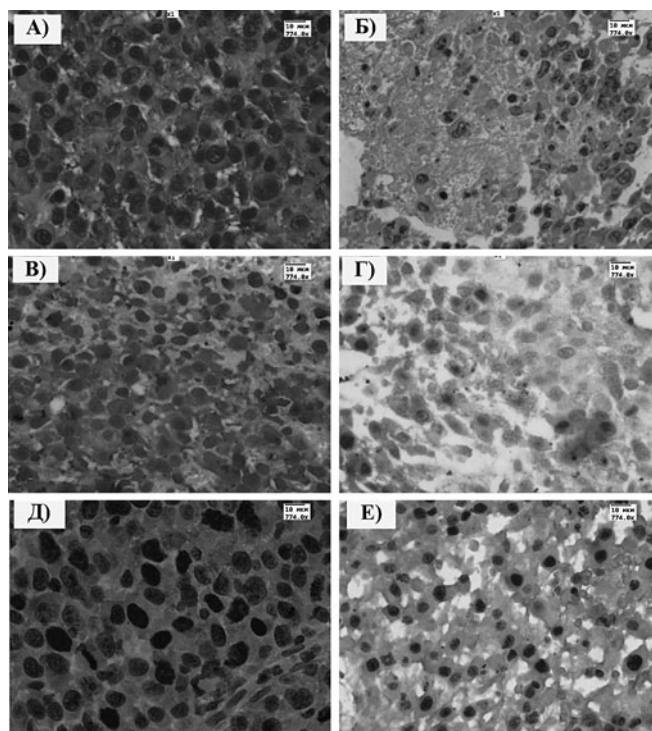
Динамику роста опухоли (рис. 1) оценивали по изменению ее объема по формуле:  $V = A \cdot B \cdot C$ , где  $A$  — ширина,  $B$  — толщина,  $C$  — высота опухоли. Измерения проводили электронным штангенциркулем каждый день от начала эксперимента. Вычисляли индекс торможения роста опухоли — показатель эффективности противоопухолевого препарата, вычисляемый по формуле:

$$\text{ИТ} = [(M_{\text{контр}} - M_{\text{опыт}}) / M_{\text{контр}}] \cdot 100 \%,$$

где  $M_{\text{контр}}$  — средняя масса опухоли в группе контроль, а  $M_{\text{опыт}}$  — 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, иммуногистохимически определяли ядерный маркер пролиферации Ki67. Учитывали наличие дистрофических и некробиотических изменений и также такие цитоморфометрические показатели, как диаметр раковой клетки, соотношение диаметров раковой клетки и её ядра, 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  $\mu\text{Vizo-103}$  (ЛОМО). Лейкоцитарную формулу крови анализировали по количеству палочкоядерных нейтрофилов, сегментоядерных лейкоцитов, базофилов, моноцитов, лимфоцитов.

При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах проверена при помощи критерия Шапиро — Уилка. Для сравне-



**Рис. 2.** Гистологическое строение рака почки в контроле и при воздействии экстракта аврана лекарственного. Ув.  $\times 774$ .

**А** — контрольная группа, окраска гематоксилином и эозином; **Б** — дистрофические и некротические изменения, апоптозные тельца при в/м введении экстракта аврана, окраска гематоксилином и эозином; **В** — контрольная группа, окраска ДНК и РНК (красное окрашивание ядра) по Браше; **Г** — резкое снижение экспрессии окраски на ДНК при в/м введении экстракта аврана, окраска ДНК и РНК по Браше; **Д** — ядерная экспрессия Ki67 (коричневое окрашивание ядра) клеток рака почки в контрольной группе; **Е** — отсутствие экспрессии Ki67 при в/м введении экстракта аврана, апоптозные тельца.

ния средних полученных показателей использован критерий Крамера — Уэлча (Т), при котором разность средних арифметических 2 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 ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Изменение динамики роста опухоли

При внутримышечном (в/м) 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 группе с внутримышечным введением аврана лекарственного составил  $(6,7 \pm 0,53) \text{ см}^3$  и был достоверно на 40 % меньше ( $T \geq 1,96$ ), чем в группе сравнения ( $11 \pm 0,92 \text{ см}^3$ ).

При пероральном введении экстракта аврана наблюдали замедление темпов роста опухоли ( $T \geq 1,96$ ) по сравнению с крысами третьей группы достоверно с 5 по 10 день и с 12 по 14 день применения экстракта. На момент окончания эксперимента объем опухоли в группе с пероральным введением экстракта аврана лекарственного составил  $(8,55 \pm 0,26)$  см<sup>3</sup> и был достоверно на 23 % меньше ( $T \geq 1,96$ ), чем в группе сравнения  $(11 \pm 0,92)$  см<sup>3</sup>.

Индекс торможения по массе опухоли составил 71 % для перорального введения и 73 % для в/м введения экстракта аврана лекарственного (табл. 1).

