

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.И. РАЗУМОВСКОГО  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**Наволокин Никита Александрович**

**Патоморфоз и механизмы гибели опухолевых клеток в  
культурах и перевитых опухолях под влиянием  
флавоноидсодержащих экстрактов**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук  
14.03.02 – патологическая анатомия,

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Научные руководители – д.м.н., профессор Маслякова Галина Никифоровна;  
д.б.н., профессор Полуконова Наталья Владимировна

Саратов, 2020

## Оглавление

|                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Введение .....                                                                                                                                                                                                  | 4   |
| Глава 1. <b>Обзор литературы</b> .....                                                                                                                                                                          | 17  |
| 1.1. Патоморфоз: история, терминология, морфологические аспекты.....                                                                                                                                            | 17  |
| 1.2. Программируемая клеточная гибель (ПКГ) как механизм действия<br>противоопухолевых препаратов нового<br>поколения.....                                                                                      | 25  |
| 1.3. Механизмы действия противоопухолевых препаратов растительного<br>происхождения и обусловленные ими морфологические изменения в<br>опухолях и тканях .....                                                  | 39  |
| Глава 2. <b>Материалы, методы и дизайн экспериментов</b> .....                                                                                                                                                  | 46  |
| 2.1. Материалы .....                                                                                                                                                                                            | 46  |
| 2.2. Дизайн экспериментов.....                                                                                                                                                                                  | 49  |
| 2.3. Методы исследований .....                                                                                                                                                                                  | 54  |
| 2.3.1 Морфологические методы исследования клеток в экспериментах<br><i>in vitro</i> .....                                                                                                                       | 54  |
| 2.3.2 Морфологические методы выявления апоптоза и аутофагии в<br>клеточных культурах .....                                                                                                                      | 55  |
| 2.3.3. Морфологические и морфометрические методы исследования...                                                                                                                                                | 60  |
| 2.2.4 Статистические методы анализа.....                                                                                                                                                                        | 65  |
| Глава 3. <b>Морфологические изменения в неопухолевых и опухолевых<br/>клетках под воздействием экстрактов в экспериментах <i>in vitro</i></b> .....                                                             | 67  |
| 3.1. Морфологические изменения неопухолевых клеток эмбриона почки<br>свиньи (SPEV) и опухолевых клеток рака шейки матки (HeLa) в тесте<br>«живые и мертвые» .....                                               | 67  |
| 3.2. Морфологические изменения в опухолевых клетках рака шейки матки<br>человека (HeLa) при разной длительности экспозиции экстрактов.....                                                                      | 78  |
| 3.3. Морфологические показатели жизнеспособности и апоптотической<br>гибели опухолевых клеток человека в тесте на прижизненное<br>окрашивание хроматина ядра.....                                               | 97  |
| 3.4. Морфологические показатели жизнеспособности и апоптотической<br>гибели опухолевых клеток рака шейки матки человека (HeLa), карциномы<br>молочной железы (SK-BR-3) и карцином почки (Сакі-1,<br>Sn12c)..... | 110 |
| 3.5. Оценка активации апоптоза в опухолевых клетках линий Т-клеточного<br>лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарцином молочной железы MCF-7<br>и SK-BR-3, карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3,     |     |

|                                                                                                                                                                                            |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| карциномы толстой кишки НСТ-116, карциномы почки А498 под действием разных экстрактов.....                                                                                                 | 113        |
| <b>Глава 4. Аутофагия и механизмы гибели опухолевых клеток под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов.....</b>                                                                            | <b>122</b> |
| 4.1. Оценка аутофагии в опухолевых клетках .....                                                                                                                                           | 122        |
| 4.2. Морфологические изменения в опухолевых клетках при воздействии микрокапсулированного экстракта аврана в эксперименте <i>in vitro</i> .....                                            | 132        |
| 4.3. Исследование каспазо-зависимого пути апоптоза и его индукция в клетках разных опухолей человека и животных.....                                                                       | 135        |
| <b>Глава 5. Патоморфологические изменения во внутренних органах, опухоли лабораторных крыс с перевитым раком почки РА при пероральном и внутримышечном введении экстракта аврана .....</b> | <b>139</b> |
| 5.1. Изменение динамики роста рака почки РА и дельты массы животных .....                                                                                                                  | 139        |
| 5.2. Патоморфоз перевитого рака почки РА .....                                                                                                                                             | 141        |
| 5.3. Макро- и микроскопические изменения внутренних органов при введении экстракта аврана.....                                                                                             | 151        |
| <b>Глава 6. Патоморфологические изменения во внутренних органах, опухоли лабораторных крыс с перевитой саркомой 45 при пероральном и внутримышечном введении экстракта аврана.....</b>     | <b>161</b> |
| 6.1. Изменение динамики роста перевитой саркомы 45.....                                                                                                                                    | 161        |
| 6.2. Патоморфоз перевитой саркомы 45 .....                                                                                                                                                 | 163        |
| 6.3. Макро- и микроскопические изменения внутренних органов при введении экстракта аврана.....                                                                                             | 174        |
| <b>Глава 7. Патоморфологические изменения опухоли, внутренних органов лабораторных крыс с перевитым раком печени РС-1 при пероральном и внутримышечном введении экстракта аврана.....</b>  | <b>184</b> |
| 7.1. Изменение динамики роста перевитого рака печени и дельты массы животных .....                                                                                                         | 184        |
| 7.2 Патоморфоз перевитого рака печени РС-1 .....                                                                                                                                           | 186        |
| 7.3. Макро- и микроскопические изменения внутренних органов при введении экстракта аврана.....                                                                                             | 197        |
| <b>Глава 8. Обсуждение результатов собственных исследований.....</b>                                                                                                                       | <b>206</b> |
| <b>Глава. 9. Заключение.....</b>                                                                                                                                                           | <b>222</b> |
| Выводы .....                                                                                                                                                                               | 224        |
| Практические рекомендации .....                                                                                                                                                            | 226        |
| Перспективы дальнейшей разработки темы исследования.....                                                                                                                                   | 227        |
| <b>Список используемых сокращений.....</b>                                                                                                                                                 | <b>229</b> |
| <b>Список литературы.....</b>                                                                                                                                                              | <b>230</b> |

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Онкологические заболевания занимают второе место в структуре смертности во всем мире. В период с 2005 по 2015 гг. количество выявленных случаев онкологических заболеваний в мире увеличилось на 33%, причем только 16% приходилось на пожилых людей. Международное агентство по изучению рака (МАИРК) и эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 2017 г. спрогнозировали к 2030 г. увеличение смертности от рака на 70% (с 8,2 до 13 миллионов человек, умерших в год).

В России в 2016 г. от онкологических заболеваний скончались 299 тысяч человек. В 2017 г. в России впервые выявлено почти 541 тыс. пациентов с онкозаболеваниями, умерло от злокачественных опухолей 290,7 тыс. больных, что составляет 15,9% в общей структуре смертности (Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2018 г.).

В лечении онкологических больных остается много нерешенных проблем: выраженная токсичность многокурсовой химиотерапии (Sanderson H. et al., 2004; Перельмутер В.М., 2007; Харкевич Д.А., 2008; Agrawa A., 2008; Корман Д.Б. и др., 2009, 2014); формирование множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – приобретение опухолевыми клетками перекрестной резистентности к цитостатикам с разными механизмами действия и внутриклеточными мишеням (Ставровская А.А., 2000; Zhang L., Lu P., Yan L., 2019). Эти проблемы усугубляют друг друга и значительно снижают эффективность лечения.

Высокая биологическая и токсическая активность современных противоопухолевых средств обусловлена их повреждающим действием не только на опухолевые, но и здоровые клетки (Хабриев Р.У., 2005; Корман Д.Б., 2014). Механизм их действия хорошо изучен: они действуют на клетку на стадии метафазы, разрушают топоизомеразу во время репликации ДНК, после чего клетка гибнет путем некроза. Побочным эффектом механизма действия таких препаратов является развитие интоксикации.

Поэтому актуален поиск противоопухолевых средств нового поколения, позволяющих избегать некроза и вызывать иной путь программированной гибели опухолевой клетки (Xu T., Denton D., Kumar S., 2019; Hseu YC., Huang YC., Thiyagarajan V., 2019).

Потенциальным средством нового поколения могут стать биофлавоноиды с доказанным широким спектром действия, которые вполне могли бы претендовать на роль новых безопасных самостоятельных противоопухолевых средств: установлена их способность усиливать эффективность цитостатической терапии за счет ослабления её токсического действия на здоровые клетки; известна их прямая способность к активации апоптоза в опухолевых клетках (Polier et al., 2011). Однако глубокого исследования морфологических изменений опухолевых клеток и патоморфоза опухоли, а также степени повреждающего действия на нормальные клетки и ткани человека и животных под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов ранее не проводили. Не изучены и механизмы развития клеточной гибели в опухолевой ткани. С нашей точки зрения, такие исследования открыли бы не только перспективу дальнейшего активного скрининга биофлавоноидов как потенциальных противоопухолевых средств, но и новые аспекты фундаментальных исследований механизмов гибели опухолевых клеток.

### **Степень разработанности темы исследования**

На сегодняшний момент в доступной нам литературе имеются единичные работы по морфологическим изменениям в клетках и тканях при воздействии флавоноидов. Так, исследование Даировой Л.М. (1974) было посвящено гистологическим и гистохимическим изменениям в перевитых опухолях крыс при действии препаратов из группы флавоноидов; описаны морфологические изменения в альвеолярном раке печени РС-1 и саркоме 45 при действии флавоноида лейкоэфдина с помощью обзорной окраски и окраски на ДНК и РНК по Браше; отмечено, что лейкоэфдин не оказывает негативного влияния на периферическую кровь и основные паренхиматозные органы. Однако в данной работе не были изучены пролиферативная

активность клеток и способность активировать апоптоз или аутофагию в опухолевых клетках, что необходимо для установления механизма гибели опухолевых клеток под действием биофлавоноидов.

Еще две работы в данной области были выполнены в 2005 г. Башмаковой Т.В. и в 2006 г. Войциким Е.В. и посвящены патоморфологии лимфатического аппарата матки, тонкой и толстой кишки при действии цитостатических препаратов и коррекции биофлавоноидами. В данных работах оценивалось влияние водного экстракта курильского чая (*Pentaphylloides fruticosa*) при совместном применении с цитостатиками на морфологию лимфатического аппарата ЖКТ и матки; установлено, что флавоноиды ускоряют процессы восстановления эпителиальных клеток ЖКТ и защищают клетки лимфоидного аппарата при лечении цитостатиками. Однако влияние экстракта на основные органы детоксикации (печень, почки), миокард, головной мозг, органы репродуктивной системы и непосредственно на гибель опухолевых клеток не изучалось. Следует отметить, что интерес к возможности применения биофлавоноидов в онкологии возрастает сегодня и в международной литературе (Brownson D.M., 2002; Chahar MK, 2011; Angst E., 2013; Sak K., 2015; Czemplik M., 2016).

### **Цель исследования**

Выявить особенности патоморфоза опухолей различного гистогенеза, установить возможные механизмы гибели и резистентности опухолевых клеток в экспериментах на клеточных культурах опухолей человека (*in vitro*) и перевитых опухолях у животных (*in vivo*) под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов (аврана, бессмертника и кукурузы).

### **Задачи исследования**

1. Оценить характер морфологических изменений в культурах неопухолевых (на примере культуры SPEV) и опухолевых клеток (на примере культуры HeLa) в экспериментах *in vitro* под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов.

2. Определить информативные морфологические показатели для оценки патоморфоза опухолевых клеток *in vitro* под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов.

3. Описать морфологические изменения и выявить возможные пути гибели опухолевых клеток на клеточных культурах опухолей человека (аденокарцинома матки HeLa, Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карцинома легкого A549, карцинома простаты PC-3, карцинома толстой кишки HCT-116, карцинома почки A498) под действием флавоноидсодержащих экстрактов.

4. Провести анализ частоты развития апоптоза на клеточных культурах опухолей человека (аденокарцинома матки HeLa, Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карцинома легкого A549, карцинома простаты PC-3, карцинома толстой кишки HCT-116, карцинома почки A498) при воздействии флавоноидсодержащих экстрактов.

5. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установить механизмы развития апоптоза в опухолевых клетках человека (на примере Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat), и перевиваемых опухолей (рака почки РА, печени PC-1 и саркомы 45) под действием флавоноидсодержащего экстракта аврана.

6. Установить роль аутофагии в развитии резистентности и гибели опухолевых клеток человека *in vitro* (на примере культуры рака шейки матки HeLa и карциномы почки A498) и перевитых опухолей *in vivo* (рака почки РА, рак печени PC-1 и саркомы 45) при воздействии флавоноидсодержащего экстракта аврана, а также исследовать *in vitro* возможность преодоления ее развития.

7. Оценить особенности патоморфоза перевитых опухолей различного гистогенеза (рака почки РА, рак печени PC-1 и саркомы 45) у животных, а также изменения степени выраженности пролиферации, ангиогенеза, апоптоза и аутофагии опухолевых клеток под влиянием экстракта аврана с помощью

иммуногистохимических маркеров Ki67, EGFR, VEGF, p53, Bax, Bcl-2, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B.

8. Провести анализ морфологических изменений во внутренних органах лабораторных животных в условиях моделирования опухолевого процесса (рака почки РА, рак печени РС-1 и саркомы 45) в группах с введением экстракта аврана и без его применения.

### **Научная новизна**

Установлено, что морфологические признаки повреждения в виде вакуолизации цитоплазмы, округления формы клеток, кариорексиса, а также гибель  $0,6 \pm 0,5\%$  неопухолевых клеток почки эмбриона свиньи SPEV развиваются при действии экстракта аврана в концентрации 1,5 мг/мл., в отличие от опухолевой культуры HeLa, в которой при той же концентрации описанные морфологические изменения и гибель клеток наблюдаются в  $41,5 \pm 5\%$ .

Впервые в экспериментах на клеточных культурах опухолей человека (Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарцином молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, карцином почки A498, Сакi-1, Sn12с, рака шейки матки HeLa) установлено, что снижение количества опухолевых клеток, их гибель путем некроза или апоптоза, а также появление или блокирование образования аутофагосом зависят от концентрации флавоноидсодержащего экстракта аврана (Патент РФ № 2018105419).

Установлено, что апоптоз в опухолевых клетках Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов бессмертника и аврана реализуется через механизм активации каспаз (каспаза-3).

Выявлены особенности морфологии и экспрессии маркеров ангиогенеза, пролиферации, аутофагии и апоптоза (EGFR, VEGF, Ki67, Bax, Bcl-2, p53, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B) в клетках и тканях перевитых опухолей

животных (рака почки РА, рака печени РС-1 и саркомы 45) в экспериментах *in vivo* без воздействия и после введения экстракта аврана.

Впервые определено, что в основе развития патоморфоза перевиваемых опухолей 2-3 степени (рака почки РА, печени РС-1 и саркомы 45) в 80% наблюдений лежит апоптоз опухолевых клеток, развивающийся под влиянием экстракта аврана (Патент РФ №2519769). Особенностью патоморфоза опухоли мезенхимального происхождения саркомы 45 является разрастание стромы опухоли без признаков предшествующего некроза, а опухоли эпителиального происхождения (рака почки РА) – появление гигантских клеток.

Установлено, что патоморфоз 2-3 степени, развивающийся в перевитых опухолях при применении экстракта аврана, не сопровождается развитием выраженных дистрофических и некротических процессов в паренхиме внутренних органов и веществе головного мозга (Патент РФ № 2578440).

Выявлено, что у самцов белых беспородных крыс с перевитыми опухолями (рака почки РА, печени РС-1 и саркомы 45) к концу эксперимента в 80% случаев происходит увеличение массы тела в среднем на 25% и размеров иммунокомпетентных органов (селезёнки, перибронхиальных и мезентериальных лимфатических узлов) в отличие от группы сравнения.

Определено, что морфологическим критерием и предиктором развития резистентности клеток опухоли (культур рака шейки матки HeLa и карциномы почки A498 и перевитых опухолей рака почки РА, рака печени РС-1 и саркомы 45) к воздействию флавоноидсодержащего экстракта аврана является экспрессия белка LC3B – маркера аутофагии. Также, установлено, что аутофагосомы в опухолевых клетках рака шейки матки HeLa и аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 не образуются при адресной доставке экстракта аврана в клетку за счет его микрокапсулирования.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Установленный факт торможения пролиферации опухолевых клеток за счет их перехода в период покоя G0, блокирование цитопротекторной аутофагии и одновременно активации механизмов апоптотической гибели

объясняет противоопухолевое действие флавоноидсодержащих экстрактов, которое существенно отличается от известного ранее действия противоопухолевых средств, содержащих алкалоиды.

Для определения выраженности патоморфоза в экспериментальной морфологии могут использоваться установленные информативные показатели чувствительности опухолевых клеток к воздействию флавоноидсодержащих экстрактов: активность роста клеток в культуре (соотношение среднего количества клеток в поле зрения при воздействии экстракта к этому же показателю в контроле); доля клеток в состоянии аутофагии от общего числа живых клеток в культуре, а также корреляция процента клеток в аутофагии от общего числа жизнеспособных клеток и доля мертвых клеток от общего числа клеток; индекс пролиферации (соотношение среднего количества живых клеток в поле зрения при воздействии к этому же показателю в контроле), доля клеток на стадии мета- ана- и телофазы митоза от числа живых клеток; впервые предложенный нами показатель апоптотической константы (AC50) – концентрации экстракта, при которой, по сравнению с контролем, за сутки определяется половина клеток с признаками апоптоза, а также среднелетальная концентрация (LC50), при которой наблюдается 50% гибель клеток от числа клеток в контроле.

Критерием низкой чувствительности опухолей к воздействию флавоноидсодержащих экстрактов является появление в опухолевых клетках аутофагосом; одним из путей предупреждения развития цитопротекторной аутофагии является адресная доставка экстракта в клетку за счет его микрокапсулирования.

Применение иммуногистохимического маркера аутофагии LC3B при оценке патоморфоза опухоли позволяет выявить случаи с началом развития резистентности и провести адекватную оценку ответа опухоли на лечение.

Примененный в работе комплексный подход с использованием широкого набора морфологических методов исследования позволяет выявить

особенности лечебного патоморфоза опухолей различного гистогенеза в экспериментах *in vivo* под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов.

### **Методология и методы исследования**

Методология работы построена на совокупности экспериментальных и аналитических методов и на системном и комплексном анализе имеющихся и полученных данных. Методы, использованные в работе: культуральный метод, флуоресцентные методы окраски, методы проточной цитофлуориметрии, электронной микроскопии, морфологические, морфометрические методы, включая гистохимические (Pas-reaction, WGA, окраска ОКГ, окраска ДНК и РНК по Браше) и иммуногистохимические маркеры: Ki67, EGFR, VEGF, p53, Bax, Bcl-2, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B, статистическая обработка результатов.

Для изучения гибели опухолевых клеток использованы разные группы биофлавоноидов: флавононы (экстракт бессмертника песчаного), флавонолы (экстракт аврана лекарственного), антоцианы (экстракты антоциановой формы кукурузы обыкновенной).

Объекты исследования – культуры клеток: SPEV – культура эпителиальных клеток почки эмбриона свиньи; HeLa – рак шейки матки; SK-BR-3, MCF-7 – аденокарцинома молочной железы; Jurkat – Т-клеточный лимфобластный лейкоз; A549 – карцинома легкого; PC-3 – карцинома простаты; HCT-116 – карцинома толстой кишки; A498, Caki и Sn12c – карциномы почки; – ткани перевиваемых опухолей (саркомы 45, рака почки РА и рака печени PC-1); внутренних органов и головного мозга, фиксированных в 10% растворе забуференного нейтрального формалина и залитых в парафиновые блоки.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Замедление темпов роста перевитых опухолей разного гистогенеза (рак печени PC-1, рак почки РА и саркома 45) и развитие патоморфоза опухоли 2-3-й степени, снижение пролиферации за счет перехода клеток в период G0, снижение ангиогенеза, блокирование аутофагии и активация апоптоза в

клетках опухолей животных, подтвержденное иммуногистохимическими методами исследования с маркерами EGFR, Ki67, VEGF, Bax, Bcl-2, p53, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B, обусловлены реализацией противоопухолевого эффекта экстракта аврана.

2. Активация апоптоза в опухолевых клетках перевитых опухолей животных (рака печени PC-1, почки РА и саркомы 45) под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов происходит как за счет внешнего, так и митохондриального путей, а реализация – через активацию каспазы-3.

3. Аутофагия, развивающаяся в опухолевых клетках культур рака шейки матки человека HeLa, рака почки человека A498 и перевитых опухолей животных: рака печени PC-1, почки РА и саркомы 45 под действием флавоноидсодержащих экстракта аврана, имеет цитопротекторный характер и в данном случае не является механизмом клеточной гибели.

4. Полученные с помощью цитологических, морфологических и молекулярно-генетических методов исследования результаты позволяют считать появление аутофагосом в опухолевых клетках культур рака шейки матки человека HeLa, рака почки человека A498 и перевитых опухолей животных: рака печени PC-1, почки РА и саркомы 45 морфологическим маркером проявления резистентности опухоли на воздействие экстракта аврана, обладающего противоопухолевым эффектом.

### **Личный вклад автора**

Автор лично участвовал во всех этапах исследования: от постановки задач до обсуждения результатов.

Автором непосредственно выполнены эксперименты *in vitro* и *in vivo*, а также произведен забор аутопсийного материала; выполнен комплексный анализ полученных результатов гистологического, морфометрического и иммуногистохимического методов исследования. Осуществлен подбор и анализ наиболее подходящих цитологических характеристик клеток в как *in vitro* экспериментах, так и в ткани перевиваемых опухолей, внутренних органах, выполнен аналитический и статистический анализ полученных

результатов; сформулированы научное обоснование и выводы. Автором лично были написаны и оформлены тезисы, статьи и патенты к публикации.

Приношу свою благодарность за консультативную помощь в трактовке результатов по клеточным культурам сотрудникам ИБФРМ РАН д.б.н. В.А. Богатыреву, к.б.н. А.А. Широкову и сотрудникам НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина д.м.н., проф. А.Ю. Барышникову, к. фарм. н. М.А. Барышниковой, к.б.н. Д.А. Хоченкову, д.м.н. Е.В. Степановой, а также за создание адресных способов доставки экстрактов и их испытания сотрудникам Лаборатории дистанционно управляемых систем для тераностики СГУ им. Н.Г. Чернышевского д.ф.-м.н. Г.Б. Сухорукову; д.х.н. Д.А. Горину, к.ф.-м.н. М.В. Ломовой; сотрудникам СГМУ им. В.И. Разумовского к.б.н. А.Б. Бучарской, асс. Д.А. Мудрак, лаборанту А.М. Мыльникову и научным руководителям д.м.н., проф. Г.Н. Масляковой и д.б.н., проф. Полуконовой Н.В.

### **Внедрение результатов исследования**

Полученные результаты внедрены в учебный процесс кафедры патологической анатомии и научную работу Центра коллективного пользования НИИ Фундаментальной и клинической уронефрологии ФГБОУ ВО СГМУ им. В.И. Разумовского, а также в учебный процесс кафедры патологии животных СГАУ им. Н.И. Вавилова; в Международном научно-образовательном центре оптических технологий в промышленности и медицине «Фотоника» ФГБОУ ВО СГУ им. Н.Г. Чернышевского, Центре коллективного пользования ФГБУН ИБФРМ РАН.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность описанных результатов в диссертационном исследовании, сделанных выводов, обсуждений и заключения подтверждается:

1. Соответствием выполненной работы биоэтическим требованиям при работе с лабораторными животными, корректно проведенным обоснованием объема опытных и контрольных групп.

2. Объемом использованного в работе материала: 220 лабораторных крыс, 11 штаммов клеточных культур, 3 штамма перевиваемых опухолей различного гистогенеза, гистологические блоки – 2154 шт., гистологические микропрепараты – 3558 шт., микрофотографии гистологических препаратов – 583 шт., микрофотографии клеточных культур – 4123 шт., электронограммы – 25 шт.

3. Высоким научно-методическим уровнем с применением традиционных и современных гистологических, морфометрических, иммуногистохимических и культуральных методов исследования с использованием современного научного оборудования исследовательского класса (проточный цитофлуориметр, флуоресцентный, конфокальный и электронный микроскопы, микровизор медицинский).

4. Применением адекватных в каждом случае статистических методов (параметрических и непараметрических).

Результаты исследований докладывались и обсуждались на следующих конференциях: International Conference «Renewable Wood and Plant Resources: Chemistry, Technology, Pharmacology, Medicine» (Санкт-Петербург, 2011); VIII Всероссийской Бурденковской студенческой научной конференции (Воронеж, 2012); I-III Всероссийских неделях науки с международным участием (Саратов, 2012-2014); VII и VIII Саратовских салонах изобретений, инноваций и инвестиций «Модернизация, инновации, инвестиции» (Саратов, 2012, 2013); VII-XI Международных (XVI- XX Всероссийских) Пироговских научных медицинских конференциях студентов и молодых ученых (Москва, 2012-2017); X, XII и XIII Всероссийских научно-практических конференциях «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 2013; Москва, 2015, 2016); VIII и IX Съездах онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Казань, 2014; Минск, 2016); Всероссийской конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования в онкологии» (Ростов-на-Дону, 2015); Общероссийских научно-практических мероприятиях «Эстафета вузовской науки» (Москва, 2014, 2015); «Saratov Fall Meeting - 2014, 2015»: International

Symposium Optics and Biophotonics-III (Saratov, 2014, 2015); Всероссийских инновационных конвентах (Москва, 2013, 2015); The 43rd Annual meeting of the international society on oxygen transport to tissue “ISOTT-2015» (Wuhan, China, 2015); *In Vitro to In Vivo* Extrapolation for High Throughput Prioritization and Decision Making (North Carolina, USA, 2016); XXI РОССИЙСКОМ ОНКОЛОГИЧЕСКОМ КОНГРЕССЕ (Москва, 2017 г.); конференции «Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно-технологического развития страны» (Самара, 2017); Российско-Китайском конгрессе по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (XX КАШКИНСКИЕ ЧТЕНИЯ) (Санкт-Петербург, 2017 г.); International Symposium Optics and Biophotonics-V 21st International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics (Saratov, 2017 г.); XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017 г.); Конференции «Актуальные вопросы фундаментальной, экспериментальной и клинической морфологии» (Рязань, 2017 г.); Международном Сеченовском международном биомедицинском саммите (Москва, 2017); Всероссийской молодежной медицинской конференции с международным участием «Алмазовские чтения – 2018» (Санкт-Петербург, 2018 г.); X Съезде онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Сочи, 2018 г.); XXII Российском онкологическом конгрессе (Москва, 2018 г.); International conference biomembranes (Moscow, 2018 г.); 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research (Tomsk, 2018), VII Съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2019).

### **Публикации результатов работы**

По теме диссертации опубликовано 58 публикаций, в том числе 26 работ, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, в которых должны быть

опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, по научным специальностям и соответствующим им отраслям науки; 16 публикаций в зарубежных изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science; получено 6 патентов на изобретение и подана 1 заявка на изобретение. Опубликовано глава в зарубежной монографии издательства Elsevier. Общий объем публикаций составляет 20,14 печатных листов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Материал изложен на 268 страницах печатного текста, содержит 34 таблицы и иллюстрирован 120 рисунками, содержащими 234 микрофотографии, 4 электронограммы и 55 графиков. Указатель литературы содержит 355 источника, из них 88 отечественных и 267 зарубежных публикаций.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Патоморфоз: история, терминология, морфологические аспекты

Понятие и термин «патоморфоз» были введены около 80 лет назад и уточнены в 1956 г. немецким морфологом W. Doeber, а в советской литературе – Я.Л. Рапопортом в 1962 г. В клиническом (узком) смысле «патоморфоз» – существенное и стойкое изменение характера болезни (свойств и проявлений) под влиянием лечебных и профилактических факторов.

«Онкоморфоз» в терминологии Я.Л. Рапопорта подразумевает частную разновидность общего понятия, касающегося новообразований. В широком смысле «онкоморфоз» – это изменение заболеваемости и смертности людей под влиянием социальных, демографических, медицинских, экологических и других факторов. Этот аспект онкоморфоза раскрывают статистика и эпидемиология новообразований (Stewart B.W., Kleihues P., 2008; Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2012).

Лечебный (терапевтический) патоморфоз новообразований – предмет теории и практики онкологов и патологоанатомов. Анализ литературы показывает, что не все понятия в терминологии по данному вопросу однозначны. Ни в одном из доступных нам учебных пособий по онкологии и патологической анатомии в предметных указателях термин «патоморфоз опухолей» не встречается. Только в первом томе руководства «Патологоанатомическая диагностика опухолей человека» (Краевский Н.А., Смольяников А.В., Саркисов Д.С., 1993) представлен раздел по патоморфозу новообразований. Анализ зарубежной литературы показывает, что там термин «патоморфоз» не используется. Чаще всего пишут о продолжительности и качестве жизни больного при лечении, об ответе опухоли на лечение, о радио- и химиотоксичности терапии, а также о регрессии опухоли. Существует также ограниченность термина «регрессия опухоли» в отношении патоморфоза, поскольку в процессе лечения происходят не только деструктивные биологические явления, но и процессы восстановления, воспаления, фиброза и склероза, деформации органов-

опухоленосителей, не говоря уже о повреждении нормальных органов и тканей.

**Методы выявления патоморфоза.** Явление и процесс патоморфоза определяют теми же методами, которыми диагностируют болезнь в онкологии: клиническими, морфологическими, радиологическими, эндоскопическими, лабораторными и др. (Краевский Н.А., 1976; Лушников Е.Ф., 1977; Серов В.В., 1999; Цыб А.Ф., 2010; Силантьева Н.К., Агабабян Т.А., 2011). Каждый из описанных методов имеет пределы своих возможностей, поэтому оптимальной является комплексная диагностика. При исследовании биопсийного, операционного и секционного материала проводится морфологическая оценка патоморфоза как в клинической практике, так и в научных исследованиях. Морфологическому методу уделяют основное внимание в клинической практике для оценки эффективности лечения (Julka P.K., Doval D.C., Gupta S., 2008). В фундаментальной науке – это проблема биологии опухолевой клетки и опухолевого роста, взаимоотношения опухоли и организма с различными внешними факторами. Не менее важно и другое фундаментальное значение – установление механизмов действия лекарственных средств на мишени разных структурных уровней организма, как в клетках опухоли, так и вне ее. Проблемы сформулированы давно, их решениями занимаются научные коллективы многих стран мира, имеются существенные достижения, но, судя по результатам диагностики и лечения злокачественных новообразований, многие вопросы остаются открытыми до настоящего времени (Ogston K.N., Miller I.D., 2003).

Наиболее современным и точным способом оценки лечебного патоморфоза считается применение иммуногистохимического исследования (Мозеров С.А., Комин Ю.А. и др., 2016). Данный вид исследования позволяет изучить особенности опухоли до начала лечения, подобрать таргетную терапию и определить прогноз. Предполагается, что изменение содержания различных маркеров в резецированных тканях после лечения позволяет более точно оценить степень патоморфоза и определить прогноз, а также скорректировать тактику ведения пациента (Moreno Garcia V., Cejas P., Feliu J. et al., 2009). Считается, что необходимо определять набор маркеров,

наиболее информативных для оценки патоморфоза каждой конкретной опухоли (McCormick Matthews L.H., Noble F., Tod J. et al., 2015). Однако имеются маркеры, характерные для большинства опухолей – это белки клеточной пролиферации (Ki-67, PCNA, EGFR, CyclinD1, COX-2), апоптоза (Bax, bcl-2, p53), клеточной адгезии (Е-кадгерин) и ангиогенеза (VEGF) (Zaporozhnan V.N., Lukyanchuk O.V., Rocha L.G., 2015).

В экспериментах *in vitro* на клеточных культурах для оценки патоморфоза накопилось большое количество современных методов, которые позволяют определить развивающийся вид программируемой клеточной гибели (ПКГ) и механизм его реализации под влиянием различных веществ. Ряд методов дает возможность установить и изменение морфологии клеток (Скибо Ю.В., Абрамова З.И., 2011).

Все методы морфологической идентификации ПКГ на клеточных культурах в экспериментах *in vitro* можно подразделить на следующие группы: рутинное свето-микроскопическое исследование с использованием обычных методов фиксации и окрашивания или способов, селективно выявляющих пикнотизированный хроматин; флуоресцентно-микроскопическое исследование с использованием флюорохромов, включая и проточную цитофотометрию; электронно-микроскопические методы: трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия: выявление олигонуклеосомной деградации ДНК *in situ* и иммуногистохимическое выявление белков-маркеров, участвующих в запуске ПКГ (Скибо Ю.В., Абрамова З.И., 2011; Polukonova N.V., Navolokin N.A., 2017, 2018).

Флуоресцентные методы исследования обладают одним из самых широких спектров возможностей в клеточной биологии. Признаком ПКГ при использовании флуоресцентной микроскопии служит обнаружение ярко светящегося конденсированного хроматина. Для оценки количества живых, апоптотических и некротических клеток используют метод, основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток аннексином V и йодистым пропидием. Аннексин V специфично и с высокой аффинностью связывается с фосфатидилсерином, который появляется на поверхности апоптотических и

некротических клеток; йодистый пропидий проникает только в клетки с повреждённой мембраной. Апоптотические клетки окрашиваются только аннексином V, поскольку они сохраняют целостность мембраны на ранних стадиях апоптоза, в то время как некротические клетки окрашиваются обоими реагентами (Скибо Ю.В., Абрамова З.И., 2011). Кроме того, используя смесь йодидистого пропидия и акридинового оранжевого в условиях витальной окраски, можно производить выявление и количественный учет живых, некротизированных и подвергающихся апоптозу клеток и, кроме того, выявлять наличие аутофагосом. Для повышения достоверности получаемых данных прибегают к использованию нескольких методических приемов, основанных на различных подходах (Наволокин Н.А., 2019).

***Критерии лечебного патоморфоза новообразований.*** Существует огромное количество критериев патоморфоза, которые позволяют в различных аспектах определить особенности болезни как в процессе, так и после окончания лечения (Lester S.C., 2010). Критерии лечебного патоморфоза новообразований как нозологических форм разрабатываются по нескольким направлениям разными специалистами. Оценивают непосредственные эффекты, ближайшие и отдаленные результаты лечения.

Многочисленные биологические критерии оценки эффективности лечения: морфологические, физиологические, биохимические, генетические и другие показывают состояние различных мишеней организма, на которые было направлено лечебное воздействие. Это не только клетки опухоли и их популяции, но и особенности кровоснабжения органа и опухоли, состояние системы противоопухолевой резистентности и в первую очередь иммунной реактивности организма. Н.А. Краевский в 1976 году отметил, что в наиболее демонстративной и конкретной форме явления патоморфоза могут быть показаны при помощи морфологических методов исследования. Это мнение остается справедливым и сейчас, несмотря на громадный скачок развития в методах лучевой диагностики (Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю., Габай В.Л., Саенко А.С., Доросевич А.Е., 2001; Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю., 2014).

Я.Л. Рапопорт (1962) считал, что патоморфоз включает в себя две категории явлений: 1) общие неспецифические дистрофические и атрофические процессы, ведущие к регрессии опухолевой ткани любого гистогенеза; 2) органоспецифические, характерные для опухоли данного органа и способа лечебного воздействия. Второй подход, по мнению многих авторов, более реалистичен, так как в процессе развития патоморфоза сочетаются повреждение (дистрофии) и гибель клеток (апоптоз, некроз, аутофагия), восстановительные явления клеточного и тканевого уровней, воспаление и склероз. Однако сочетание и доля этих явлений в развитии процесса неодинакова как в разных новообразованиях, так и при различных методах лечения. Количественные гистологические критерии патоморфоза чаще всего выражают степень повреждения опухоли в баллах или в процентах некроза паренхимы. В нашей стране предпочитают использовать классификацию патоморфоза, разработанную в Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена (Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю., 2013).

Для определения степени повреждения солидных опухолей разных локализаций и гистологических форм после курсов лечения в качестве основного регистрируемого эффекта предложено учитывать изменения общей структуры опухолей, а в качестве вспомогательных критериев – степень изменений клеток. Выделено четыре степени повреждения: 1) общая структура сохранена; 2) общая структура изменена: очаговое «исчезновение» паренхимы (для большинства опухолей с неравномерным увеличением стромы, для некоторых – увеличение некрозов); 3) общая структура резко нарушена: паренхима в виде разрозненных групп опухолевых клеток среди фиброзной основы или некроза; 4) полное исчезновение клеточных элементов паренхимы опухолей или специфические для ряда опухолей ее «следы» (роговые массы, костные балки и др.).

В иностранной литературе существует много классификаций степеней повреждения опухолей, отличительные признаки которых разнообразны даже в одной схеме (Julka P.K., Doval D.C., Gupta S., Rath G.K., 2008.). Зарубежные коллеги не используют термин «патоморфоз» и употребляют термин «ответ

опухоли на терапию» (полный или частичный ответ, гистологический, биохимический ответ). Оценку «ответа опухоли» проводят субъективно – «глазомерно». Примером служит результат работы Международной исследовательской группы по изучению классификации степеней регрессии рака прямой кишки при неoadъювантной химиолучевой терапии (Chetty R., Gill P., Govender D. et al., 2012). Семнадцать патологов из восьми стран оценивали степень патоморфоза по трем классификациям –

A. Mandart (Mandart A., Dalibard F., Mandart J. et al., 1994), O. Dworak (Dworak O., Keilholz L., Hoffmann A., 1997) и модифицированной. Результаты свидетельствовали о весьма малом уровне конкордантности по этим классификациям со значениями коэффициента 0,28, 0,35 и 0,38, соответственно. Только в одном из 10 случаев было полное соответствие при использовании модифицированной классификации степени регрессии рака. Поэтому необходимость разработки простой, воспроизводимой системы классификации степеней регрессии опухоли с четкими критериями до сих пор остается актуальной.

Анализ литературы в области установления степени патоморфоза различных новообразований и при разных методах лечения показывает, что согласие между патологоанатомами существует в оценке крайних случаев – нет регрессии (I степень) и полная регрессия (IV степень), тогда как в классификации II и III степеней расхождения значительны. Эти расхождения имеют объективную основу в виде качества морфологического исследования (биопсия до лечения, сколько кусочков опухоли исследовано, из каких отделов, какие использованы методы обработки материала) и смешанных оснований классификации (какой отличительный признак патоморфоза – повреждение опухоли, воспаление, фиброз). Субъективизм исследования определяется также выбором методов оценки, опытом патологоанатома, характером заключения.

Существуют и другие факторы, усложняющие объективность, так, рак молочной железы, считавшийся ранее одной нозологической формой, в настоящее время определен как групповое понятие с выделением биологических, молекулярно-биологических подтипов. Тройной негативный

базальноклеточный рак (не имеет рецепторов эстрогена, прогестерона, эпидермального фактора роста HER2) не только неоднородный по морфологии и генетике, но неоднородный и к терапевтическому воздействию (Kraus J.A., Berival S., Dabbs D.J., Ahrendt G.M., McGuire K.P., Johnson R.R. et al., 2012).

То же можно сказать и про рак желудка, который стал групповым понятием и имеет различные морфологические типы и молекулярно-биологические подтипы, в частности, гиперэкспрессию белка HER-2/neu или амплификацию гена HER2, знание об экспрессии, которых необходимо для назначения таргетной терапии (Завалишина Л.Э., Андреева Ю.Ю., Франк Г.А., 2012). Существует и широко обсуждается проблема корреляции между морфологическими изменениями опухоли и другими клиническими методами диагностики. Для изучения различных аспектов молекулярно-генетических маркеров ответа при лучевой терапии создан генетический проект прогнозирования эффектов облучения, результаты работы которого в разных странах представлены в обзоре С.Д. Иванова (2011).

***Механизмы лечебного патоморфоза.*** Механизмы патоморфоза классифицируют по нескольким принципам: механизму действия лечебного фактора (повреждение ДНК, подавление синтеза белков, переключение внутриклеточных путей сигнализации др.), объекту действия (молекулярные, клеточные, тканевые, органые, организменные), характеру ответной реакции организма и опухоли на лечение (повреждение клеток, тканей, сосудов; некроз и апоптоз клеток, воспаление, склероз и др.). Характер и длительность процесса могут быть обусловлены как особенностями организма больного, так и действующими факторами.

Отсутствие во многих случаях прямой и линейной зависимости между дозой (излучения, лекарственного средства) и эффектом лечения требует знаний о механизмах действия лечебных факторов и о том, что происходит с самими клетками, поэтому невозможно объективно изучать эффективность препаратов только с помощью клинических методов или в эксперименте с помощью фармакологических методов (LC10, LC50, LC80, поиск

эффективной дозы, биораспределение и биодоступность и др.) (Белоусов, Ю.Б. , 2015; Цыб А.Ф., 2010).

Как видно даже из краткого описания имеющейся литературы, механизмы патоморфоза разнокачественные, разновременные, и сложность заключается в определении удельного веса каждого явления в общем процессе, что требует взаимодействия разных специалистов, включая морфологов. Даже при отсутствии у изучаемых препаратов в скрининге значительного снижения темпов роста опухоли, при морфологическом исследовании можно обнаружить выраженные изменения, что позволит скорректировать дозу исследуемого агента или дизайн исследования (продолжительность, кратность, путь введения) и получить положительный результат. С другой стороны, важно понимать, что происходит с опухолью: погибает она за счет развития некроза (сопровождаясь высокой интоксикацией) или путем апоптоза; развивается в ней склероз или резистентность. Большинство работ, посвященных патоморфозу, описывают изменения, развивающиеся в опухолях при воздействии цитостатической терапии.

В доступной нам литературе мы нашли лишь несколько работ, описывающих патоморфоз опухолей под влиянием биофлавоноидов. Работа Л.М. Даировой (1974 г.) посвящена гистологическим и гистохимическим изменениям в перевитых опухолях крыс при действии препарата лейкоэфдина из группы флавоноидов. В данной работе описаны морфологические изменения в альвеолярном раке печени РС-1 и саркоме 45 при действии лейкоэфдина с помощью обзорной окраски (гематоксилин и эозин) и окраски на ДНК и РНК по Браше. Было установлено, что флавоноиды способны оказывать негативное воздействие на клетки опухоли, вызывая атрофические, некробиотические и дистрофические изменения, снижение количества РНК в клетках. Также отмечено, что лейкоэфдин не оказывает негативного влияния на периферическую кровь и основные паренхиматозные органы. Однако в данной работе не были изучены пролиферативная активность клеток и способность флавоноидов вызывать активацию апоптоза или аутофагии в опухолевых клетках, что является весьма важным для установления

механизма их гибели. Еще одна работа в данной области была выполнена в 2006 году Е.В. Войцицким и посвящена морфологии лимфоидного аппарата матки, тонкой и толстой кишки при воздействии цитостатических препаратов и коррекции биофлавоноидами. В данной работе оценивалось влияние водного экстракта курильского чая (*Pentaphylloides fruticosa*) при совместном применении с цитостатиками на морфологию внутренних органов. Было установлено, что флавоноиды ускоряют процессы восстановления эпителиальных клеток ЖКТ и защищают клетки лимфоидного аппарата при лечении цитостатиками. Однако влияние флавоноидов на основные органы детоксикации (печень, почки), миокард, головной мозг и органы репродуктивной системы не изучалось.

Таким образом, возможности морфологических методов диагностики позволяют совершенно на другом уровне изучать вновь создаваемые лекарственные средства, определять их взаимодействия с клетками, выявлять мишени воздействия препаратов и оценивать влияние тех или иных лекарственных препаратов как непосредственно на клетки опухоли, так и другие органы, и ткани, а также оценивать их перспективность и целесообразность дальнейшего применения (Beyer L.A., 2011).

## **1.2. Программируемая клеточная гибель (ПКГ) как механизм действия противоопухолевых препаратов нового поколения**

Развитие современной противоопухолевой химиотерапии неразрывно связано с формированием представлений о программируемой клеточной гибели (ПКГ) как основном механизме элиминации из организма клеток как в норме, так и при различных патологических процессах (Корман Д.Б., 2012). В клеточной биологии, иммунологии и медицине научные разработки последних 30 лет способствовали открытию новых типов ПКГ, управляемых за счет общих и специфических сигнальных путей и реализующихся под влиянием различных факторов. О важнейшем значении этих исследований свидетельствует тот факт, что в 2002 г. S. Brenner, J. Sulston и R. Horvitz, внесшие решающий вклад в развитие современных представлений об апоптозе, были удостоены Нобелевской премии за цикл работ, объединенных

названием «Генетическая регуляция органного развития и программируемой клеточной гибели» (Thompson C. B., 1995; Lendahl U., Orrenius S., 2002).

Согласно последней классификации 2012 г. существуют 12 видов ПКГ (четыре основных и восемь дополнительных) (Galluzzi L. et al., 2012). Самыми распространенными и наиболее встречающимися видами запрограммированной гибели клетки являются апоптоз, аутофагия, кератинизация и некроз. Среди редко встречающихся известны такие, как аноиксис, параптоз, пироптоз, пиронекроз, энтоз, валлеровское перерождение (вторичная дегенерация нервных волокон).

Конечным эффектом положительного действия противоопухолевых средств с разными механизмами действия на различные мишени считается включение апоптотической гибели опухолевых клеток. Индуцированный апоптоз – важный механизм действия разных методов лечения злокачественных опухолей. Прямое воздействие на механизмы апоптоза считается перспективным направлением создания новых эффективных противоопухолевых препаратов. Воздействие на механизмы апоптоза, с одной стороны, может выражаться в селективной индукции апоптоза в опухолевых клетках с помощью различных химических, биологических и других веществ, а с другой – защите от апоптоза в клетках нормальных тканей при проведении противоопухолевой терапии (Kleijnen J., 1994).