### Патоморфоз рака почки

При гистологическом исследовании в ткани опухоли под действием аврана лекарственного обнаружены обширные зоны некроза и дистрофические изменения опухолевых клеток, также определяли апоптозные тельца (рис. 2). В группе сравнения (без лечения) встречали фигуры митозов (до 2 в поле зрения), чего не отмечали в опытных группах. При проведении морфометрии наблюдали статистически значимое снижение среднего числа клеток в поле зрения в 2 раза при в/м введении и 1,6 раза при пероральном введении (табл. 2). Выявили уменьшение размеров диаметра ядра при в/м введении в 1,8 раза и в 1,2 раза — при пероральном введении и статистически значимое уменьшение среднего диаметра клетки при в/м введении в 1,5 раза, по сравнению с группой без воздействия, что

Таблица 1. Средняя масса опухоли на конец эксперимента ( $M \pm \delta$ )

Группа	Масса опухоли	ИТРО, %
Группа сравнения	$11,52 \pm 2,34$	0
Экстракт аврана в/м	$3,1 \pm 1,16$	73
Экстракт аврана <i>per os</i>	$3,29 \pm 1,23$	71

Таблица 2. Морфометрические показатели клеток опухоли почки (РА), перевитой крысам в контрольной группе и после в/м и перорального введения экстракта аврана в дозе 110 мг/кг/сут на протяжении 14 дней ( $M \pm \delta$ )

Группа	Число клеток в поле зрения (ув. $\times 768$ )	Диаметр ядра	Диаметр клетки	ЯЦИ	Индекс пролиферации (Ki67)
Группа сравнения	$106,47 \pm 2,36$	$0,0104 \pm 0,0003$	$0,0164 \pm 0,001$	$0,630 \pm 0,024$	$0,480 \pm 0,053$
Экстракт аврана в/м	$52,3 \pm 4,8^*$	$0,0062 \pm 0,0003^*$	$0,0103 \pm 0,0005^*$	$0,61 \pm 0,03$	$0,0000 \pm 0,0000^*$
Экстракт аврана <i>per os</i>	$63,00 \pm 2,43^*$	$0,0088 \pm 0,0009^*$	$0,025 \pm 0,012$	$0,600 \pm 0,079$	$0,0100 \pm 0,0001^*$

\*  $T > 1,96$  достоверность различий более 95 % при сравнении значений опытной группы и группы сравнения.

Таблица 3. Процентное соотношение клеток в лейкоцитарной формуле у крыс с перевитой опухолью почки (РА) в контрольной группе и после 14-дневного в/м и перорального введения экстракта аврана в дозе 110 мг/кг/сут ( $M \pm \delta$ )

Группа	Нейтрофилы		Эозинофилы	Базофилы	Моноциты	Лимфоциты
	палочко-ядерные	сегментно-ядерные				
Группа сравнения	$9,75 \pm 1,49$	$8,75 \pm 0,25$	$1,00 \pm 0,25$	$0,75 \pm 0,25$	$8,25 \pm 0,95$	$71,5 \pm 2,72$
Экстракт аврана в/м	$7,75 \pm 1,03$	$10,00 \pm 1,08$	$0,75 \pm 0,25$	$0,50 \pm 0,29$	$9,25 \pm 1,31$	$71,75 \pm 0,95$
Экстракт аврана <i>per os</i>	$9,75 \pm 0,48$	$10,00 \pm 1,1$	$0,50 \pm 0,29$	$0,50 \pm 0,29$	$7,00 \pm 0,71$	$72,25 \pm 1,95$

свидетельствовало об атрофических изменениях в клетках. При этом ЯЦИ не меняется при введении экстракта. При окраске по Браше отмечали уменьшение экспрессии ядерной РНК в ткани опухоли крыс, как в группе перорального, так и в/м введения, что, возможно, свидетельствует о снижении ее транскрипционной активности.

### Лейкоцитарная формула

При изучении изменений в лейкоцитарной формуле крови крыс с перевитым раком почки РА не обнаружено статистически значимых различий между экспериментальными группами и группой сравнения, что позволяет сделать вывод об отсутствии влияния экстракта аврана лекарственного при 2-недельном пероральном и в/м введении в дозе 110 мг/кг/сут (табл. 3).

Сравнительный анализ 2 различных методов введения экстракта аврана показал, что в/м введение является наиболее эффективным и сопровождается плавной положительной динамикой снижения роста опухоли с уменьшением конечного объема опухоли на 40 % по сравнению с динамикой изменения опухоли в группе сравнения. При пероральном введении экстракта аврана динамика роста опухоли статистически значимо отличалась только до 9 сут, а к окончанию эксперимента объем опухоли стал приближаться к показателям группы сравнения. Влияние экстракта цветков и листьев аврана лекарственного на морфологию опухолевой ткани проявлялось выраженными некробиотическими и атрофическими изменениями в клетках, что свидетельствует о повреждении клеток и отсутствии их роста. Эти данные подтверждаются также отсутствием митозов и уменьшением экспрессии ядерной РНК и снижением пролиферативной активности клеток, что говорит о снижении синтетической активности ядра и отсутствии активного деления клеток. Также отмечено появление признаков апоптоза в виде апоптозных телец, что требует более детального исследования с по-



мощью иммуногистохимических маркеров. Все описанные изменения более выражены при в/м введении в среднем в 1,5 – 2 раза. Следует отметить, что сходные изменения описаны при влиянии экстракта аврана на ткань перевитого рака печени [6].