При нормальных физиологических состояниях неопухолевые клетки на определенном этапе развития погибают (Janssen O., Scheffler A., 1993), на основе чего возникло представление о генетическом механизме для совершения акта самоуничтожения. До начала 1970-х гг. единственным способом гибели клеток считали некроз как результат острого повреждения (Пупышев А.Б., 2014). В 1972 г. J. Kerr с соавторами описали ранее неизвестный процесс, которому они дали название «апоптоз» (от греческого «отпадающий»). При гистологическом исследовании нормальных тканей авторами были выявлены гибнущие клетки с характерными структурными

изменениями, отличающимися от некроза (Kerr Y.E., Willie A.H., Currie A.R., 1972, 1984).

Было доказано, что апоптоз – нормальный механизм в процессе эмбриогенеза, развития, инволюции, клеточного гомеостаза, морфогенеза, атрофии, дифференцировки и др. Ежедневно в организме человека посредством апоптоза погибает около 100 млрд. клеток, что за 1,5-2 года составит массу тела взрослого человека (Райхлин Н.Т. и др., 2002).

Различные нарушения апоптоза, проявляющиеся его стимулированием или ингибированием, лежат в основе развития многих патологических процессов, в частности, злокачественных опухолей (Thompson C.B., 1993).

Апоптоз может активироваться различными сигналами, как физиологическими – экспрессией специальных киллерных цитокинов, изменением гормонального статуса, так и нефизиологическими – различными внутриклеточными повреждениями или неблагоприятными условиями (повреждение ДНК, гипоксия и др.). К числу таких нефизиологических сигналов относятся повреждения, вызываемые в клетке в результате действия противоопухолевых агентов (Spelman, K., 2006; Senchina D.S., 2009).

Апоптоз происходит последовательно и состоит из двух основных этапов: фазы индукции и фазы реализации (Копнин Б.П., 2002).

Запуск программы апоптоза может осуществляться тремя путями. Один из них – рецепторный – начинается со связывания так называемого «рецептора смерти» (Fas-рецептор), представляющего собой трансмембранный протеин поверхностной мембраны клетки, с разнообразными специфическими киллерными лигандами (Fas-ligand, фактор некроза опухоли- $\alpha$  и др.) или с агентами, инициирующими повреждения (токсины, вирусы, лекарственные препараты, в частности цисплатин, антибиотики и др.). Взаимодействие FasL с FasR способствует образованию кластеров рецепторных молекул и связыванию их внутриклеточных участков с адаптерными молекулами, FADD. Через адаптер к комплексу лиганд/рецептор присоединяются эффекторы – молекулы неактивных предшественников инициирующих каспаз –

прокаспазы-8, что опосредуется при взаимодействии DED доменов FADD и прокаспазы-8 (Vaugh D.L., 1996). В результате формируется молекулярный комплекс DISC, в котором происходит активация каспаз (Werner A.B., 2002; Zhang X., 2005).

В результате связывания «рецептора смерти» с лигандом в клетке начинается каскад реакций, ведущий к активации каспаз – белков семейства цистеиновых протеаз, расщепляющих различные ключевые внутриклеточные субстраты, в частности ингибиторы нуклеаз, ядерные и цитоскелетные белки, мембранные белки и др., что ведет к фрагментации ядра и деструкции клетки. Повышение экспрессии Fas на мембране нестимулированных лимфоцитов увеличивает их выход в апоптоз (Корман Д.Б., 2016).

С биохимической точки зрения апоптоз определяется как каспаза-зависимый вариант ПКГ. Другие события, обычно связанные с апоптозом, такие как воздействие фосфатидилсерина на наружный слой плазматической мембраны, менее универсальны и более зависимы от сопутствующих факторов (Lettre G., 2006; Mellen M.A., 2008, 2009; Kenis H., 2010; Galluzzi L., 2012; Segawa K., 2014).

Такие органоиды, как плазматическая мембрана и митохондрии, являются важным и неотъемлемым звеном инициации апоптоза (Chen Y.B., Wang G.X., 2002; Thompson C.B., 2004). Индукция проапоптотических белков и дальнейшая активация апоптоза начинаются с запуска каспаз (цистеиновых протеаз) (Chen Y.B., Wang G.X., 2002).

Сначала в клетке при апоптозе происходит активация прокаспазы-8, что ведет к активации эффекторных каспаз-3,-6,-7, действие которых приводит к появлению морфологических изменений, характерных для апоптотической клетки (Копнин Б.П., 2002).

В другом пути индукции апоптоза главную роль играют митохондрии. Такой механизм может индуцироваться как сигналами апоптоза, так и различными повреждениями клетки, и начинается с увеличения проницаемости митохондриальной мембраны под действием активированной

каспазы-8. В результате в цитоплазму выходит ряд митохондриальных белков, в частности цитохром С, который активирует прокаспазу-9, а затем эффекторную каспазу-3, которая является прототипом каспазы «палача», она расщепляет ключевую группу белков, нарушая структурную и биоэнергетическую целостность клетки (Abbruzzese J. L, Grunewald R., Weeks E., 1991, Копнин Б.П., 2002; Galluzzi L. et al., 2012).

Увеличение проницаемости митохондриальной мембраны происходит под влиянием белков семейства Bcl-2, подразделяющихся на несколько подвидов. В настоящее время насчитывается 16 членов этого семейства, обладающих либо проапоптотической, либо антиапоптотической активностью (Chipuk, J.E., 2008; Hardwick J.M., 2012).

К антиапоптотическим белкам относятся Bcl-2, Bcl-x и др., локализующиеся на наружной мембране митохондрий и закрывающие каналы, через которые происходит выброс цитохрома С и белка AIF. К проапоптотическим белкам относятся Bax, Bad и др., находящиеся в цитоплазме (цитозоле) и перемещающиеся при апоптотических сигналах в митохондриальную мембрану, где, взаимодействуя с интегральным белком наружной митохондриальной мембраны VDAC, стимулируют открытие каналов, через которые секретируются цитохром С и белок AIF. (Chipuk J.E., 2008; Kim H., 2009). Кроме того, белок Bax может образовывать комплексы с антиапоптотическими белками Bcl-2, Bcl-x, что также, возможно, открывает закрытые до этого каналы (Willis S.N., 2009).

В апоптотической гибели выделяют два основных механизма реализации: каспазный и некаспазный (Wang et al., 2002). Некаспазный путь отличается тем, что флавопротеин AIF и эндонуклеазы G выходят из митохондрий и перемещаются в ядро клетки, где приводят к разрушению ДНК ядра на крупные фрагменты.

Мутация гена p53 и связанное с этим подавление апоптоза – самое частое генетическое нарушение, которое находят в различных раковых опухолях. Гиперэкспрессия мутантного гена p53 в злокачественных опухолях

обычно коррелирует с более агрессивным течением опухолевого процесса и плохим прогнозом, а также может быть одной из причин множественной лекарственной устойчивости опухоли (Райхлин Н.Т., Райхлин А.Н., 2002; Cho К.Н., 2004).

Из всех видов ПКГ интерес представляет также аутофагия, так как она может привести не только к гибели клеток, но и, наоборот, к выживанию клеток при частичной аутофагии опухолевых клеток, что служит механизмом формирования резистентности опухолей при проведении химиотерапии. Однако однозначного мнения по этому вопросу не существует, есть работы, подтверждающие, что химиотерапия может стимулировать аутофагию в раковых клетках и подавлять рост опухолей. Например, триоксид мышьяка блокирует сигнальный путь mTOR и тем самым активирует аутофагию, что было установлено при остром промиелоцитарном лейкозе (Qian W., Liu J., 2007; Charoensuk V., Gati W.P., 2009; Goussetis D.J., Altman J.K., 2010).

S. Turcotte и соавторы показали, что новый препарат STF-62247 вызывает массивное образование вакуолей в клетках рака почки и приводит к их гибели посредством аутофагии (Turcotte S., Chan D.A. et al, 2008).

Очень важным и интересным вопросом является то, в каких фазах клеточного цикла возможно развитие смерти клетки. Известен факт о том, что смерть клетки за счет развития в ней аутофагии может произойти только в неделящихся клетках (G0-фаза и окончательная дифференцировка), в то время как апоптоз может начинаться в любых фазах клеточного цикла, даже во время митотического деления, и заканчиваться митотической катастрофой. Но если в делящихся клетках ингибирован запуск апоптоза, например, инактивированы каспазы, то смерть делящихся клеток происходит по пути программированного некроза (Edinger A.Z., Thompson C., 2004).

В 2016 году Ёсинори Осуми (Yoshinori Ohsumi) за открытие механизмов аутофагии была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Осуми открыл 15 генов, которые необходимы для активации аутофагии в эукариотических клетках. Он назвал гены ATG 1-15. Поскольку новые гены

аутофагии были идентифицированы у дрожжей, а затем и других организмов, была принята унифицированная система номенклатуры генов с использованием аббревиатуры ATG (Klionsky D.J., 2003; Dokladny K., 2013; Li C., 2019).

Осуми клонировал несколько ATG генов 22-24 и охарактеризовал функцию их белковых продуктов. Клонирование гена ATG1 показало, что он кодирует серин / треонинкиназу, демонстрируя роль фосфорилирования белка в аутофагии (Kamada, Y., 2000; Zhi X., 2018; Breining S.P., 2019; Tian L., 2019; Chen S., 2019; Tang Y., 2019; Onoe-Takahashi A., 2019; Sun J., 2019).

Дополнительные исследования показали, что ATG1 образует комплекс с продуктом гена ATG13 и что это взаимодействие регулируется действием рапамицин киназы (Ohsumi Y., 2014; Frassanito M.A., 2019; Elliott I.A., 2019).

Рипамицин киназа активна в клетках, выращенных в богатых питательными веществами условиях и гиперфосфорилированных ATG13, что препятствует образованию комплекса ATG13:ATG1. Наоборот, когда рапамицин киназа инактивируется недостатком питательных веществ, дефосфорилированный ATG13 связывает ATG1, и активируется аутофагия. Впоследствии было показано, что активная киназа представляет собой пентамерный комплекс, который, помимо ATG1 и ATG13, включает ATG17, ATG29 и ATG31. Сборка этого комплекса является первым шагом в каскаде событий, необходимых для формирования аутофагосомы. (Kabeya, Y., 2000; Ichimura, Y., 2000; Hanada, T., 2007; Nakatogawa, H., 2007; Xie Z., 2008; Ohsumi Y., 2014; Ye R., 2019; New J., 2019; Wani A., 2019; Ieni A., 2019; Dickson I., 2019).

В развитии аутофагосомы принимает участие ATG9 (интегральный мембранный белок), а также комплекс фосфатидилинозитол-3-киназы 26, состоящий из белка, ассоциированного с вакуолированным белком 34 (Vps34), Vps15, ATG6 и ATG14. Этот комплекс генерирует фосфатидилинозитол-3-фосфат, а дополнительные белки ATG адсорбируются на мембрану фагофора. Расширение фагофора для образования зрелой аутофагосомы включает в себя

два убиквитин-подобных белковых конъюгационных каскада (Mizushima, N., 2004, Kuma A., 2004; Li F., 2019; Yang L., 2019; Liu J.R., 2019).

Ёсинори Осуми сделал удивительное открытие, что локализация ATG8 на мембране зависит от двух убиквитин-подобных систем сопряжения. Обе системы имеют один и тот же активирующий фермент – ATG7 (Li W.W., Li J., 2002, 2012; Liu L., 2014; Zheng Y., 2019; Zamarrón A., 2019; Chou H.L., 2019; Zóia M.A.P., 2019). Липидированный ATG8 является ключевым фактором удлинения аутофагосом и их слияния (Rauch R., 2007; Mizushima N., Komatsu M., 2011; Rademacher B.L., 2019; Tektemur A., 2019; Nasreddine G., 2019; Fabbri L., 2019; Tanc M.; Tan Y.Z., 2019).

Открытия Ёсинори Осуми позволили выделить подтипы аутофагии в зависимости от деградируемых структур (Che J., 2019; Chen Y., 2019).

Одним из самых изученных и известных типов аутофагии является макроаутофагия, при которой части цитоплазмы и её органеллы полностью окружаются и поглощаются аутофагосомами. Аутофагосомы состоят из двойной мембраны, однако поглощение может произойти через формирование первичных вакуолей или аутофагов (AV-I). Аутофагосомы состоят из одной мембраны, когда происходит объединение с лизосомами – аутолизосомой или поздними аутофаговыми вакуолями (AV-II). Содержимое внутри них разрушается, и более простые компоненты попадают в цитоплазму для дальнейших физиологических процессов клетки (Xu T., 2019; Jamali L., 2019; Majd S., 2019; Qian X.L., 2019; Zhou B., 2019; Shen Q., 2019; Das C.K., 2019).

Киназа mTOR – это главный негативный регулятор макроаутофагии, она обычно инициирует основное формирование аутофагосом, так, ее подавление (к примеру, при помощи рапамицина при отсутствии питательных веществ) активирует макроаутофагию (Kamada Y., 2000; Danial N.N., 2007; Xie C.M., 2019; Dhar S.K., 2019; Sun W., 2019).

Недостаточно хорошо изученным является следующий тип аутофагии – микроаутофагия, при которой поглощение органелл происходит непосредственно в лизосомные мембраны. Микроаутофагия является путем

деградации органелл и долгоживущих белков, но отличается от макроаутофагии тем, что при ней не происходит адаптации к нехватке питательных веществ. Одной из конкретных форм микроаутофагии является деградация пероксисом, изученная на дрожжах, как механизм адаптации к оксидативному стрессу (Ravikumar B., 2002, 2004; Rao J., 2019; Guo Y., 2019; Liu H., 2019; Villella V.R., 2019; Zhang G., 2019; Liu Y., 2019).

Шаперон-ассоциированная аутофагия (ШАА) является еще одним типом аутофагии (третьим) (Shi X., 2019). Этот путь может возникать также из-за нехватки питательных веществ, однако при нем не возникает полного разрушения органелл или селективного распознавания субстрата (Komatsu M., 2006, Hara T., 2006; Cuervo A.M., Wong E., 2014; Lin Y.-C., 2015; Zhu J., 2019; Yang H., 2019; Song H., 2019; Tiessen I., 2019; Wang D.Y., 2019).

Установление молекулярных механизмов аутофагии сыграло важную роль в понимании этого процесса и его участия в клеточной физиологии и различных патологических состояниях. Первоначально аутофагия была признана клеточной реакцией на стресс, однако на данный момент доказано, что система работает непрерывно на базальных уровнях (Giuliano S., 2019). В отличие от системы убиквин-протеосом, которая преимущественно деградирует короткоживущие белки, аутофагия удаляет долгоживущие белки и является единственным механизмом, способным разрушать целые органеллы, такие как митохондрии, пероксисомы и эндоплазматический ретикулум. Таким образом, аутофагия играет существенную роль в поддержании клеточного гомеостаза. Быстрая индукция аутофагии в ответ на различные типы стрессов лежит в основе ее цитопротекторной функции и способности противодействовать повреждению клеток и многих заболеваний, связанных со старением (Liang, X.H., 1999; Zhang X., 2019; Tang K.D., 2019; Makita K., 2019).

Поскольку дерегулирование аутофагического потока прямо или косвенно связано с широким спектром заболеваний человека, аутофагия является особенно перспективной областью исследования и при

необходимости – терапевтического вмешательства. Усиленное внимание к роли аутофагии в заболевании было вызвано наблюдением, что Беклин-1, продукт гена BECN1, мутирует в значительной части рака молочной железы и яичников у людей. BECN1 является гомологом ATG6, который регулирует стадии инициирования аутофагии. Это открытие вызвало значительный интерес к роли аутофагии при раке (Choi A.M.K., Ryter S.W., Levine B., 2013; Ebrahimi-Fakhari D., 2016; Mane S.D., 2019; Zhu Y., 2019; Li H., 2019; Yang W., 2019; Zhang L., 2019; Li D., 2019; Zhou G.Z., 2019; Zhu Z., 2019).

По-прежнему остается неясным, что является ключевым моментом в том, по какому пути смерти пойдет клетка – апоптоза или аутофагии. Взаимоотношения и связь между апоптозом и аутофагией до сих пор не ясны. В определенных ситуациях аутофагия служит единственным путем смерти клетки, являясь резервным механизмом выполнения смертного приговора, в то время как апоптоз заблокирован в клетке. Однако при обратной ситуации в случае голодания клетки будет ингибирована аутофагия (как пример, при воздействии малых интерферирующих РНК), и в клетке начинается гибель посредством развития апоптоза. В клеточных линиях опухолей человека при воздействии на них веществами с цитотоксическими свойствами образуются вакуоли и развивается аутофагия, а апоптоз и клеточное старение не развиваются (Schwertheim S., 2019; Mirza-Aghazadeh-Attari M., 2019; Budisan L., 2019; Ma X., 2019; Zhang Q., 2019; Li Z., 2019; Qu L., 2019; Felip I., 2019; Zhou Z., 2019).

Аутофагия и апоптоз связаны большим количеством молекулярных механизмов, которые могут подавлять и регулировать друг друга (Chen L., Han X., Hu Z., 2019). Если в клетке началась аутофагия, то она подавляет активацию апоптотических белков. Однако активация апоптоза может произойти после выведения поврежденных митохондрий путем аутофагии или микрофагии (Youle R.G., Narendra D.P., 2011). Аутофагия также может способствовать уменьшению содержания проапоптотических белков в цитоплазме клетки. Убиквитилирование таких белков активирует их

связывание с определенными белками, например p62 (sequestosome 1, SQSTM1), которые направляют образованный комплекс в LC3-положительные фагофоры (Shaid S. et al., 2013). Эффекторная каспаза-8 может распадаться во время поздних стадий аутофагии (Hou W. et al., 2010; Sun W., 2019).

В ряде случаев эти два процесса могут усиливать друг друга и протекать параллельно (Galluzzi L. et al., 2009). Так, экстракт сигаретного дыма вызывает *in vitro* гибель эпителиальных клеток за счет стимулирования внешнего пути апоптоза. В этих клетках также возрастает количество аутофагосом и синтез LC3-I в LC3-II. Дезактивация белков Beclin1 или LC3B подавляет апоптоз под влиянием экстракта сигаретного дыма в этих клетках (Chen Z.N. et al., 2010). Также было установлено, что LC3B формирует комплекс с Fas, важным компонентом сигнального пути, вызывающего гибель. Считают, что при влиянии сигаретного дыма развивается апоптоз в клетках за счет очень быстрого отделения LC3B от Fas (Chen Z.N. et al., 2010; Chi H.C., Jin L., 2019).

В случае активации в клетках апоптоза наиболее часто включаются механизмы подавления аутофагии. Существует мнение, что это важно для подавления цитопротекторной аутофагии при повышении сигналов апоптоза. Каспаза-зависимое расщепление белков ATG3 и Beclin1 является основным механизмом подавления (Cho K.H. et al., 2009; Luo S., Rubinsztein D.C., 2010; Wirawan E., 2010; Kang R. et al., 2011). Другие белки аутофагии, например, Ambra 1 и ATG5, необратимо разрушаются под комбинированным действием кальпаинов и каспаз (Youse R.G. et al., 2006; Di Yang M., 2019; Sharif T., 2019).

Параллельно индукции апоптоза может возникнуть и стимулирование аутофагии в клетках. Это возможно, когда BNIP3, единственный из BN3 протеинов, активирует апоптоз за счет конъюгирования белков, блокирующих апоптоз, в частности, семейства Bcl-2, индуцируя Bax/Bad-зависимый выброс проапоптотических белков из митохондрий. Однако, BNIP3 активирует и митофагию за счет нарушения взаимодействия между Bcl-2 и Beclin1 (Zhu Y. et al., 2013). Кроме того, одновременному развитию аутофагии и апоптоза

способствует стресс. Сложная сеть молекулярных взаимодействий определяет механизм гибели клетки или ее выживание. Аутофагия способна подавлять апоптоз путем блокирования каспаз, активирующих апоптоз (каспазы-8), или выведенных из строя путем деполяризации митохондрий. Это позволяет предупредить выброс цитохрома C. (Liang N., 2019).

Следует отметить, что апоптоз подавляет процесс аутофагии, повреждая Ambra1, Beclin1, ATG3 и ATG5 с помощью действующих каспаз и кальпаина. Однако протеолитические продукты ATG3 и ATG5, Beclin1 проявляют проапоптотическую активность после того как они переместятся на наружную мембрану митохондрий (Hseu Y.C., 2019; Liang N., He Q., Liu X., 2019; Zhang Q., Meng X., Qin G., Xue X., 2019).

Важная роль запрограммированной клеточной гибели в элиминации опухолевых клеток указывает на перспективность использования этого феномена в терапевтических целях. Мишенями для такого воздействия теоретически могут стать различные ключевые молекулы этого процесса. Среди возможных направлений создания таргетных препаратов с таким механизмом действия называют ингибирование антиапоптотических и активацию проапоптотических белков. Наиболее эффективным использованием таких препаратов может оказаться совместное их применение со стандартными цитостатиками (Kerr Y., 1984; Fisher D.E., 1994; Bamford M., Waikinshaw G., Brown R., 2000).

О реальности такого подхода к лечению злокачественных опухолей свидетельствуют данные, согласно которым экзогенное введение фактора некроза опухоли, одного из «лигандов смерти», обуславливает регрессию опухоли (Ashkenazi A., Dixit V., 1998). Спонтанную регрессию опухоли у некоторых больных могли связывать с повышенным уровнем фактора некроза опухоли- $\alpha$  в циркулирующей крови (Vasalli P., 1992). Практическое применение этого фактора в качестве лекарственного препарата было ограничено его высокой токсичностью (Копнин Б.П., 2002). Установлено, что рекомбинантный фактор некроза опухоли тимозин- $\alpha$ 1 имеет хорошую

переносимость при перитуморальном введении. По данным гистологического исследования материала от больных с раком молочной железы зафиксировано увеличение числа наблюдений с более выраженным лечебным патоморфозом (III–IV степени), снижение числа микрососудов в опухоли (Владимирова Л.Ю., Подзорова Н.А., 2016).

Препаратами таргетной терапии могут стать и другие вещества, инициирующие апоптоз или активирующие соответствующие рецепторы. Есть данные, что лиганд для рецептора DR-4 (TRAIL) способен селективно убивать опухолевые клетки по сравнению с нормальными за счет индукции апоптоза (Bamford M., Waikinshaw G., Brown R., 2000).

Получен ряд моноклональных антител к Fas-антигену (ICO-160, анти-АРО), которые специфически связываются с «рецептором смерти» и активируют его функции, что ведет к развитию в опухолевых клетках апоптоза (Райхлин Н.Т., Райхлин А.Н., 2002).

Среди мишеней таргетной терапии находится и белок p53, так как в большинстве случаев в опухолевых клетках происходит его инактивация и развивается резистентность к лечению. Потеря клеткой функции p53 происходит за счет мутации в ДНК-связывающем домене гена TP53 (~ 50% всех случаев рака) или на пост транскрипционном уровне за счет связывания и быстрой деградации белка p53 в клетке. В тех случаях, когда опухолевая клетка содержит ген p53 дикого типа, эффективными препаратами могут оказаться соединения, восстанавливающие активность p53 (Michalak E.M., Villunger A., Adams J.M., 2008).

К одному из перспективных направлений в современной экспериментальной генной терапии опухолей относится подавление экспрессии Bcl-2. Уже создан препарат «генасенс», подавляющий образование Bcl-2, который в настоящее время проходит клинические испытания (Herbst R.S., Frankel S.R., 2004).

Других препаратов, созданных для прямого воздействия на механизмы апоптоза, пока нет. Однако по мере углубления и уточнения знаний о

молекулярных механизмах апоптотической гибели клеток будет возрастать количество потенциальных мишеней и увеличиваться вероятность создания специфических веществ, способных активировать апоптоз в опухолевых клетках (Корман Д.Б., 2006).

Одной из причин развития резистентности опухолевых клеток к лечению служит чрезмерное активирование в них различных сигнальных путей, обеспечивающих их пролиферацию и выживание и подавляющих апоптоз, несмотря на действие индуцирующих клеточную гибель факторов. Поэтому препараты, представленные комбинацией веществ с разными противоопухолевыми свойствами, способны подавлять основные механизмы выживания опухолевой клетки, адаптируя ее к действию сигналов-индукторов клеточной гибели и увеличивая суммарный противоопухолевый эффект (Shirwaikar A., 2009).

При изучении влияния флавоноидов и пищевых индолов на рост подкожно перевитой аденокарциномы Эрлиха у мышей СВА/Лас было показано, что продолжительное пероральное введение мышам водной суспензии веществ флавоноида Пикногенол (150 мг/кг) и индол-3-карбинол (75 мг/кг) вызывало достоверное торможение роста аденокарциномы Эрлиха (Дерягина В.П., Рыжова Н.И., 2009). На модели аутохтонной трансгенной аденокарциномы предстательной железы мышей было показано, что пероральное введение полифенольной фракции, изолированной из зеленого чая, достоверно ингибирует эту форму рака и увеличивает выживание данных мышей. Получены данные, что некоторые растения рода *Potentilla* обладают противоопухолевой активностью в отношении лимфомы мышей (асцитная лимфома Дальтона) или лимфобластомы Raji (Koch E., 2000; Spiridonov N.A. et al., 2005).

Открытие способности активировать апоптоз, аутофагию в опухолевых клетках флавоноидов растительного происхождения делает актуальным изучение этой группы веществ как потенциальных противоопухолевых препаратов, обладающих низкой токсичностью и возможностью активировать

ПКГ в опухолевой клетке (Himmji M., 2007; Polier G., Ding J., 2011; Hseu Y.C., 2019).

### **1.3. Механизмы действия противоопухолевых препаратов растительного происхождения и обусловленные ими морфологические изменения в опухолях и тканях**

История официальных противоопухолевых средств началась с колхицина – алкалоида, выделенного в 1820 г. из безвременника осеннего (*Colchicum autumnale*) и других растений семейства Лилейные (Johnson I.J., 1973; Корман Д.Б., 2006).

В 1950 г. одновременно в СССР и Швейцарии был выделен алкалоид колхамин (Киселев И.О. и др., 1952). В США в 1973 г. было установлено антилейкемическое действие экстракта барвинка розового (*Vinca rosea*). При его фракционировании были выделены четыре алкалоида и созданы препараты винбластин и винкристин с наиболее выраженной активностью. Винбластин оказался более эффективным при лимфогранулематозе и хорионкарциноме матки; активность винкристина первоначально была обнаружена у детей с острым лимфолейкозом, позднее показан эффект при лечении лимфом и ряда других опухолей (Hodes M.E. et al., 1960; Cutts J.H. et al., 1973).

В 1980-х гг. был синтезирован полусинтетический аналог винкаалкалоида – винорельбин (навельвин). В отличие от винбластина и винкристина, навельбин был наиболее эффективен при раке молочной железы и немелкоклеточном раке легкого, вызывая морфологическую регрессию опухоли при применении на предоперационном этапе (Braud A., Levy E., 2000). Механизм его действия аналогичен действию винкаалкалоидов: блокирование клеточного цикла в G2- и М- фазах. Винкристин, как и адриамицин, способствовал развитию массивного некроза клеток слизистой тонкой кишки, однако была показана его способность активировать апоптоз. Винкристин при попадании в лимфатические узлы (стимулированные антигеном) приводит к значительному усилению функции Т-клеток (Anilkumar T.V., et al., 1992; Thakkar N.S., Potten C.S., 1992, 1993; Killion J.J. et al., 1996; Moore J.V., 1999).

О.Б. Запускаловой с соавторами (1989) было установлено, что адриамицин реализует лимфотропный эффект за счет нарушения функциональной активности Т-лимфоцитов, винбластин подавляет в иммунной системе Т- и В-клеточные связи, а циклофосфан непосредственно супрессирует клеточную популяцию В-лимфоцитов.

Колхициноподобным действием обладает и смолистый экстракт из корневищ растения мандрагоры (*Podophyllum*) Северной и Южной Америки – подофиллин. В 1942 г. его использовали при острых кондиломах, в 1946 г. его действие было показано на клетках кожи (King L., Sullivan M., 1946). В 1950-1952 гг. при его применении происходило снижение темпов роста опухоли, однако не наступала полная регрессия (Kelly M.G., Hartwell J.L., 1954); небольшой эффект наблюдали при начальных стадиях рака кожи, при других опухолях результата не отмечали (Hubacher O., 1964). При морфологическом исследовании в эпителии наблюдали вакуолизацию протоплазмы клеток, очаговую гибель эпителиальных клеток с выраженным их ослизнением, а при окраске по Браше отмечено снижение РНК в клетках. В отдельных сосочках авторы наблюдали расщепления поверхностных пластов эпителия с образованием внутриэпителиальных кист, поверхность некоторых сосочков некротизировалась, в других наблюдалось выраженное ороговение. Строма папиллом становилась более плотной за счет преобладания грубых коллагеновых волокон, уменьшалось количество кровеносных сосудов (Вознесенская И.А., 1958).

Цитостатик майтанзин выделен в 1972 г. из кустарника *Maytenus ovatus* и в 1974 г. – из древесины и корней *Mayterius buchananii*. В 1975-1976 гг. показана эффективность соединения майтанзина в весьма небольших дозах на широком спектре перевиваемых опухолей при отсутствии гематологической токсичности (Cabanillas E. et al., 1977). На раке молочной железы и неходжкинских лимфомах проведена вторая фаза испытаний, где значительного эффекта не было обнаружено, и дальнейшего распространения препарат не получил.

В 1970 г. из цветков *Heliotropium indicum* получен алкалоид индисинноксид антимиотического действия. После обнаружения активности

при лейкозе P388 перешли к клиническим испытаниям, но заметного эффекта не выявили, работа прекратилась (Poster D.S. et al., 1981).

Камптотецин, полученный из коры кустарника *Camptotheca acuminata* Северного Китая, обладал значительной противоопухолевой активностью, доказанной в экспериментах на животных с перевиваемыми опухолями (Niizuma S. et al, 2009). В 1988 г. установлено, что специфической мишенью действия камптотецина является топоизомераза I (Hsiang Y.H., Liu L.F., 1988; Kawato Y. et al., 1991).

В 1971 году было установлено, что паклитаксел из коры тихоокеанского тиса (*Taxus brevifolia*) способен тормозить рост экспериментальных опухолей (Wani M.C. et al., 1971). Одной из особенностей паклитаксела была способность активировать апоптоз, останавливая клетку в профазе митоза и иницируя быстрый p53-независимый апоптоз. Вторым механизмом реализовался за счет блокирования пресинтетической фазы G1, что приводило к развитию p53-зависимого апоптоза (Legha S. et al., 2002). В результате морфологических исследований получены данные о выраженных деструктивных изменениях в тканях опухоли (3-4-я степень патоморфоза) в 40% случаев и в 20% – полное отсутствие признаков опухоли в молочной железе (Holmes F. et al., 1991; Лимарева С.В., 2010).

Макролидный антибиотик ризоксин, полученный в 1986 г. из древесного гриба *Rhizopsis cheriensis*, обладал высокой противоопухолевой активностью по отношению ко многим клеточным линиям опухолей человека из стандартной панели, используемой при скрининге противоопухолевых средств. Ризоксин так же, как винкаалкалоиды, ингибировал полимеризацию тубулина (Roder E., 1995).

Искадор из омелы белой (*Viscum album*) широко применялся в терапии опухолей (Schoffski P. et al., 2004). Его эффект проявлялся замедлением или стабилизацией роста опухоли и значительным симптоматическим улучшением, что объяснялось иммуномодулирующими свойствами (Hajto T. et al., 2005; 2006).

В 1999 г. с помощью генной инженерии разработана рекомбинантная технология получения лектина ML I (авискумин), а в 2002 г. начались его

клинические испытания (Schoffski P. et al., 2004). Он обладал высокой цитостатической активностью, иммуномодулирующими свойствами и хорошо переносился животными, был способен генерировать в клетках апоптоз при очень низких концентрациях, что в 5000 раз превосходило эффект доксорубина и в 1500 раз – паклитаксела. Выявлена также стимуляция иммунной системы на основе увеличения в плазме крови уровня цитокинов (интерлейкин-1/3, интерлейкин-6, интерферон) и иммуноглобулинов IgG и IgM (Lizuka N., 2000; Schoffski P. et al., 2004; Burns J.J., 2010).

Препарат канглайт, разработанный в Китае путем экстракции липидных компонентов из семян травы конке тормозил клеточный цикл в переходе G2/M-цикла, что приводило к ингибированию клеточной пролиферации. Показана его способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток и ингибировать ангиогенез в опухоли (Дапэн Л., 2005).

Флавопиридол – синтетический аналог флавонового алкалоида рокситукина *Amoora rohituka* и *Dysoxylum binectariferum* – первый цитостатик с механизмом действия за счет ингибирования циклинзависимых киназ, приводивших к остановке цикла в фазе G1 или G2 и гибели клеток путем апоптоза (Patel V. et al., 1998; Mantena S.K., 2006).

Препарат летрил (амегдалин MF) – цианидсодержащий гликозид из ядер косточек горького миндаля, абрикосов, персиков; с помощью морфологических методов была установлена его способность активировать апоптоз (Lataster W.R., Schabel F.M., 1975; Wodinsky Y., Swiniarski J.K., 1975; Корман Д.Б., 2012).

Не вызывает сомнений, что комплексный подход в лечении заболеваний онкологической природы должен включать не только звено воздействия специфического характера, но и всевозможные средства и способы восстановления многочисленных нарушений гомеостаза, которые вызываются применением цитостатиков (Давыдов М.И., 2015).

Проведенные в экспериментах *in vivo* патоморфологические исследования показывают, что у мышей, подвергавшихся воздействию цитостатиков, происходят выраженные морфологические изменения во внутренних органах (легкие, печень, поджелудочная железа), а также органах

иммунокомпетентной системы и головном мозге с преобладанием в них дистрофических, атрофических и воспалительных реакций (Бабушкина Н.А., 2005; Сенькова А.В., 2011; Долгова Е.В., 2013).

При создании препаратов растительного происхождения с противоопухолевыми свойствами большое внимание уделяется флавоноидам. Флавоноиды относятся к фенольным соединениям, присутствующим в 98% растений (Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., 2008). Они оказывают на организм человека лечебно-профилактическое действие широкого спектра, в т.ч. при онкологической патологии (Перушкова А.М. и др., 1991; Middleton E. et al., 2000; Imai Y. et al., 2004). Флавоноиды обладают кардиопротекторной, спазмолитической, противовоспалительной, антиаллергической, гепатопротекторной, антисклеротической и антиканцерогенной активностью за счет их способности регулировать активность ферментов разных классов (Мосейчук И.П., 1988; Ryu S.H. et al., 1985; Brownson D.M. et al., 2002; Stein M.C., 2002; Kim M.H., 2003). Они также обладают антиагрегантной и антиокислительной активностью, снижают ломкость кровеносных сосудов, увеличивают эффекты витамина С (Тодоров И.Н. и др., 2000; Макарова М.Н. и др., 2005).

Так, при введении кверцетина происходит инактивация свободных радикалов, образующихся при перекисном окислении липидов (ПОЛ); торможение кальций-мобилизирующей полифосфоинозитидной системы; активация аденилатциклазного каскада (Билык О.В., Рыбальченко В.К., 2007).

Биофлавоноиды вызывают не только гибель опухолевых клеток (Ryu S.H. et al., 1985; Kim M.H., 2003; Корсун В.Ф. и др., 2003), но и стимулируют противобластомную активность НК (Чекнев С.Б., 1999; Капля О.А., 2004; Mathews R. et al., 1991; Niggemann B., 2003), активируют экспрессию генов цитокинов: интерферона (ИФН- $\gamma$ ) в Т-лимфоцитах, ИФН-3 и фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) в В-лимфоцитах (Futami H. et al., 1991), а также стимулируют иммунные реакции организма (Finlay G.J. et al., 1988), могут снижать гиперкоагуляцию (Sekiya K. et al., 1982).

Многие биофлавоноиды наряду с противоопухолевой активностью снижают гематотоксичность, обладают антиметастатическими и

цитопротекторными свойствами (Бунятян Н.Д. и др., 1988; Виноградова Т.А. и др., 2001; Джахангирова М.А. и др., 2005; Lotan R. et al., 1990; Poplawski J. et al., 2000; Kim M.H., 2003). Препараты из растений с большим содержанием дубильных веществ и флавоноидов применяются в терапии с цитостатиками для снижения гепатотоксичности (Мосейчук И.П., 1988; Бочарова О.А., 2009; Barnes J., Mills S.Y., 1998; De Smet P.A., 2002, 2004).

Повышение эффективности терапии цитостатиками растительного происхождения может происходить за счет влияния на иммунную систему, что обеспечивается активацией макрофагов и системы комплемента (Hetts, S.W., 1998; Wasser S.P., 2002; Leung H.W., 2006; Bergmann A., 2010).

Ингибирующее влияние флавоноидов на процесс диссеминации опухолей является следствием угнетения ими неоангиогенеза (Гурьянцева Л.А. и др., 2000; Kim M.H., 2003).

Существует ряд работ, посвященных противоопухолевой активности флавоноидов в экспериментах *in vivo*. Так, М.И. Давыдов, А.Ю. Барышников в 2003 г. установили, что фосфорилированные производные 2,3-дигидрокверцетина обладают ингибирующим эффектом на рост моноцитарного лейкоза L-41. Д.А. Корман в 2013 году в экспериментах *in vitro* показал, что флавоноиды обладают антипролиферативной активностью в отношении клеток линии рака предстательной железы DU-145, рака поджелудочной железы (Park J.L., 2013), рака яичника (Sak K., 2015). Ряд флавоноидов (физетин, апигенин и лютеолин) ингибировали как пролиферацию нормальных и опухолевых клеток, так и ангиогенез при полулетальных концентрациях (Sako A., Kitayama J., 2008). Полученные результаты согласуются и с последующими исследованиями, показавшими, что витексин, ориентан и изоорентин являются цитотоксичными по отношению к клеткам MCF-7 и ингибируют их пролиферацию (Czemplik M., Mierziak J., 2016). На клеточных культурах был установлен ряд механизмов противоопухолевой активности флавоноидов, в частности, за счет их способности снижать активность цитоплазматической и митохондриальной АТФ-аз (Максютина Н.П., 1988). Другой механизм связывают с возможностью флавоноидов активировать апоптоз в клетках

опухоли и повышать экспрессию генов-супрессоров (Huang H.Y., Zha X.L., 2002; Rong Y., 2008).

Появление новых методов молекулярно-биологических исследований, раскрытие новых, более тонких механизмов функционирования и деления клеток способствовали получению новых данных о путях реализации противоопухолевой активности, а иногда полностью меняли принятые взгляды на механизмы действия тех или иных препаратов. Примерами этой тенденции служат современные представления о механизме гибели опухолевых клеток путем апоптоза. Получение новых знаний об апоптозе, путях его развития и методах детекции привели к тому, что механизм действия многих противоопухолевых препаратов разных классов стали связывать с индукцией ими апоптоза (Im S.T., Oh S.T., Song S. et al., 2005; Song Z., 2009).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В начале исследования был проведен предварительный скрининг, в котором было исследовано растительное сырье 9 растений (белокопытник ложный, кипрей узколистный, таволга вязолистная, кирказон ломоносовидный, зюзник европейский, репяшок обыкновенный, авран лекарственный, бессмертник песчаный и кукуруза антоциановая), в результате которого было отобрано 3 наиболее перспективных: авран лекарственный, бессмертник песчаный и кукуруза антоциановая.

Экстракты были получены нами авторским способом (Патент РФ 2482863), позволяющим существенно повысить выход биофлавоноидов и предусматривающим минимальный выход токсичных соединений (алкалоидов, гликозидов и др.), что особенно актуально при получении нетоксичных экстрактов ядовитых растений, к которым относится авран лекарственный, но для приведения к единым условиям все экстракты получены были одним способом. Кроме того, запатентованный способ позволяет получить сухой остаток и в дальнейшем дает возможность определять точную концентрацию целевых продуктов и рассчитывать точную дозировку для экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*, а также позволяет длительное время хранить экстракт до начала использования.

### 2.1. Материалы

1. В работе использовались экстракты, полученные из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium*), антоциановой формы кукурузы обыкновенной (*Zea mays* L.).

*Химический состав экстракта аврана лекарственного.* Ранее в составе травы аврана была описана бетулиновая кислота, обладающая противоопухолевой активностью, но использованная нами технология получения экстракта исключала выход данного соединения. 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- $\alpha$ -D-рибозид; 4-пропилфенол; пирокатехин; L-луксоза (пентоза); 6-деоксигексоза; L-галактоза; бензоиллуксусной 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 (Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., 2012).

*Химический состав экстракта бессмертника песчаного.* Среднее значение полученных определений содержания кверцетина в экстракте бессмертника песчаного, установленное нами методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), составило 0,3 мкг/мл, а количество кверцетина в сухом остатке (на 350 мг экстрактивных веществ) составило 150 мкг. Методом молекулярной абсорбционной спектроскопии найдено 29,40 мкг/мл флавоноидов в пересчете на рутины. Массовое процентное содержание флавоноидов в экстракте – 21,0%. Новая биологически активная композиция содержит также: 2,3-дигидробензофуран, 2-метокси-4-винилфенол, гексадекановую кислоту (пальмитиновую кислоту), бис (2-этилгексил) эфир адипиновой кислоты (Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., 2015).

*Химический состав экстрактов кукурузы.* В результате химического анализа экстракта из сырья антоциановой формы кукурузы обыкновенной, полученного экстракцией 95% этиловым спиртом, были выделены органические вещества, вероятность обнаружения которых соответствует параметрам «превосходное и хорошее соответствие». Установлено, что новая биологически активная композиция содержит: этиловый эфир гексадекановой кислоты; 5-гидроксиметил-2-фуральдегид; 1-(4-метоксифенил)-метоксипропан; 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он;

гексадекановую кислоту (пальмитиновую кислоту); этиловый эфир линоленовой кислоты; 9,12-октадекановую кислоту; 2-(5-хлор-2-метоксифенил) пиррол.

Среднее значение полученных определений содержания кверцетина в смеси, установленное нами методом ВЭЖХ, содержание кверцетина в исходном экстракте составило 0,7 мкг/мл, что соответствует 0,13% массового процентного содержания в экстракте сухих веществ; а в экстракте кукурузы, выращенной в засушливых условиях, содержание кверцетина в исходном экстракте составило 0,3 мг/мл, что соответствует 0,2% массового процентного содержания в экстракте сухих веществ.

Методом молекулярной абсорбционной спектроскопии в кукурузе, выращенной в обычных условиях, найдено 16,46 мкг/мл флавоноидов в пересчете на рутин. Массовое процентное содержание флавоноидов в экстракте – 15,8%. В экстракте из кукурузы, выросшей в засушливый период, – 17,18 мкг/мл флавоноидов в пересчете на рутин. Массовое процентное содержание флавоноидов в экстракте – 22,9%.

2. Культуры клеток: эмбриона почки свиньи SPEV, аденокарциномы матки HeLa, Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, карциномы почки A498.

3. 220 белых половозрелых лабораторных крыс-самцов породы Wistar массой 150-210 г.

4. Перевиваемые опухоли рака печени PC-1, рака почки PA и саркомы 45, полученные из банка опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

## 2.2. Дизайн экспериментов

### Дизайн экспериментов *in vitro*

Для анализа цитотоксической, цитостатической и апоптотической активности исследования проводили на культурах SPEV и HeLa. Исследовались следующие концентрации (мг/мл) экстрактов:

- аврана лекарственного: 0,4; 0,9; 1,5; 3; 6; 12; 24;
- бессмертника песчаного: 0,53; 1,07; 2,15; 4,3; 8,6; 17,3;
- кукурузы антоциановой ВЗУ и ВОУ: 0,28; 0,56; 1,12; 2,25; 4,5; 9.

для описания морфофункциональных изменений в культуре опухолевых клеток HeLa через 24, 48 и 72 часа исследовались следующие концентрации (мг/мл) экстрактов:

- аврана лекарственного – 0,035; 0,09; 0,18; 0,4; 0,9; 1,5; 3; 6;
- бессмертника песчаного – 0,011; 0,045; 0,09; 0,18; 0,37; 0,75; 1,25; 2,5; 5; 10;
- кукурузы антоциановой ВЗУ и ВОУ – 0,011; 0,045; 0,09; 0,18; 0,37; 0,75; 1,25; 2,5; 5; 10.

Для оценки апоптотической активности с помощью ядерного красителя Хёкст на клеточной культуре рака молочной железы SCBR-3 использовались следующие концентрации экстрактов (мг/мл):

- экстракт аврана – 0,035; 0,18; 0,9;
- экстракт бессмертника и экстракты кукурузы ВЗУ и ВОУ – 0,071; 0,35; 1,76.

Для оценки апоптотической активности с помощью ядерного красителя Хёкст на клеточных культурах рака почки Caki и Sn12c использовались следующие концентрации экстрактов (мг/мл):

- экстракт аврана – 0,035; 0,18; 0,9;
- экстракт бессмертника и экстракты кукурузы ВЗУ и ВОУ – 17,6.

Для определения апоптотической активности экстрактов в концентрации 0,9 мг/мл на проточном цитофлуориметре методом двойного окрашивания аннексином V и йодистым пропидием использовали следующие культуры, полученные из банка опухолевых культур ФГБУ «НМИЦ

онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России: Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карцинома легкого A549, карцинома простаты PC-3, карцинома толстой кишки HCT-116, карцинома почки A498 (Таблица1).

Каспазо-зависимый апоптоз (активация каспазы-3) был исследован на проточном цитофлуориметре с помощью кита anti-caspase-3-FITC (BD) на клеточной линии лимфобластного лейкоза Jurkat.

### **Дизайн экспериментов *in vivo***

*Работа с лабораторными животными.* Исследование проведено на 220 белых половозрелых лабораторных крысах-самцах породы Wistar массой  $150 \pm 20$  гр.