## ВЫВОД

Экстракт цветков и листьев аврана лекарственного в дозе 110 мг/кг/сут при в/м введении вызывает торможение роста объема перевиваемого рака почки (РА) крыс и приводит к развитию некробиотических и дистрофических процессов в опухолевых клетках, появлению признаков апоптоза, снижению пролиферативной активности клеток и уменьшению количества ядерной РНК.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Д. Гольдберг, Т. Г. Разина, Е. П. Зуева и др., *Растения в комплексной терапии опухолей*, Издательство РАМН, Москва (2008).
2. Д. Б. Корман, *Основы противоопухолевой химиотерапии*, Практическая медицина, Москва (2014).
3. В. Ф. Корсун, Е. В. Корсун, В. М. Лахтин, *Фитолектины: руководство по клинической фитотерапии*, Практическая медицина, Москва (2007).
4. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильев (ред.), Часть первая, Гриф и К, Москва (2012).
5. Н. А. Наволокин, Н. В. Полуконова, Г. Н. Маслякова и др., *Рос. биотер. ж.*, **12**(2), 59 – 59 (2013).
6. Н. А. Наволокин, Н. В. Полуконова, Г. Н. Маслякова и др., *Саратовский научно-мед. ж.*, **9**(2), 213 – 220 (2013).
7. Н. В. Полуконова, Н. А. Дурнова, М. Н. Курчатова и др., *Химия растит. сырья*, № 4, 165 – 173 (2013).
8. Н. А. Наволокин, А. В. Полуконова, О. А. Бибикина и др., *Фунд. исслед.*, № 10 – 7, 1369 – 1374 (2014).
9. Н. А. Наволокин, В. В. Скворцова, Н. В. Полуконова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(4), 10 – 13 (2015).
10. Н. В. Полуконова, Н. А. Наволокин, С. В. Райкова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **78**(1), 34 – 38 (2015).
11. S. Boryczka, E. Bebenek, M. Jastrzebska, et al., *Crystalline Materials*, **227**(6), 379 – 384 (2012).
12. N. A. Navolokin, N. V. Polukonova, G. N. Maslyakova, et al., *Rus. Open Med. J.*, **2**(1), 0203 (2012).
13. N. V. Polukonova, M. N. Kurchatova, N. A. Navolokin, et al., *Rus. Open Med. J.*, **3**(3), 304 (2014).
14. G. Polier, J. Ding, B. L. Konkimalla, et al., *Cell Death Dis.*, **2**(7), e182 (2011); doi: 10.1038 / cddis.2011.66.

Поступила 31.08.16

## EFFECTS OF *GRATIOLA OFFICINALIS* L. EXTRACT CONTAINING FLAVONOIDS ON PATHOMORPHISM OF INOCULATED RENAL CANCER IN RATS

N. A. Navolokin, D. A. Mudrak, N. V. Polukonova, A. B. Bucharskaya, S. A. Tychina, N. V. Korchakov, and G. N. Maslyakova

V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, ul. Bolshaya Kazachya 112, Saratov, 410012 Russia

The antitumor activity of the extract of flowers and leaves of *Gratiola officinalis* containing flavonoids was experimentally studied *in vivo* upon oral and intramuscular administration in rats at a dose of 110 mg/kg for 12 days. Morphological and biochemical methods were used to assess the influence of the herbal extract on the tumor and the leukocyte formula of blood in laboratory rats with inoculated PA cancer of kidney. The intramuscular administration of *G. officinalis* extract proved to be more effective and was accompanied by the slowing of tumor growth, reduction in final tumor volume (by 40% as compared to the tumor size in untreated animals). The tumor growth inhibition (TGI) index amounted to 73%. When administered orally, the extract of *G. officinalis* also slowed tumor growth, and the final tumor volume (on the 14th day of experiment) was reduced by 23 % compared to the untreated control group ( $p < 0.05$ ; TGI = 71 %). Upon the intramuscular introduction of *G. officinalis* extract, morphological changes in the tumor tissue are also more pronounced as manifested by large necrotic and atrophic changes in the cells (1.5-fold decrease in the nucleus and cell size), absence of proliferative activity (Ki67 proliferation index 0 against 0.48 in the untreated group), two-fold decrease in the number of cells in the visual field ( $p < 0.05$ ), the observed absence of mitosis, and decrease in nuclear RNA expression, which is evidence of the blocking of synthetic processes at the nuclear level. Thus, pronounced pathomorphism in kidney PA cancer under the action of *G. officinalis* leaves and flowers extract was observed, which was most pronounced upon intramuscular administration.

**Keywords:** bioflavonoids; *Gratiola officinalis*; extract of flowers and leaves; pathomorphism; renal cancer; apoptosis.