Все животные проходили необходимый карантин в виварии, где они содержались в закрытом отапливаемом помещении при температуре 20-25°C в индивидуальных клетках. Пищевой режим стандартный, с использованием комбикорма для грызунов. Длительность наблюдения за лабораторными животными зависела от модели переносимой опухоли и колебалась от двух до четырех недель.

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащих Женевской Конвенции 1985 г. о «Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных», и Хельсинкской декларации 2000 г. о гуманном отношении к животным, а также в соответствии с положением приказа № 755 МЗ СССР от 12.08.1977 года. Тема и описания экспериментов одобрены этической комиссией ГБОУ ВПО СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол №13 от 3 мая 2011 г.).

Экспериментальные работы *in vivo* выполнены на базе Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии при ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (Руководитель ЦКП – к.б.н. Бучарская А.Б.).

При разработке дизайна экспериментов использовали «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Хабриев Р.У., 2005) и «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н., 2012).

**Дизайн эксперимента с перевитым раком почки РА.** Было использовано 60 самцов белых лабораторных крыс породы Wistar массой  $150 \pm 20$  г, которым имплантировали подкожно в области лопатки по 0,5 мл 25%-й опухолевой взвеси рака почки РА в растворе Хэнкса. Животные с перевитым раком методом случайной выборки были разделены на три группы по 20 крыс: первая и вторая – опытные, этим крысам вводили экстракт аврана либо перорально, либо внутримышечно в дозе 110 мг сухой массы экстракта/кг/сутки (концентрация экстракта 100 мг/мл). Третью группу – группу сравнения – составили животные с перевитой опухолью, но без введения экстракта. В опытных группах через 72 часа после трансплантации опухоли крысам вводили раствор ежедневно в течение двух недель, после чего животных всех групп выводили из эксперимента путем декапитации, и производили забор образцов ткани опухоли, крови, внутренних органов, головного мозга и семенников (Таблица1).

**Дизайн эксперимента с перевитой саркомой 45.** Использовано 60 самцов белых лабораторных крыс породы Wistar массой  $150 \pm 20$  г, которым подкожно в область лопатки имплантировали по 0,5 мл 25%-й опухолевой взвеси саркомы 45 в растворе Хэнкса. Животные с перевитой саркомой методом случайной выборки были разделены на три группы по 20 крыс – первую и вторую – опытные, получавшие водный раствор сухого экстракта аврана перорально и внутримышечно в одинаковой дозировке 110 мг/кг, и третью – группу сравнения, где были животные с перевитой опухолью, но без воздействия (Таблица 1). В опытных группах раствор экстракта крысам вводили перорально и внутримышечно ежедневно в течение двух недель, начиная через 72 часа после трансплантации опухоли. По окончании опыта (через 2 недели) крыс выводили из эксперимента и для дальнейшего

исследования производили забор образцов ткани внутренних органов, опухоли, крови, головного мозга, семенников.

Таблица 1 – Используемые в исследовании клеточные культуры, экстракты, их концентрации и длительность наблюдения

| №                            | Культура клеток                            | Период наблюдения | Экстракты          | Концентрация или дозировка                                                              |
|------------------------------|--------------------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Неопухолевая культура        |                                            |                   |                    | Концентрация (мг/мл)                                                                    |
| 1                            | SPEV – культура эпителиальных клеток почки | 24,48,72 часа     | Аврана             | 0,4; 0,9; 1,5;3; 6; 12; 24                                                              |
|                              |                                            | 24,48,72 часа     | Бессмертника       | 0,53; 1,07; 2,15;4,3; 8,6; 17,3                                                         |
|                              |                                            | 24,48,72 часа     | Кукурузы ВЗУ и ВОУ | 0,28; 0,56; 1,12; 2,25; 4,5; 9                                                          |
| Опухолевые культуры человека |                                            |                   |                    |                                                                                         |
| 2                            | HeLa – рак шейки матки                     | 24,48,72 часа     | Аврана             | 0,035; 0,09; 0,18; 0,4; 0,4; 0,9; 1,5;3; 6; 12; 24                                      |
|                              |                                            | 24,48,72 часа     | Бессмертника       | 0,011; 0,045; 0,09; 0,18; 0,37; 0,53; 0,75; 1,07; 1,25; 2,15; 2,5; 4,3; 5; 8,6; 10;17,3 |
|                              |                                            | 24,48,72 часа     | Кукурузы ВЗУ и ВОУ | 0,011; 0,045; 0,09; 0,18; 0,37; 0,28; 0,56; 0,75; 1,12; 1,25; 2,25; 2,5; 4,5;5; 9; 10   |
| 3                            | SK-BR-3 - аденокарцинома молочной железы   | 24,48 часа        | Аврана             | 0,035; 0,18; 0,9                                                                        |
|                              |                                            | 24,48 часа        | Бессмертника       | 0,071; 0,35; 0,9; 1,76                                                                  |
|                              |                                            | 24,48 часа        | Кукурузы ВЗУ и ВОУ | 0,071; 0,35; 0,9; 1,76                                                                  |
| 4                            | MCF-7 - аденокарцинома молочной железы     | 24 часа           | Аврана             | 0,9                                                                                     |
|                              |                                            | 24 часа           | Бессмертника       | 0,9                                                                                     |
|                              |                                            | 24 часа           | Кукурузы ВЗУ и ВОУ | 0,9                                                                                     |
| 5                            | Jurkat - Т-лимфобластный лейкоз            | 24 часа           | Аврана             | 0,9                                                                                     |
|                              |                                            | 24 часа           | Бессмертника       | 0,9                                                                                     |
|                              |                                            | 24 часа           | Кукурузы ВЗУ и ВОУ | 0,9                                                                                     |
| 6                            | A549 - карцинома легкого                   | 24 часа           | Аврана             | 0,9                                                                                     |
|                              |                                            | 24 часа           | Бессмертника       | 0,9                                                                                     |
|                              |                                            | 24 часа           | Кукурузы ВЗУ и ВОУ | 0,9                                                                                     |
| 7                            | PC-3 - карцинома простаты                  | 24 часа           | Аврана             | 0,9                                                                                     |
|                              |                                            | 24 часа           | Бессмертника       | 0,9                                                                                     |
|                              |                                            | 24 часа           | Кукурузы ВЗУ и ВОУ | 0,9                                                                                     |

Продолжение таблицы 1

|                                      |                                                  |            |                       |                                                                               |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------|------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 8                                    | <b>НСТ-116 -<br/>карцинома<br/>толстой кишки</b> | 24 часа    | Аврана                | 0,9                                                                           |
|                                      |                                                  | 24 часа    | Бессмертника          | 0,9                                                                           |
|                                      |                                                  | 24 часа    | Кукурузы ВЗУ<br>и ВОУ | 0,9                                                                           |
| 9                                    | <b>Сакі -<br/>карциномы<br/>почки</b>            | 24,48 часа | Аврана                | 0,035; 0,18; 0,9                                                              |
|                                      |                                                  | 24,48 часа | Бессмертника          | 17,6                                                                          |
|                                      |                                                  | 24,48 часа | Кукурузы ВЗУ<br>и ВОУ | 17,6                                                                          |
| 10                                   | <b>Sn12с–<br/>карциномы<br/>почки</b>            | 24,48 часа | Аврана                | 0,035; 0,18; 0,9                                                              |
|                                      |                                                  | 24,48 часа | Бессмертника          | 17,6                                                                          |
|                                      |                                                  | 24,48 часа | Кукурузы ВЗУ<br>и ВОУ | 17,6                                                                          |
| 11                                   | <b>А498 -<br/>карциномы<br/>почки</b>            | 24 часа    | Аврана                | 0,004; 0,007; 0,014;<br>0,028; 0,056; 0,113;<br>0,225; 0,45; 0,9;<br>1,8; 3,6 |
| <b>Перевиваемые опухоли животных</b> |                                                  |            |                       | <b>Дозировка (мг/кг)</b>                                                      |
| 12                                   | <b>Рака почки РА</b>                             | 14 дней    | Аврана                | 110                                                                           |
| 13                                   | <b>Рак печени РС-<br/>1</b>                      | 21/28 дней |                       | 110                                                                           |
| 14                                   | <b>Саркома SA 45</b>                             | 14 дней    |                       | 110                                                                           |

**Дизайн эксперимента на животных с перевитым раком печени РС-1.**

Использовано 100 самцов белых лабораторных крыс породы Wistar массой  $150 \pm 20$  г, которым имплантировали подкожно в области лопатки по 0,5 мл 25%-й опухолевой взвеси в растворе Хэнкса штамма альвеолярного рака печени – РС-1. Животные с перевитым раком печени РС-1 методом случайной выборки были разделены на шесть групп по 20 крыс: с первой по четвертую – опытные, где крысам вводили экстракт аврана либо перорально, либо внутримышечно. Первая и вторая группы выводились из эксперимента после окончания введения экстракта аврана, а третья и четвертая – через неделю после окончания введения экстракта для оценки пост-эффекта. Пятую и шестую группы – группы сравнения – составили животные с перевитой опухолью, но без введения экстракта. При достижении опухолями объема  $1 \text{ см}^3$  в опытных группах крысам раствор вводили один раз в течение двух суток

в дозе 110 мг сухой массы экстракта/кг (концентрация экстракта 100 мг/мл) в течение двух недель, затем животных первой и второй групп вывели из эксперимента, а в третьей и четвертой группах после отмены введения экстракта продолжали наблюдение за животными еще неделю. На 21-е сутки крыс первой, второй и часть пятой группы, а на 28-е сутки крыс третьей, четвертой и оставшуюся часть пятой группы выводили из эксперимента и производили забор образцов ткани внутренних органов, опухоли, крови, головного мозга и семенников для дальнейшего исследования.

## **2.3. Методы исследования**

### **2.3.1. Морфологические методы исследования клеток в экспериментах *in vitro***

Объектом исследования послужили культуры клеток почек эмбрионов свиньи SPEV-2 и опухолевых клеток рака шейки матки HeLa, полученные из криобанка коллекции клеточных культур лаборатории вирусологии научно-исследовательской ветеринарной станции РАСХН (г.Саратов). Культивирование проводили в пластиковых флаконах в среде RPMI 4 (10% эмбриональная сыворотка, гентамицин, ампициллин, амфотерицин).

Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в течение 24 часов, после чего окрашивали. В качестве красителя использовали йодистый пропидий, проникающий в нежизнеспособные клетки за счет разрушения их мембраны (Кассимерис Л., Лингаппа В.Р., Плоппер Д., 2016). Для визуализации клеток использовали микроскоп Leica DMI. Захват и анализ изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры Leica DFC 420 C и программного обеспечения Leica Application Suite V 3.1. Для подсчета клеток использовали программное обеспечение ImageJ.

Для анализа цитотоксической, цитостатической и апоптотической активностей сравнивали в контрольной и экспериментальной группах следующие усредненные показатели: общее количество, количество живых и количество мертвых клеток в поле зрения, затем были рассчитаны процентные соотношения живых и мертвых клеток, а также доля клеток,

находящихся в состоянии апоптоза (пикноз, апоптозные тельца, «серпы») и доля клеток, имеющих аутофаголизомы, от количества живых клеток в поле зрения.

Для описания морфологических изменений в культуре опухолевых клеток HeLa под воздействием экстрактов применяли разные методы окрашивания, каждый из которых позволял решать определенные задачи. Так, применение одновременно двух флуоресцентных красителей – акридинового оранжевого и йодистого пропидия в тесте «живые и мертвые» позволяло выявлять как количество погибших некрозом (ядро окрашено в красный цвет), жизнеспособных клеток (ядро окрашено в зеленый цвет), клеток с аутофагосомами (клетки с черными «вакуолями» в клетке), так и количество клеток с апоптозом (ядро резко конденсировано и окрашено в ярко-зелено-желтый цвет), при этом выявлялись апоптотические тельца, также окрашенные в зеленый цвет.

Тест «живые и мертвые» позволял оценивать стадию пикноза ядра, которая присутствовала в апоптозе: если ядро окрашивалось в ярко-зеленый цвет. Параллельно проводимое отслеживание клеток в фазовом контрасте было необходимо для подтверждения наличия в кариоплазме ядрышек, а в цитоплазме – аутофагосом и других образований.

Эксперименты проводили в 6 луночных культуральных планшетах – один контрольный и пять экспериментальных. Контролем служили клетки в питательной среде без добавления экстракта, выросшие в течение суток. В другие пять лунок вносили раствор исследуемого экстракта или вещества, предварительно разведенного в той же питательной среде с понижением концентрации в 2 раза в каждой лунке.

### ***2.3.2. Морфологические методы выявления апоптоза и аутофагии в клеточных культурах***

***Иммуноцитохимическое исследование.*** Для исследования индукции апоптоза использованы культуры опухолевых клеток человека: карцинома молочной железы человека SK-BR-3, карцинома почки человека Sakі-1,

карцинома почки человека Sn12с, полученные из Банка клеточных линий ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Клеточную линию культивировали на полной питательной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (ТЭС, HyClone, США); 2 мМ/мл глутамина (ПанЭко, Россия), 50 мг/мл пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37<sup>0</sup>С в атмосфере с содержанием 5% СО<sub>2</sub>. Для экспериментов использовали клетки при 70-80% монослоя.

Клетки наращивали на стеклах до 70% монослоя. После инкубации с исследуемыми экстрактами в течение 24 часов клетки фиксировали в спирте и ацетоне. Затем их окрашивали красителем Хёкст 33258 (1 мкг/мл, ПанЭко, Россия). Клетки заключали под покровные стекла с использованием полимерной среды Fluorescent mounting medium (Dako, Дания). Анализ образцов проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon 80i (Япония) при 435-485нм. Хёкст 33258 связывается со структурами ядра клетки.

При анализе клеток, окрашенных Хёкстом 33258, использованы следующие показатели: среднее число клеток в поле зрения; активность роста культуры – отношение среднего количества всех клеток в поле зрения при воздействии к среднему количеству всех клеток в поле зрения в контрольных образцах; абсолютное число митозов в поле зрения (п/зр); процент клеток в митозе (общего числа клеток); индекс митотической активности – отношение числа клеток на стадиях митоза к общему числу клеток в поле зрения, умноженное на 100; абсолютное число апоптозов в п/зр; доля клеток в апоптозе (от общего числа клеток), индекс апоптотической активности – соотношения числа клеток в состоянии апоптоза к общему числу клеток в поле зрения, умноженное на 100; доля клеток с пикнозом ядра от общего числа клеток с признаками апоптоза (%); доля апоптотических телец от общего числа клеток с признаками апоптоза (%).

Подсчет клеток в каждой группе осуществлялся не менее чем в десяти полях зрения при увеличении x200.

**Определение апоптоза методом двойного окрашивания аннексином V и йодистым пропидием.** Индукцию апоптоза исследовали после инкубации клеточных линий с экстрактом аврана в концентрации 0,88 мг/мл в течение 24 ч. Исследование проводили с помощью Annexin-V FITC Apoptosis Kit (Invitrogen, Life Technologies, USA). Аннексин V связывается с фосфотидилсерином, выходящим наружу клеточной мембраны в ранней стадии апоптоза. Йодистый пропидий связывается с ДНК разрушенных клеток и является маркером поздней стадии апоптоза или некроза.

Для проведения реакции клетки снимали, отмывали в PBS и ресуспендировали в аннексин-связывающем буфере в количестве 1 млн клеток/мл, затем переносили по 100 мкл клеток в пробирки, содержащие 5 мкл Annexin-V-FITC и 5 мкл PI. Инкубировали при комнатной температуре в темноте 15 минут. Добавляли 400 мкл аннексин-связывающего буфера и считали на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (BecktonDickenson, USA.).

**Определение индукции аутофагии** проводили на карциноме почки A498 (Банк опухолевых культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) с помощью клеточного анализатора Muse с реагентами Muse Autophagy LC3-Antibody Based Kit (Abcam, USA).

### **Электронная микроскопия**

Приготовление проб для электронной микроскопии

1. Культуру клеток осаждали центрифугированием при 7000 об/мин в течение 10 минут и фиксировали 0,1%-м глутаровым альдегидом, приготовленном на натрий-фосфатном буфере (0,1 М. pH 7.2) в течение минимум 1 часа.
2. Дальнейшую фиксацию проводили в 2,5%-ом глутаровым альдегиде, приготовленном на натрий-фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,2) в течение 12 часов (оставляли на ночь на дверце холодильника).
3. Промывка натрий-фосфатным буфером (0,1 М. pH 7,2) с добавлением сахарозы 6,8 г на 100 мл 3 раза с выдержкой по 10-15 мин.

4. Постфиксация: 1%-м OsO<sub>4</sub>, приготовленным на том же самом буфере с добавлением 25 мг/мл сахарозы (мин. по 300 мкл на эппендорф) в течение 3-4 часов при комнатной температуре.
5. Дегидратацию проводили в концентрациях этанола от 20% до 96%, с шагом 10% 2 раза по 10 минут в каждом. В ацетоне – 3 раза по 20 минут.
6. Далее выдерживали в окиси пропилена 2 раза по 30 мин. Приготовление смолы: Ероп 812 15 мл, DDSA6 мл, MNA 9 мл, DMP 30 0,6 мл. Пропитывание проводимой смолой и окисью пропилена проводили в течение 2 суток.

После образцы помещали в формочки для проведения полимеризации в течение суток при 37°C, затем держали сутки при 45°C и еще сутки при 57°C.

8. Электронную микроскопию проводили на электронном микроскопе LIBRA 120 «Carl Zeiss» (Германия) на базе ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН; срезы наносили на никелевые сеточки с формваровой подложкой.

***Оценка уровня экспрессии генов, ассоциированных с путями клеточной гибели в клетках карциномы почки человека (линия A498) методом in silico.*** Для исследования сравнительного уровня экспрессии генов, ассоциированных с различными путями клеточной гибели (апоптоз, некроз, аутофагия) в не подвергавшихся воздействию клетках карциномы почки человека (линия A498) был выполнен анализ базы данных SRA (Sequence Read Archive; NCBI), содержащей архивы «сырых» результатов высокопроизводительного секвенирования. Были найдены SRA-архивы SRX1896988 и SRX1084573, относящиеся к двум независимым проектам и содержащие необработанные результаты секвенирования транскриптома контрольных образцов клеточной линии A498.

Оба транскриптома секвенировались по технологии Illumina HiSeq 2000. Выделение РНК для последующего секвенирования образца SRX1896988 было выполнено набором miRNeasy kit (Qiagen, Германия). Выделение РНК для последующего секвенирования образца SRX1084573 было выполнено набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия).

С использованием указанных транскриптомных баз данных нами был изучен сравнительный уровень экспрессии 82 генов, ассоциированных с различными вариантами клеточной гибели:

**Pro-Apoptotic:** ABL1 (NM\_007313.2), APAF1 (NM\_181861.1), BCL2L1 (NM\_138624.3), BIRC2 (c-IAP2) (NM\_001166.4), CASP1 (ICE) (XM\_017018395.1), CASP6 (NM\_032992.2), CASP7 (NM\_001320911.1), CASP9 (XM\_005246014.2), CD40 (TNFRSF5), (NM\_000074.2), CD40LG (TNFSF5) (NM\_000074.2), CFLAR (CASPER) (NM\_001351590.1), DFFA (NM\_004401.2), FASLG (TNFSF6) (NM\_000639.2), GADD45A (NM\_001199741.1), NOL3 (NM\_001185057.2), TNFRSF10A (TRAIL-R) (NM\_003844.3).

**Anti-Apoptotic:** BCL2A1 (Bfl-1/A1) (NM\_001114735.1), BIRC3 (c-IAP1) (NM\_001165.4), CASP2 (NM\_001224.4), IGF1R (NM\_000875.4), MCL1 (NM\_001197320.1), TNFRSF11B (NM\_002546.3), TRAF2 (NM\_021138.3), XIAP (NM\_001167.3).

**Apoptosis and Autophagy:** AKT1 (NM\_001014431.1), Bax (NM\_001291428.1), BCL2 (NR\_134257.1), BCL2L1 (BCL-X) (NM\_138624.3), CASP3 (NM\_001354777.1), FAS (TNFRSF6) (NR\_028033.3), TNF (NM\_000594.3), TP53 (NM\_000546.5).

**Apoptosis and Necrosis:** ATP6V1G2 (NM\_001204078.1), CYLD (NM\_001042355.1), SPATA2 (NM\_001135773.1), SYCP2 (NM\_014258.3), TNFRSF1A (NM\_001065.3).

**Autophagy:** APP (NM\_000484.3), ATG12 (NM\_004707.3), ATG16L1 (NM\_001190266.1), ATG3 (NM\_001278712.1), ATG5 (NM\_001286106.1), ATG7 (NM\_001136031.2), BECN1 (NM\_001313998.1), CTSB (NM\_001317237.1), CTSS (NM\_001199739.1), ESR1 (ERa) (NM\_000125.3), GAA (NM\_000152.4), HTT (NM\_002111.8), IFNG (NM\_000619.2), IGF1 (NM\_000618.4), IRGM (NM\_001145805.1), MAP1LC3A (NM\_032514.3), MAPK8 (JNK1) (NM\_001278547.1), NFKB1 (NM\_001165412.1), PIK3C3

(VPS34) (NM\_001308020.1), RPS6KB1 (NM\_001272042.1), SNCA (NM\_000345.3), SQSTM1 (NM\_001142298.1), ULK1 (NM\_003565.2).

**Necrosis:** BMF (NM\_001003940.1), C1orf159 (NM\_001330306.1), CCDC103 (NM\_001258395.1), COMMD4 (NM\_001284377.1), DEFB1 (NM\_005218.3), DENND4A (NM\_001144823.2), DPYSL4 (XM\_005252658.3), EIF5B (NM\_015904.3), FOXI1 (NM\_012188.4), GALNT5 (NM\_001329868.1), GRB2 (NM\_002086.4), HSPBAP1 (NM\_001320728.1), JPH3 (NM\_001271604.2), KCNIP1 (NM\_001034837.2), MAG (NM\_001199216.1), PARP1 (ADPRT1) (NM\_001618.3), PARP2 (NM\_001042618.1), PVR (NM\_001135768.2), RAB25 (NM\_020387.3), S100A7A (NM\_176823.3), TMEM57 (NM\_001282564.1), TXNL4B (NM\_001142317.1).

В качестве образцов транскриптов использовались последовательности, приведенные в базе Gene (NCBI). Номера депонирования в NCBI указаны выше. Анализ проводился в программе Geneious 9.1.7 (New Zealand). Для оценки сравнительного уровня экспрессии использовался метод картирования массива сырых ридов на референс (оригинальный алгоритм Geneious), в качестве которого выступали транскрипты 82 приведенных выше генов.

При использовании базы данных SRX1896988, содержащей 159616690 ридов длиной 100 п.н.о., в картировании суммарно было задействовано 879116 ридов. При использовании базы данных SRX1084573, содержащей 58022863 ридов длиной 36 п.н.о., в картировании суммарно было задействовано 546585 ридов.

В зависимости от типа последовательности покрытие в обоих случаях ожидаемо варьировало в очень широких пределах от 0 до нескольких тысяч ридов на сайт.

### ***2.3.3. Морфологические и морфометрические методы исследования.***

***Методы оценки роста опухоли, динамики массы животных***  
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. Высчитывали индекс торможения роста опухоли – показатель эффективности противоопухолевого препарата, вычисляемый по формуле:  $ИТРО = [(M_{\text{контр}} - M_{\text{опыт}}) / M_{\text{контр}}] * 100\%$ , где  $M_{\text{контр}}$  – средняя масса опухоли в группе контроля, а  $M_{\text{опыт}}$  – масса опухоли опытной группы (вычисляется масса опухоли, полученная на конец эксперимента).

Для оценки динамики массы тела каждый день животное взвешивали. Для анализа результатов высчитывали истинную массу животного, вычитая теоретическую массу опухоли (умножая объем опухоли на ее плотность) из массы при взвешивании и изменение истинной массы (дельту):  $M_{\text{истинная}} = M_{\text{животного}} - V \cdot \rho$  (где  $M$  – это масса при взвешивании,  $V$  – объем опухоли,  $\rho$  – плотность привитой саркомы =  $0,83 \pm 0,08$  г/см<sup>3</sup>, рака печени =  $0,74 \pm 0,09$  г/см<sup>3</sup> и рака почки =  $0,44 \pm 0,15$  г/см<sup>3</sup>). Дельта массы тела животных определялась путем вычитания массы животного до начала эксперимента от истинной массы животного в день эксперимента.

### ***Аутопсия и гистологические методы***

После выведения животных из эксперимента, при аутопсии забирали и взвешивали внутренние органы. Для объективной оценки массы органов нами был введен Индекс массы органов  $K$ , учитывающий массу всего животного, он рассчитывался по формуле  $Индекс\ K = M_{\text{органа}} / M_{\text{животного}} * 100$ .

Для гистологического исследования образцы опухоли и внутренних органов фиксировали в 10%-м растворе забуференного нейтрального формалина, подвергали стандартной спиртовой проводке (изопропиловый спирт), после чего доводили до парафиновых блоков. Для обзорного описания изменений в опухоли и внутренних органах срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Для изучения патоморфоза опухоли применяли морфологические и морфометрические методы с использованием гистохимических методик: PAS реакция, а также окраска метиловым зеленым - пиронином по Браше для выявления ДНК и РНК, окраска на лектин зародышей пшеницы (WGA),

визуализация с помощью пероксидазы. Для изучения дезорганизации соединительной ткани в работе использовался гистохимический метод ОКГ (оранжевый Ж, красный 2С, водный голубой), предложенный Марциусом и адаптированный Д.Д. Зербино и Л.Л. Лукасевич (1984) к отечественным красителям.

Учитывали наличие дистрофических и некробиотических изменений, а также такие цитоморфометрические показатели, как: диаметр раковой клетки и диаметр ядра опухолевой клетки, соотношение диаметров раковой клетки и её ядра, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), среднее количество клеток в поле зрения, а также количество уже погибших клеток (отсутствие ядра).

### ***Иммуногистохимическое исследование образцов опухоли***

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах по стандартному иммуногистохимическому протоколу.

Использовали систему детекции REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System (Amsbio, UK) и панель моно- и поликлональных антител, представленную в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика используемых в работе для иммуногистохимии антител

| Антитело к антигену | Клон                 | Разведение | Фирма, страна-производитель |
|---------------------|----------------------|------------|-----------------------------|
| p53                 | PAb 240 (ab26)       | 1:100      | ABCAM, UK                   |
| Bax                 | clone 100/D5, ab692  | 1:100      | ABCAM, UK                   |
| Bcl-2               | ab54829              | 1:100      | ABCAM, UK                   |
| Fas-receptor        | ab15285              | 1:50       | ABCAM, UK                   |
| Fas-ligand          | ab82419              | 1:100      | ABCAM, UK                   |
| LC3B                | ab48394              | 1:200      | ABCAM, UK                   |
| Ki67                | clone SP6, ab16667   | 1:100      | ABCAM, UK                   |
| VEGF                | clone JH121, ab28775 | 1:50       | ABCAM, UK                   |
| EGFR                | [EP38Y] ab52894      | 1:100      | ABCAM, UK                   |

Характеристика изучаемых антигенов в соответствии с паспортом антитела:

1. **Ki-67** – маркер пролиферативной активности. Он является ядерным белком, антитела к антигену Ki-67 реагируют с пролиферирующими (G1, S, M, G2 стадии клеточного цикла), но не с покоящимися клетками (стадия G0), что позволяет проводить оценку пролиферативной активности в клетках опухоли. Ядерная и ядрышковая экспрессия.
2. **EGFR** – рецептор эпидермального фактора роста играет важную роль в пролиферации, выживании и дифференцировке клеток. Взаимодействие между EGFR и его лигандами приводит к стимуляции нескольких путей трансдукции, включая каскады RAS / RAF / MEK / MAPK, PLC- $\gamma$  / PKC, PI3K / AKT, JAK / STAT и NF- $\kappa$ B. Гиперфосфорилирование EGFR связано с пролиферацией клеток и тем самым с развитием опухоли. Мембранная экспрессия.
3. **VEGFA** – фактор роста, активирующий ангиогенез, васкулогенез и пролиферацию эндотелиальных клеток. Способствует миграции клеток, ингибирует апоптоз и индуцирует рост кровеносных сосудов. Секретируется в клетках. Экспрессия как мембранная, так и цитоплазматическая.
4. **P53** – вызывает остановку роста клеток опухоли или апоптоз в зависимости от типа клеток. Участвует в регуляции клеточного цикла в качестве трансактиватора, который блокирует деление клеток путем подавления экспрессии генов, необходимых для деления. Один из активированных генов, являющихся ингибитором циклин-зависимых киназ. Индукция апоптоза опосредуется через стимуляцию экспрессии антигена Бах и Fas либо подавления экспрессии Bcl-2. Экспрессия как ядерная, так и цитоплазматическая.
5. **Bcl-2** – онкопротеин, который блокирует апоптотическую гибель клетки (супрессор апоптоза). Регулирует гибель клеток путем контроля митохондриальной проницаемости мембраны. Функционирует в системе обратной связи с каспазами. Ингибирует каспазы или путем предотвращения высвобождения цитохрома из митохондрий, и / или путем связывания с активирующим апоптоз фактором (APAF-1). В нормальной лимфоидной ткани

Bcl-2 обнаруживается в малых лимфоцитах зоны мантии фолликулов, во множестве Т-клеток в Т-зонах и единичных клетках зародышевых центров. Экспрессия цитоплазматическая.

6. **Bax** – ускоряет запрограммированную гибель клеток путем связывания и антагонизма с рецептором апоптоза BCL2 или его аденовирусного гомолога E1B белка 19k. В условиях стресса проходит изменение конформации, которое затрагивает и мембрану митохондрий, что приводит к высвобождению цитохрома C, который затем вызывает апоптоз. Способствует активации CASP3 и таким образом индуцирует апоптоз. Экспрессируется в цитоплазме клеток и мембране митохондрий.

7. **Fas-ligand** – цитокин, связывающийся с рецептором TNFRSF6 / Fas, который трансформирует апоптотический сигнал в клетке. Может быть вовлечен в апоптоз, опосредованный Т-клетками. Локализуется в клеточной мембране, может секретироваться и выделяться во внеклеточную жидкость и в самой клетке.

8. **Fas-receptor** – рецептор для TNFSF6 / FasLG. Адаптивная молекула FADD активирует каспазу-8. Получающийся в результате индуцирующий смерть сигнальный комплекс (DISC) выполняет протеолитическое действие и активирует каспазу-8, которая инициирует последующий каскад каспаз (аспартатспецифический цистеин протеазы), вызывающий апоптоз. Локализуется в клеточной мембране, может секретироваться.

9. **LC3B** – белок, участвующий в формировании аутофагосомальных вакуолей (аутофагосом). Характерно цитоплазматическое окрашивание, возможно окрашивание отдельных мембран, мембран аутофагосом.

При окраске с иммуногистохимическими маркерами использовали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, окрашивание на каждый маркер проводилось для всех образцов тканей одновременно для создания стандартизации условий окраски и повышения объективности полученных результатов.

Результаты иммуногистохимической реакции оценивали следующим образом: подсчитывали процент клеток, дающих положительную экспрессию не менее чем в 30 полях зрения, далее высчитывали для каждой из исследуемых групп средний процент клеток с экспрессией. Степень выраженности экспрессии оценивали полуколичественным методом: слабая (+), умеренная (++), выраженная (+++).

**Морфометрия.** Для более объективной оценки изменений органов нами были использованы следующие морфометрические показатели в органах (Автандилов Г.Г., 2006). В печени: количество неизмененных гепатоцитов, количество лимфоцитов, количество непаренхиматозных элементов и общее количество клеток в поле зрения; в почках: высота эпителия извитых канальцев и площадь клубочков; в легких: площадь перибронхиальных лимфоидных инфильтратов; в селезенке: площадь лимфатических фолликулов и светлых центров. Морфометрические измерения и микрофотографирование проводили не менее чем в 10 полях зрения каждого микропрепарата с помощью Микровизора медицинского проходящего света  $\mu$ Vizo-103 (ЛОМО, Россия). Использовали увеличение 246,4 и 774.

#### 2.3.4. Статистические методы анализа

Весь статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel. Нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения показателей, полученных в исследовании при их параметрическом распределении, но без равенства дисперсий, был использован критерий Крамера-Уэлча (T), при котором разность средних арифметических двух выборок (контрольной и экспериментальной) делится на естественную оценку среднего квадратического отклонения этой разности. Данный метод позволяет и допускает множественные сравнения в группах (Welch B.L., 1951; Гржибовский А.М., 2008). При данном методе отличия средних с вероятностью более 95% ( $p > 0,05$ ) определяются при  $T \geq 1,96$ . При

параметрическом распределении в исследуемых группах вычисляли среднее арифметическое ( $M$ ) (отражает среднее значение полученного показателя), среднеквадратичное отклонение ( $\delta$ ) (отражает разброс полученных показателей от полученного среднего значения).

При непараметрическом распределении данные проверяли на возможность множественных сравнений критерием Краскела-Уоллиса, а значимость различий между конкретными группами определяли при помощи критерия Манна-Уитни ( $U/Z$ -критерий) с вычислением медианы, 25 и 75 перцентиля, максимума и минимума. При данном методе отличия медиан определяются при  $Z \geq 1,96$  на уровне значимости  $p < 0,05$  (с вероятностью более 95 %) (Гланц С., 1998).

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена использовали для выявления и оценки корреляционных связей между двумя рядами сопоставляемых количественных показателей. Если ранги показателей, в большинстве случаев, упорядоченных по степени возрастания или убывания, совпадали (большему значению одного показателя соответствовало большее значение другого показателя), делался вывод о наличии прямой корреляционной связи. Если ранги показателей имели противоположную направленность (большему значению одного показателя соответствовало меньшее значение другого), то говорили об обратной связи между показателями (Гланц С., 1998).

### **ГЛАВА 3. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НЕОПУХОЛЕВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO***

#### **3.1. Морфологические изменения неопухолевых клеток эмбриона почки свиньи (SPEV) и опухолевых клеток рака шейки матки (HeLa) в тесте «живые и мертвые»**

Важной задачей терапии опухолевых заболеваний, как известно, является максимальное сохранение нормальных, неопухолевых клеток и максимальное разрушение опухолевых клеток. Нами исследована чувствительность неопухолевых эпителиальных клеток (на примере клеточной культуры эпителия почек эмбриона свиньи SPEV) и опухолевых клеток (на примере опухолевой культуры рака шейки матки человека HeLa) через сутки после воздействия флавоноидсодержащих экстрактов бессмертника песчаного, антоциановой формы кукурузы обыкновенной и аврана лекарственного.

#### ***Морфология клеток эмбриона почки свиньи (SPEV) и опухолевых клеток рака шейки матки (HeLa) в контроле***

В контроле клетки, как SPEV, так и HeLa лежали ровным монослоем, плотно прилегали друг к другу, только единичные клетки не были прикреплены к подложке. Клетки SPEV в подавляющем большинстве имели призматическую форму, а также треугольную и округлую формы, встречались единичные клетки по типу синцития или синпласта. Клетки культуры HeLa имели веретенообразную и полигональную форму. Цитоплазма их была гомогенной, ядро четко оформленным. Общее количество клеток в поле зрения составило  $562 \pm 16,1$  в культуре SPEV и  $510 \pm 12,61$  в культуре HeLa. Мертвые клетки не определялись в обеих культурах (Таблица 3).

#### ***Морфология клеток при воздействии экстракта бессмертника***

На клеточных культурах SPEV и HeLa под воздействием экстракта бессмертника наблюдали значимое увеличение процента мертвых клеток,

свидетельствующее о цитотоксичности экстракта, в культурах SPEV (на  $20 \pm 1,01\%$ ) и HeLa (на  $30,3 \pm 20,5\%$ ) при одинаковой концентрации экстракта 8,6 мг/мл. Однако в дальнейшем при увеличении концентрации в два раза – до 17,3 мг/мл, доля мертвых клеток SPEV ( $81,5 \pm 3,6\%$ ) возросла более чем в четыре раза, в то время как доля клеток HeLa ( $46,5 \pm 6,12\%$ ) – только в полтора раза (Рисунок 1-2; Таблица 3). Следовательно, культура SPEV оказалась более чувствительной к экстракту бессмертника.

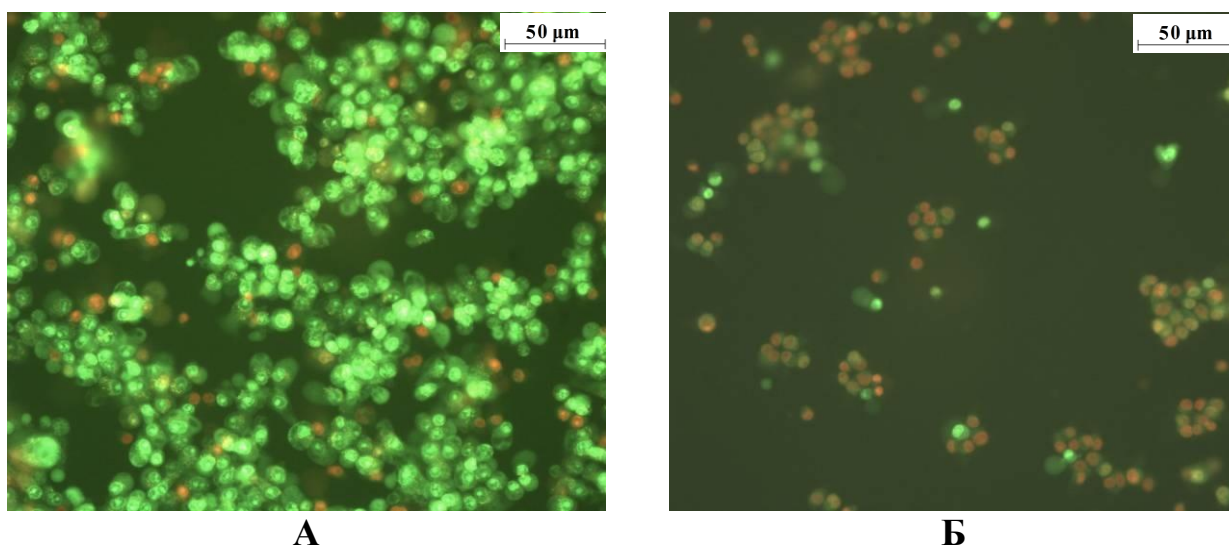


Рисунок 1. Клеточная культура SPEV под воздействием экстракта бессмертника при 8,6 мг/мл (А) и 17,3 мг/мл (Б), флуоресценция, окраска акридиновым оранжевым (зеленый) и йодистым пропидием (красный). Ув. 200.

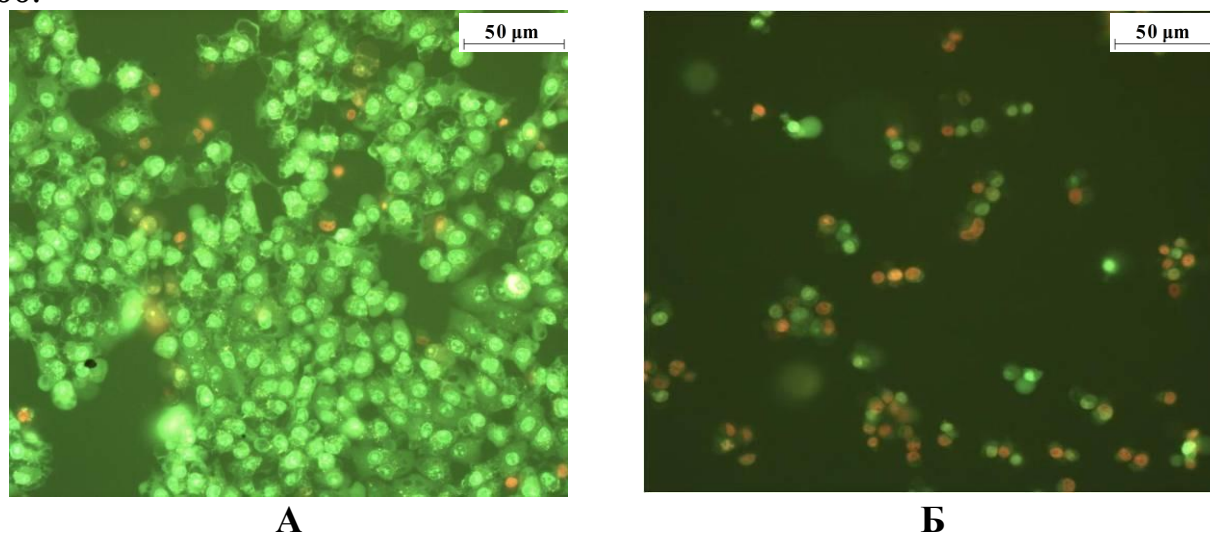


Рисунок 2. Клеточная культура HeLa под действием экстракта бессмертника в концентрациях 8,6 мг/мл (А) и 17,3 мг/мл (Б).

Флуоресценция, окраска акридиновым оранжевым (зеленый) и йодистым пропидием (красный). Ув. 200.

Таблица 3 – Морфологические показатели клеточных культур SPEV и HeLa под действием экстракта бессмертника песчаного

| Показатель                                         | Контроль      | 0,53<br>мг/мл | 1,07<br>мг/мл | 2,15<br>мг/мл  | 4,3<br>мг/мл                | 8,6<br>мг/мл                 | 17,3<br>мг/мл                |
|----------------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <b>Клеточная культура SPEV</b>                     |               |               |               |                |                             |                              |                              |
| <b>СКК (количество клеток)</b>                     | 562<br>±16,1  | 576<br>±24,5  | 519<br>±76,4  | 551<br>±40,3   | <b>406</b><br><b>±47,2*</b> | <b>421</b><br><b>±31,5*</b>  | <b>176</b><br><b>±30*</b>    |
| <b>Доля (%) мертвых клеток в п/зр</b>              | 1,1<br>±0,4   | 0±0           | 0±0           | 0,2<br>±0,09   | 0,4<br>±0,16                | <b>20</b><br><b>±1,01*</b>   | <b>81</b><br><b>±3,6*</b>    |
| <b>Доля (%) кариопикноза и кариорексиса в п/зр</b> | 0±0           | 0±0           | 0,6<br>±0,5   | 1<br>±0,02     | 1,3<br>±0,01                | <b>30,7</b><br><b>±2,3*</b>  | 0,07<br>±0,002               |
| <b>Клеточная культура HeLa</b>                     |               |               |               |                |                             |                              |                              |
| <b>СКК (количество клеток)</b>                     | 510<br>±12,61 | 427<br>±28,6  | 419<br>±20,9  | 307<br>±22,6   | <b>284</b><br><b>±30,3*</b> | <b>230</b><br><b>±50,5*</b>  | <b>257</b><br><b>±62,2*</b>  |
| <b>Доля (%) мертвых клеток в п/зр</b>              | 0,47<br>±0,3  | 0±0           | 0±0           | 0±0            | 0±0                         | <b>30,3</b><br><b>±20,5*</b> | <b>46,5</b><br><b>±6,12*</b> |
| <b>Доля (%) кариопикноза и кариорексиса в п/зр</b> | 0±0           | 0±0           | 0±0           | 0,01<br>±0,005 | 0,01<br>±0,008              | 0,02<br>±0,02                | 0,06<br>±0,004               |

*Примечание:* \* достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,56$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

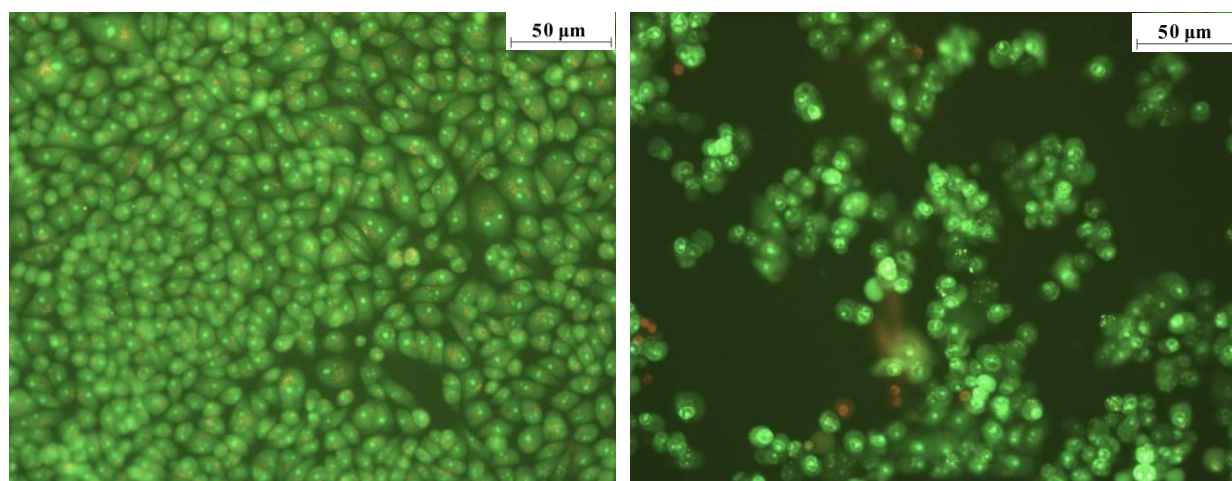
Кроме того, мы наблюдали эффекты кариопикноза и кариорексиса, которые рассматривали как этапы апоптоза или некробиоза клетки, предшествующие кариолизису. В результате кариопикноза ядро клетки уменьшалось в объеме за счет потери влаги, происходила концентрация его хроматина и отщепление нуклеиновой кислоты от нуклеопротеидов, в связи с чем ядро таких клеток интенсивнее окрашивалось красителем, и эффект легко идентифицировался. В результате кариорексиса оболочка ядра клетки разрушалась, и проникающие в цитоплазму клетки нуклеиновой кислоты образовывали отдельные глыбки, что являлось признаками апоптоза. По этим эффектам устанавливали количество клеток, гибнущих путем апоптоза. В культуре SPEV апоптоз наблюдали, начиная с низкой концентрации экстракта (1,07 мг/мл), а значимое увеличение апоптотических клеток – при концентрации 8,6 мг/мл. В опухолевой культуре HeLa путем апоптоза погибали единичные клетки, начиная с концентрации 2,15 мг/мл (Таблица 3),

что свидетельствовало о невыраженной апоптотической активности экстракта бессмертника.

Таким образом, к экстракту бессмертника были чувствительны клетки как опухолевых, так и неопухолевых культур. С увеличением концентрации уменьшалось СКК и возрастало количество мертвых клеток. Неопухолевые клетки оказались более чувствительными к экстракту, чем опухолевые. Определены концентрации экстракта, при которых он оказывал цитостатический (4,3 мг/мл) и цитотоксический (8,6 мг/мл) эффекты; апоптотическая активность в отношении опухолевых клеток HeLa не выражена.

***Морфология клеток при воздействии экстрактов антоциановой кукурузы.*** Были исследованы два экстракта: один, полученный из антоциановой диплоидной формы кукурузы обыкновенной, выросшей в засушливых условиях (ВЗУ); другой – из кукурузы той же формы, но выросшей при обычных условиях увлажнения (ВОУ). По химическому составу экстракты различались количественным содержанием суммы флавоноидов – у кукурузы ВЗУ флавоноидов содержалось в два раза больше (глава 2.1).

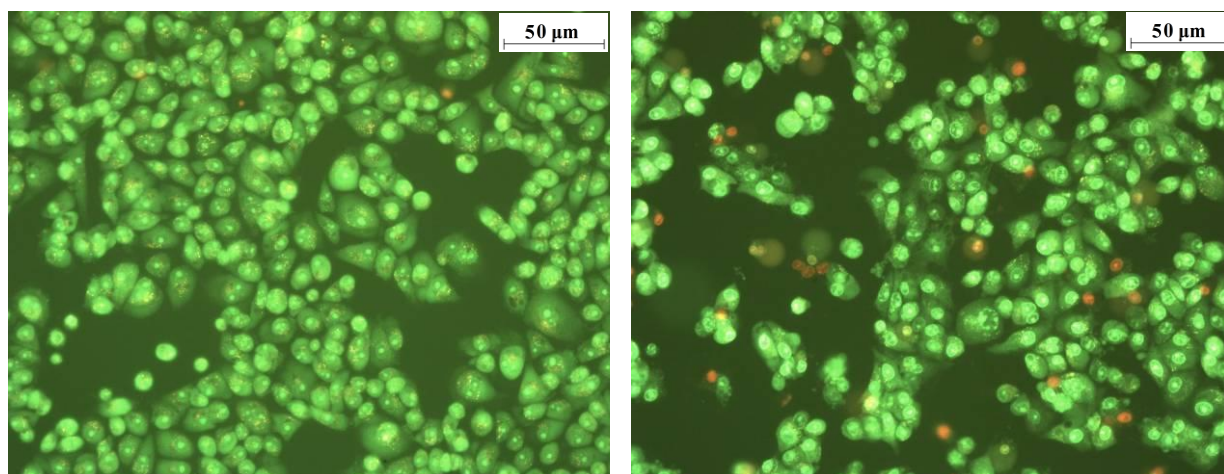
СКК статистически не менялось, как и морфология клеток, при воздействии обоих экстрактов кукурузы на клеточные культуры SPEV и HeLa в диапазоне концентраций от 0,28 мг/мл до 2,25 мг/мл, что свидетельствовало об отсутствии у них цитостатического эффекта (Таблица 4). Уменьшение СКК и изменение морфологии клеток происходило начиная с концентрации 4,5 мг/мл и выше, следовательно, оба экстракта, начиная с данной концентрации, подавляли пролиферативную активность клеток и обладали цитостатическим эффектом в отношении как опухолевых, так и неопухолевых клеток. Цитотоксическая активность в отношении как неопухолевых, так и опухолевых клеток под воздействием обоих экстрактов кукурузы отмечена при максимальной концентрации (9 мг/мл) (Рисунки 3,4).



А

Б

Рисунок 3. Клеточная культура SPEV под действием экстракта кукурузы ВЗУ при 0,28 мг/мл (А) и 9 мг/мл (Б), флуоресцентная окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 200.



А

Б

Рисунок 4. Клеточная культура HeLa под действием экстракта кукурузы ВЗУ при 4,5 мг/мл (А) и 9 мг/мл (Б), флуоресцентная окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 200.

При этом, при действии экстракта кукурузы ВЗУ наиболее чувствительной оказалась культура опухолевых клеток. Так, в культуре при 9 мг/мл этого экстракта погибало  $4,2 \pm 1,8\%$  клеток HeLa и только  $2,3 \pm 0,8\%$  клеток SPEV. В то время как при действии экстракта кукурузы БОУ гибель клеток (как опухолевых, так и неопухолевых) была существенно выше: 11 – 13,2%. Полученные нами данные свидетельствовали, с одной стороны, о сравнительно более высокой неизбирательной цитотоксической активности

экстракта кукурузы ВОУ, а с другой – об избирательном действии в отношении опухолевых клеток экстракта кукурузы ВЗУ (Таблица 4).

Таблица 4 – Морфологические показатели клеточных культур SPEV и HeLa под действием экстрактов кукуруз ВЗУ и ВОУ

| Группа                                             | Контроль      | 0,28<br>мкг/мл | 0,56<br>мкг/мл | 1,12<br>мкг/мл | 2,25<br>мг/мл  | 4,5<br>мг/мл                | 9<br>мг/мл                  |
|----------------------------------------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Кукуруза ВЗУ на SPEV</b>                        |               |                |                |                |                |                             |                             |
| <b>СКК (количество клеток)</b>                     | 562<br>±16,1  | 523<br>±24,4   | 598<br>±51,4   | 619<br>±115    | 538<br>±49,5   | <b>434</b><br><b>±74,1*</b> | <b>373</b><br><b>±46,6*</b> |
| <b>Доля (%) мертвых клеток в п/зр</b>              | 1,1<br>±0,4   | 0,1<br>±0,1    | 1,3<br>±1,3    | 1,9<br>±0,2    | 0,22<br>±0,1   | 0,4<br>±0,1                 | <b>2,3</b><br><b>±0,8*</b>  |
| <b>Доля (%) карнопикноза и карнопексиса в п/зр</b> | 0             | 0              | 0              | 0              | 0              | 0                           | 0,003                       |
| <b>Кукуруза ВЗУ на HeLa</b>                        |               |                |                |                |                |                             |                             |
| <b>СКК (количество клеток)</b>                     | 510<br>±12,6  | 504<br>±6      | 523<br>±23,5   | 441<br>±6      | 419,6<br>±20,2 | <b>332</b><br><b>±34*</b>   | <b>330</b><br><b>±14,1*</b> |
| <b>Доля (%) мертвых клеток в п/зр</b>              | 0,47<br>±0,3  | 0±0            | 0±0            | 0±0            | 0,3<br>±0,3    | 0,2<br>±0,2                 | <b>4,2</b><br><b>±1,8*</b>  |
| <b>Доля (%) карнопикноза и карнопексиса в п/зр</b> | 0             | 0              | 0              | 0              | 0              | 0                           | 0                           |
| <b>Кукуруза ВОУ на SPEV</b>                        |               |                |                |                |                |                             |                             |
| <b>СКК (количество клеток)</b>                     | 562<br>±16,1  | 571,3<br>±53   | 604<br>±60     | 557,2<br>±32,5 | 451<br>±38,7   | <b>367</b><br><b>±44,7*</b> | <b>327</b><br><b>±33,7*</b> |
| <b>Доля (%) мертвых клеток в п/зр</b>              | 1,1<br>±0,4   | 0±0            | 0±0            | 0±0            | 0±0            | 0,7<br>±0,4                 | <b>11</b><br><b>±1,9*</b>   |
| <b>Доля (%) карнопикноза и карнопексиса в п/зр</b> | 0             | 0              | 0              | 0              | 0              | 0                           | 0                           |
| <b>Кукуруза ВОУ на HeLa</b>                        |               |                |                |                |                |                             |                             |
| <b>СКК (количество клеток)</b>                     | 510<br>±12,61 | 506<br>±28,8   | 528<br>±27,5   | 384<br>±4,7    | 328<br>±32,1   | <b>330</b><br><b>±7,1*</b>  | <b>334</b><br><b>±74,9*</b> |
| <b>Доля (%) мертвых клеток в п/зр</b>              | 0,47<br>±0,3  | 0,07<br>±0,06  | 0,06<br>±0,06  | 0,17<br>±0,08  | 0,41<br>±0,5   | 0,40<br>±0,2                | <b>13,2</b><br><b>±3,2*</b> |
| <b>Доля (%) карнопикноза и карнопексиса в п/зр</b> | 0             | 0              | 0              | 0              | 0              | 0                           | 0                           |

Примечание: \* достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,56$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

Апоптотический эффект в отношении клеточных культур SPEV и HeLa под действием экстрактов кукурузы не был выявлен. Кроме того, экстракт кукурузы ВЗУ при низких концентрациях (0,28 - 1,12 мкг/мл) оказывал протекторный эффект в культуре клеток HeLa, снижая количество мертвых клеток по сравнению с контролем. Экстракт кукурузы ВОУ при тех же

концентрациях (0,28 - 1,12 мкг/мл) оказывал протекторный эффект в обеих культурах клеток HeLa и SPEV.

Таким образом, к экстрактам антоциановой кукурузы оказались чувствительны как опухолевые, так и неопухолевые клетки. Определены концентрации экстрактов кукурузы, при которых они оказывали цитостатический (4,5 мг/мл) и цитотоксический (9 мг/мл) эффекты. Наибольшей цитотоксической активностью обладал экстракт кукурузы ВОУ. Опухолевые клетки оказались более чувствительными к экстракту кукурузы ВЗУ, чем нормальные клетки. Апоптотической активностью экстракты кукурузы в отношении культуры HeLa не обладали.

***Морфология клеток при воздействии экстракта аврана.*** Было установлено, что при влиянии экстракта аврана на культуру SPEV СКК при концентрации начиная с 0,4 мг/мл было ниже, чем в контроле, что свидетельствовало о цитостатическом эффекте (Рисунки 5, 6, Таблица 5).

В отношении клеток HeLa наблюдалась линейная зависимость: с увеличением концентрации экстракта аврана СКК становилось меньше и возрастало количество мертвых клеток (Рисунки 5,6, Таблица 5).

Значимое уменьшение СКК по сравнению с контролем на культуре SPEV наблюдалось в диапазоне концентраций от 0,4 до 1,5 мг/мл (Таблица 3), т.е. в данном диапазоне экстракт подавлял пролиферативную активность неопухолевых клеток, но не вызывал гибель.

Снижение пролиферативной активности клеток SPEV и развитие гибели клеток наблюдали при концентрации 3 мг/мл и выше. В отношении опухолевых клеток HeLa значимое уменьшение СКК наблюдалось уже при концентрации 0,375 мг/мл. Следовательно, опухолевые клетки оказались более чувствительными к действию даже небольших концентраций экстракта аврана.

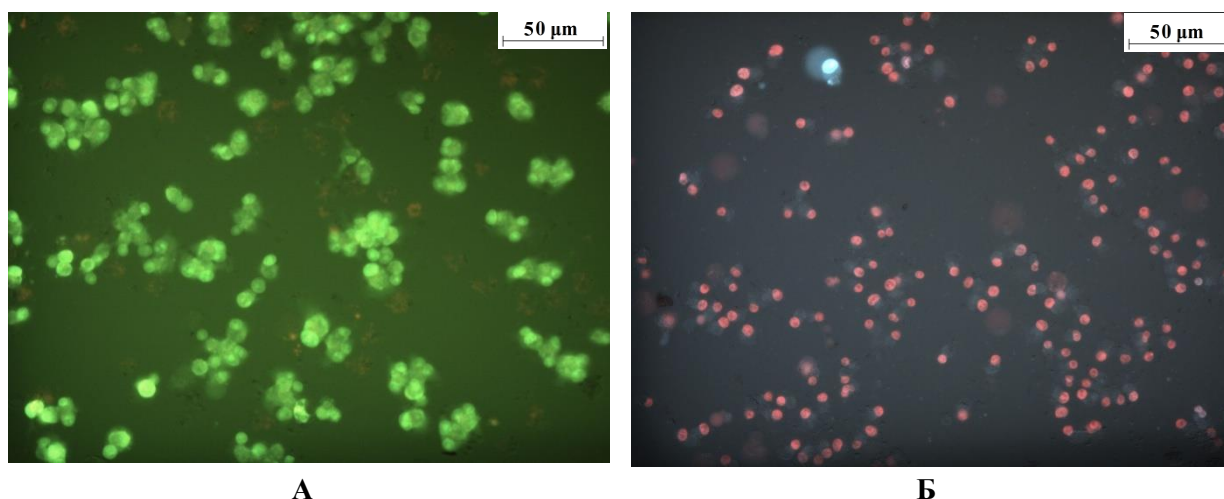


Рисунок 5. Клеточная культура HeLa под действием экстракта аврана при 0,75 мг/мл (А) и 3 мг/мл (Б), флуоресценция, окраска акридиновым оранжевым (зеленый) и йодистым пропидием (красный цвет). Ув. 200.

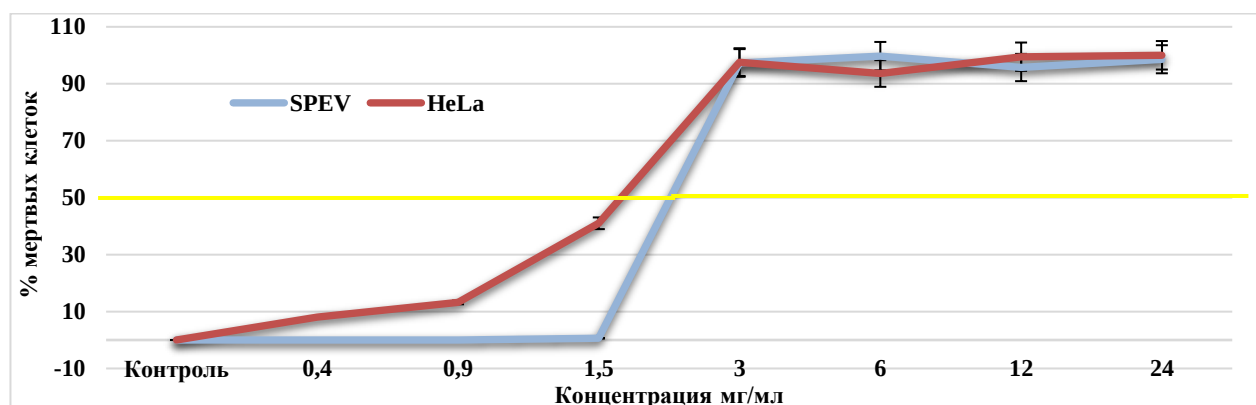


Рисунок 6. Процентное содержание мертвых клеток SPEV и HeLa под действием экстракта аврана.

Культура HeLa оказалась более чувствительной к экстракту аврана, т.е. определенные концентрации экстракта избирательно влияли на опухолевые и неопухолевые клетки, поэтому цитотоксичность экстракта аврана в культурах SPEV и HeLa была отмечена при разных концентрациях: у клеток SPEV – при 3 мг/мл, у HeLa – при 0,4 мг/мл (Таблица 3).

Начиная с 0,375 мг/мл, экстракт обладал цитотоксическим эффектом в отношении опухолевых клеток. При этом подавляющее большинство погибших опухолевых клеток при концентрации 0,4-1,5 мг/мл находилось на стадии пикноза, что свидетельствовало о высокой апоптотической активности экстракта. В диапазоне концентраций 3-24 мг/мл при максимальной гибели

опухолевых клеток (Таблица 4) установить, каким именно образом происходила гибель, было невозможно. По-видимому, при высоких концентрациях экстракт оказывал достаточно быстрое воздействие на опухолевые клетки.

Таблица 5 – Морфологические показатели клеточных культурах SPEV и HeLa под действием экстракта аврана лекарственного

| Группа                                                     | Контроль      | 0,4<br>мг/мл        | 0,9<br>мг/мл         | 1,5<br>мг/мл        | 3<br>мг/мл          | 6<br>мг/мл          | 12<br>мг/мл         | 24<br>мг/мл        |
|------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| <b>Влияние экстракта аврана на клеточную культуру SPEV</b> |               |                     |                      |                     |                     |                     |                     |                    |
| <b>СКК (количество клеток)</b>                             | 562<br>±16,1  | <b>426</b><br>±11*  | <b>470</b><br>±13*   | <b>454</b><br>±15*  | <b>306</b><br>±29*  | <b>381</b><br>±41*  | <b>356</b><br>±32*  | <b>376</b><br>±34* |
| <b>Доля (%) мертвых клеток в п/зр</b>                      | 0<br>±0       | 0<br>±0             | 0<br>±0              | 0,6<br>±0,5         | <b>97,3</b><br>±12* | <b>99,7</b><br>±9*  | <b>95,7</b><br>±11* | <b>98,6</b><br>±8* |
| <b>Доля (%) кариопикноза и кариорексиса в п/зр</b>         | 0<br>±0       | 0<br>±0             | 0<br>±0              | 0<br>±0             | 0<br>±0             | 0<br>±0             | 0<br>±0             | 0<br>±0            |
| <b>Влияние экстракта аврана на клеточную культуру HeLa</b> |               |                     |                      |                     |                     |                     |                     |                    |
| <b>СКК (количество клеток)</b>                             | 510<br>±12,61 | <b>161</b><br>±13*  | <b>133,3</b><br>±10* | <b>123,0</b><br>±9* | <b>132</b><br>±11*  | <b>95,4</b><br>±12* | <b>66</b><br>±7*    | <b>142</b><br>±10* |
| <b>Доля (%) мертвых клеток в п/зр</b>                      | 0±0           | <b>8</b><br>±1*     | <b>13,2</b><br>±1,5* | <b>41</b><br>±5*    | <b>97,6</b><br>±8*  | <b>93,6</b><br>±10* | <b>99,5</b><br>±12* | <b>100</b><br>±8*  |
| <b>Доля (%) кариопикноза и кариорексиса в п/зр</b>         | 0             | <b>4,4</b><br>±0,3* | <b>6,2</b><br>±0,5*  | <b>19,1</b><br>±1*  | 0<br>±0             | 0<br>±0             | 0<br>±0             | 0<br>±0            |

*Примечание:* \* достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

Таким образом, в клетках культуры SPEV под действием экстракта аврана наблюдали нелинейную зависимость: большие концентрации приводили к повышению пролиферативной активности, а малые вызывали уменьшение СКК. Чувствительность опухолевых клеток к экстракту была значительно выше, чем неопухолевых, и была обусловлена его концентрацией: с увеличением концентрации уменьшалось СКК и возрастало количество мертвых клеток. При этом экстракт уже при минимальной из исследованных концентраций (0,4 мг/мл) оказывал цитостатический и цитотоксический эффекты в отношении опухолевых клеток, обладая также и выраженной апоптотической активностью.

***Определение полулетальной концентрации экстрактов аврана,  
бессмертника и кукурузы методом пробит-анализа.***

Полулетальная концентрация (LC50) – это концентрация, вызывающая 50% гибель клеток в испытуемой группе в течение суток. В отношении клеток в культуре понятие LC50 может быть принято условно, т.к. за сутки может происходить увеличение количества клеток путем их деления, в результате количество клеток к концу эксперимента может оказаться больше, чем в начале эксперимента. Однако такой показатель, как LC50 может быть удобен для сравнительной оценки биологической активности растительных экстрактов. Он основан на морфологическом признаке гибели клеток – окраске ядра клетки йодистым пропидием в красный цвет.

Методом пробит-анализа (Коросов И.О., Калинкина И.О., 2003), учитывая все изученные концентрации экстрактов на клеточных культурах SPEV и HeLa, были рассчитаны концентрации экстрактов, при которых в течение 24 часов после инкубации с экстрактом наступала гибель 50% клеток.

LC50 при воздействии экстракта аврана в культуре HeLa составило 0,4 мг/мл, а в культуре SPEV – 2,5 мг/мл. Полученные результаты о селективном воздействии на опухолевые клетки делает авран более перспективным для дальнейшего изучения.

LC50 при воздействии экстракта бессмертника на культуру HeLa составило 17,3 мг/мл, а на культуру SPEV – 12,95 мг/мл.

Так, LC50 при воздействии экстракта кукурузы ВЗУ на культуру HeLa составило 84 мг/мл, а на культуру SPEV – 54 мг/мл. LC50 при действии экстракта кукурузы ВОУ на культуру HeLa составило 54 мг/мл, а на культуру SPEV – 72 мг/мл.

Проведенный нами скрининг четырех флавоноидсодержащих экстрактов (бессмертника, двух антоциановых форм кукурузы и аврана) в отношении двух клеточных культур SPEV и HeLa (Таблица 4) позволяет сделать следующие заключения:

1. Экстракт бессмертника более активен в отношении неопухолевых клеток, не вызывает апоптоз в опухолевых клетках, что делает менее перспективным его потенциальное применение для противоопухолевой терапии по сравнению с теми экстрактами, к которым более чувствительными оказываются опухолевые клетки;

2. Экстракт антоциановой кукурузы ВЗУ проявил большую активность в отношении опухолевых клеток, однако экстракты кукурузы практически не вызывают морфологических изменений в опухолевых клетках даже при больших концентрациях и приводят к гибели незначительное количество клеток. Кроме того, экстракт не вызывает апоптоз в опухолевых клетках;

3. При влиянии экстракта аврана опухолевые клетки проявили максимальную чувствительность даже при минимальных его концентрациях, что приводило к резкому снижению количества клеток и массивной их гибели, а также было отмечено, что при определенных концентрациях он вызывает апоптоз в опухолевых клетках, что делает его наиболее перспективным для дальнейшего исследования как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*.

Далее нами исследованы морфофункциональные изменения в опухолевых клетках рака шейки матки человека (HeLa) при более длительных экспозициях экстрактов в течение трех суток, что было необходимо для выявления клеточной гибели, в т.ч. и ПКГ (апоптоза и аутофагии) под действием лекарственных средств с цитостатическими и цитотоксическими эффектами.

### 3.2. Морфологические изменения в опухолевых клетках рака шейки матки человека (HeLa) при разной длительности экспозиции экстрактов

**Описание клеток в контроле.** Через 24 ч после посева и инкубации культура клеток HeLa (Таблица 6, Рисунок 7) была представлена неполным ровным монослоем клеток, плотно прилегающих друг к другу и занимающих большую часть поверхности. В основном клетки были прикреплены к подложке, открепленными от подложки были только единичные клетки. Клетки имели веретеновидную, грушевидную или полигональную форму. Встречались единичные клетки по типу синцития или симпласта. Клетки с гомогенной цитоплазмой и четко оформленным ядром, при окраске акридиновым оранжевым и йодистым пропидием в цитоплазме клеток в приядерной области появлялись мелкие оранжевые гранулы лизосом. Среднее количество клеток в поле зрения (СКК) составило 108,7. Мертвые клетки были единичными (Рисунок 7).

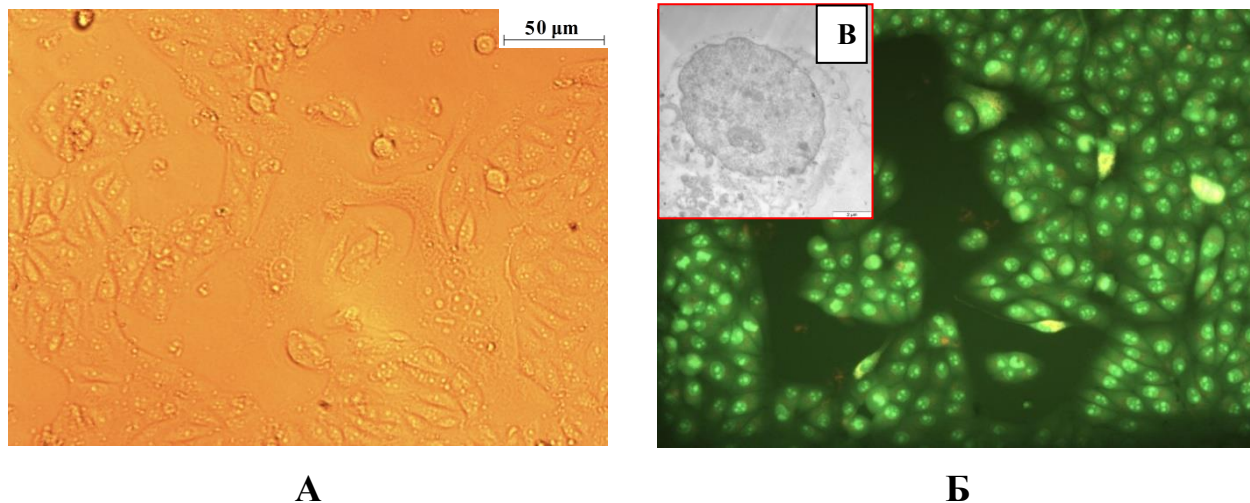


Рисунок 7. Клетки культуры HeLa через 24 ч в контроле: А – фазовый контраст; Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 200; В – электронная микроскопия, определяется ядро, ядрышко в нем и органеллы в цитоплазме. Ув. 12000.

Количество ядрышек варьировало от одного до четырех, чаще было два – три (Рисунок 8 А), что свидетельствовало об активном синтезе рРНК в ядрышкообразующих зонах хромосом. В единичных клетках были встречены одиночные аутофагосомы, не соединенные с лизосомами (Рисунок 8 Б, В).

Обнаружена одна клетка с двумя крупными аутофагосомами округлой формы и со смещенным к периферии ядром (Рисунок 8 Б, В). Апоптотических телец не выявили.

Через 48 часов изменения морфологии клеток не наблюдали, но выявили увеличение СКК до 145,3 и образование монослоя, представленного прилегающими друг к другу клетками. Апоптотических телец не выявлено, мертвые клетки единичны. Количество ядрышек варьировало от одного до двух, что свидетельствовало о снижении синтетической активности. Наблюдалась тенденция распределения лизосом из приядерной области по всей площади клетки. Клетки с аутофагосомами были единичными.

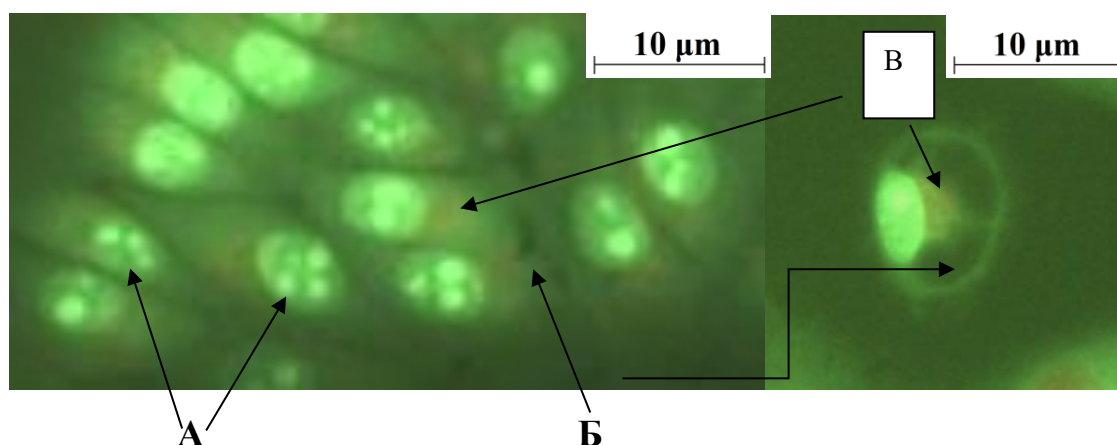


Рисунок 8. Клетки культуры HeLa через 24 ч в контроле: А – ядрышки, Б – аутофагосомы, В – лизосомы. Флуоресцентная микроскопия при окраске йодистым пропидием и акридиновым оранжевым. Ув. 1000.

Через 72 часа также не наблюдали изменения морфологии клеток, СКК увеличилось до 161,1, образовался полный монослой, представленный тесно прилегающими друг к другу клетками. Апоптотических телец не выявлено, мертвые клетки единичны. Количество ядрышек варьировало от одного до пяти, что свидетельствовало о восстановлении синтетической активности. Лизосомы обнаруживались в приядерной области клетки, в том числе в гигантской триплоидной клетке с аутофагосомой (Рисунок 9).

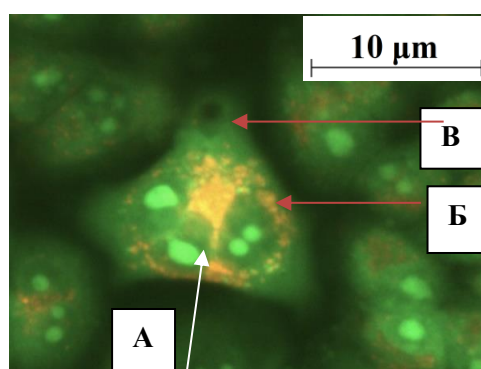


Рисунок 9. Гигантская многоядерная клетка с аутофагосомой: А – ядра клетки, Б – лизосомы, В – аутофагосома. Флуоресцентная микроскопия при окраске йодистым пропидием и акридиновым оранжевым. Ув. 1000.

Появление в опухолевых клетках аутофагосом в контроле, скорее всего, вызвано обеднением среды при трехсуточном культивировании.

***Морфологические изменения под действием экстракта бессмертника.*** Через 24 ч в культуре HeLa под действием экстракта бессмертника (Таблица 6, Рисунок 10) СКК при разных концентрациях варьировало от 72,8 до 80,1, в то время как в контроле их количество составляло 108,7, что свидетельствовало о слабом цитостатическом эффекте экстракта с концентрацией 0,009 - 10 мг/мл. Форма прикрепленных клеток, как и в контроле, была веретеновидной, грушевидной или полигональной. Монослой клеток занимал меньшую часть поверхности. Клетки имели четко оформленные ядра. Количество ядрышек от одного до трех свидетельствовало о синтетической активности ядрышкообразующих участков. Одна мертвая клетка округлой формы, окрашенная йодистым пропидием в оранжево-красный цвет, определялась только при максимальной концентрации (10 мг/мл), что подтвердило отсутствие цитотоксического эффекта в диапазоне исследованных концентраций.

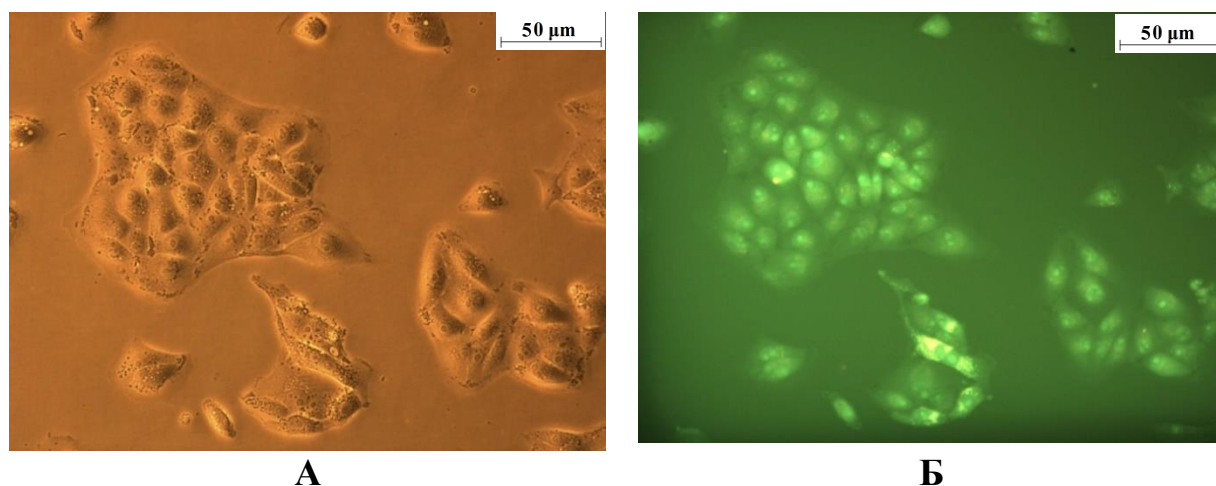


Рисунок 10. Клетки культуры HeLa через 24 ч после инкубации с экстрактом бессмертника при 10 мг/мл: А – фазовый контраст, Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 200.

Через 24 ч и затем через 48 ч при всех исследованных концентрациях в отдельных клетках отмечали появление аутофагосом, число которых, в отличие от контроля, варьировало от 2-3 до 10 и более в одной клетке (Рисунок 11). В ряде клеток наблюдали перемещение лизосом из приядерной области к аутофагосомам, в результате чего образовывались аутолизосомы. Значимое увеличение количества клеток с аутофагосомами наблюдали при максимальной концентрации, следовательно, экстракт обладал аутофагической активностью.

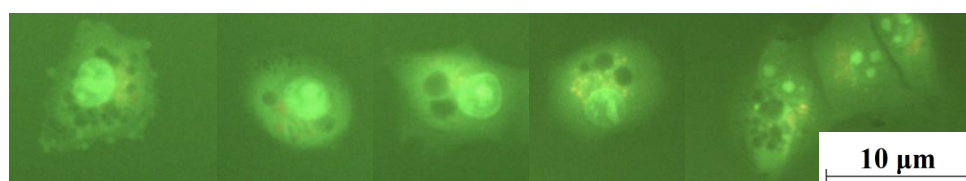


Рисунок 11. Клетки культуры HeLa с аутофагосомами и аутолизосомами через 24 часа после инкубации с экстрактом бессмертника в концентрации 10 мг/мл, флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 1000.

Образование в опухолевых клетках аутофагосом (Рисунок 11) под действием экстракта бессмертника при концентрации 10 мг/мл в первые сутки (10%) в итоге позволило выживать большему количеству клеток в течение последующих суток, в то время как снижение количества клеток с

аутофагосомами до 6,5% приводило к низкой выживаемости клеток (Таблица 5). Однако, даже несмотря на образование аутофагосом, часть клеток с аутофагосомами все же погибала (Рисунок 12). Клетки с признаками апоптоза выявлены при концентрациях от 0,009 до 0,045 мг/мл (Рисунок 13).

Таблица 6 – Морфологические показатели в клеточной культуре HeLa на протяжении трех дней под действием экстракта бессмертника песчаного

| Группа                             | Контроль     | 0,009-<br>0,045<br>мг/мл | 0,75<br>мг/мл | 1,25<br>мг/мл | 2,5<br>мг/мл | 5<br>мг/мл   | 10<br>мг/мл  |
|------------------------------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>24 часа</b>                     |              |                          |               |               |              |              |              |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)         | 108,7<br>±11 | 74<br>±8,7*              | 80<br>±8,4*   | 76<br>±7,5*   | 79<br>±9,7*  | 77<br>±6,3*  | 72<br>±4,5*  |
| % мертвых клеток в п/зр            | 0<br>±0      | 0<br>±0                  | 0<br>±0       | 0<br>±0       | 0<br>±0      | 0<br>±0      | 0<br>±0      |
| % Пикноза в п/зр                   | 0<br>±0      | до 2<br>клеток           | 0<br>±0       | 0<br>±0       | 0<br>±0      | 0<br>±0      | 0<br>±0      |
| % клеток с аутофагосомами от живых | 1<br>±1      | 1<br>±0,9                | 1<br>±0,3     | 1<br>±0,4     | 1<br>±0,9    | 1<br>±1      | 10<br>±3*    |
| <b>48 часа</b>                     |              |                          |               |               |              |              |              |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)         | 145<br>±21   | 92<br>±13,5*             | 95<br>±21,8*  | 91<br>±16,7*  | 89<br>±19,5* | 82<br>±18,4* | 86<br>±19,7* |
| % мертвых клеток в п/зр            | 0<br>±0      | 0<br>±0                  | 0<br>±0       | 0<br>±0       | 0<br>±0      | 0<br>±0      | 0<br>±0      |
| % Пикноза в п/зр                   | 0<br>±0      | до 4<br>клеток           | 0<br>±0       | 0<br>±0       | 0<br>±0      | 0<br>±0      | 0<br>±0      |
| % клеток с аутофагосомами от живых | 1<br>±1      | 1<br>±0,4                | 1<br>±0,1     | 1<br>±0       | 1<br>±0      | 1<br>±0,9    | 6,5<br>±4*   |
| <b>72 часа</b>                     |              |                          |               |               |              |              |              |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)         | 161<br>±18   | 123<br>±41,6             | 79<br>±8,3*   | 76<br>±7,9*   | 74<br>±4,5*  | 66<br>±5,8*  | 16<br>±2,4*  |
| % мертвых клеток в п/зр            | 0<br>±0      | 33,1                     | 0<br>±0       | 0<br>±0       | 0<br>±0      | 0<br>±0      | 0<br>±0      |
| % Пикноза в п/зр                   | 0<br>±0      | до 4<br>клеток           | 0<br>±0       | 0<br>±0       | 0<br>±0      | 0<br>±0      | 0<br>±0      |
| % клеток с аутофагосомами от живых | 1±1          | 1,5<br>±0,2              | 1<br>±0,2     | 1<br>±0,2     | 1<br>±0,2    | 1<br>±1      | 43<br>±5*    |

Примечание: \* достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

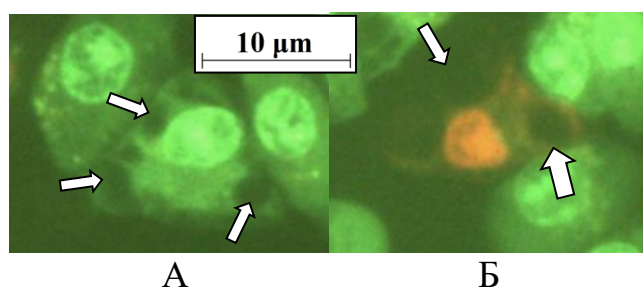


Рисунок 12. Этапы гибели опухолевой клетки HeLa при концентрации экстракта бессмертника 8,6 мг/мл через 24 часа: А – образование нескольких аутофагосом в одной клетке, Б – клетка на пути к гибели, окрашена йодистым пропидием (через поврежденные мембраны), с явными признаками аутофагии. Флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 1000. Стрелками указаны аутофагосомы.

Через 48 ч морфология клеток культуры HeLa при концентрациях экстракта 0,009-0,045 мг/мл мало отличалась от контроля при фазово-контрастной микроскопии (Рисунок 14). При окраске акридиновым оранжевым и йодистым пропидием на флуоресценции до 5% клетках имели аутофагосомы. СКК в поле зрения не уменьшалось по сравнению с контролем, так же, как и через 24 часа.

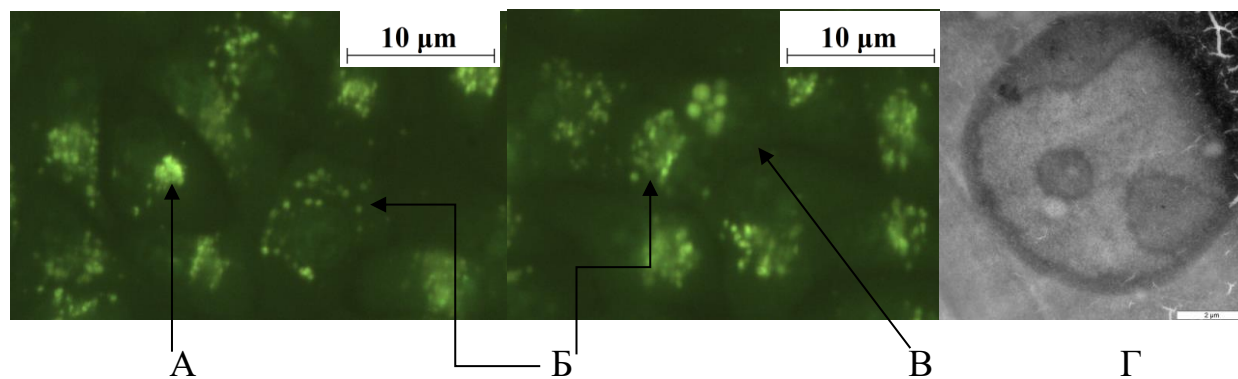
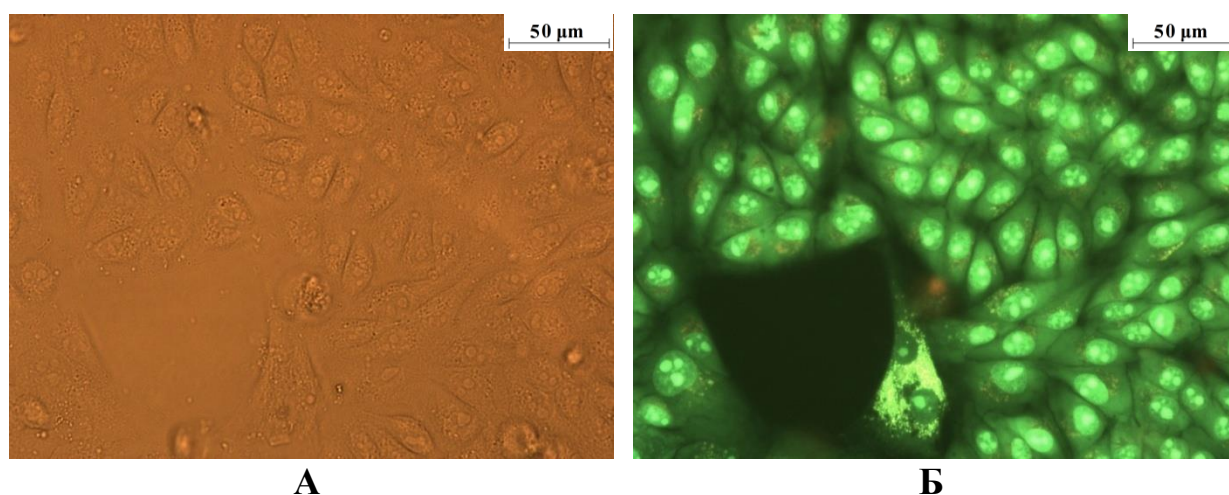


Рисунок 13. Апоптоз клеток HeLa под действием экстракта бессмертника в концентрации 0,045 мг/мл через 24 часа. Флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 1000: А – кариопикноз, Б – кариорексис, В – апоптотические тельца. Электронная микроскопия. Ув. 12000: Г – конденсация хроматина по периферии и в центре ядра.

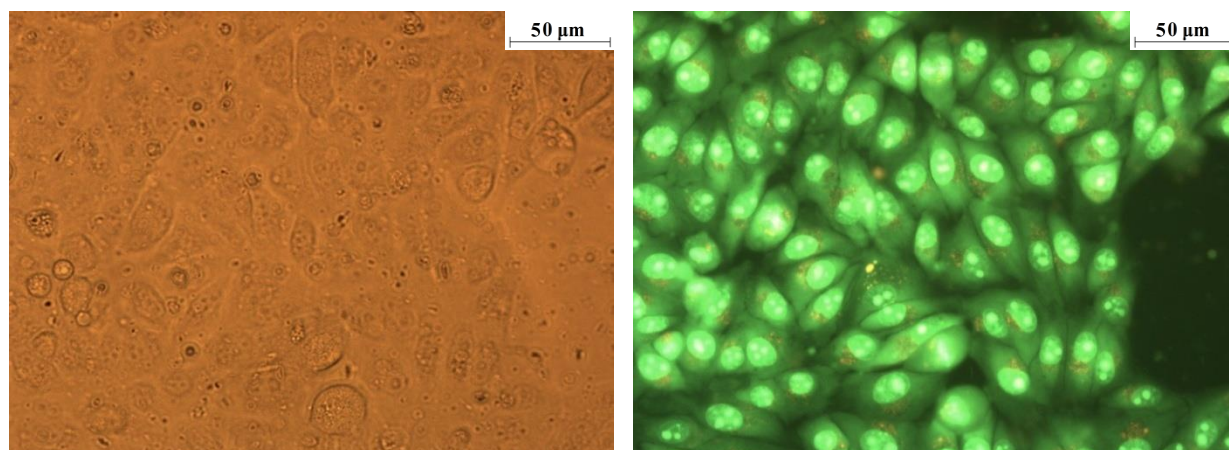


А

Б

Рисунок 14. Клетки культуры HeLa через 48 часов после инкубации с экстрактом бессмертника в концентрации 0,011 мг/мл. А – фазовый контраст Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 200.

Через 72 ч наблюдали снижение СКК в среднем на 53% по сравнению с контролем, что свидетельствовало о цитостатическом эффекте экстракта. Число ядрышек в ядрах клеток резко уменьшалось до одного-двух, что свидетельствовало о резком снижении синтетической активности. При концентрациях 0,75 - 5 мг/мл экстракта отмечали изменения морфологии клеток. Они приобретали более разнообразную форму при фазовом контрасте, и в них появлялась темная зернистость, представляющая собой при флуоресцентном окрашивании множество мелких аутофагосом (Рисунок 15).



А

Б

Рисунок 15. Клетки культуры HeLa через 72 часа после инкубации с экстрактом бессмертника в концентрации 0,75 мг/мл: А – фазовый контраст; Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 200.

Более выраженные морфологические изменения отмечали при концентрации 10 мг/мл экстракта бессмертника: клетки были более крупного размера, увеличились размеры аутофаголизосом, при этом были хорошо выражены вторичные лизосомы (Рисунок 16). Количество ядрышек в ядре сократилось до одного, т.е. синтез рРНК практически прекратился. Отметим значимое снижение СКК по сравнению с контролем на 90%.

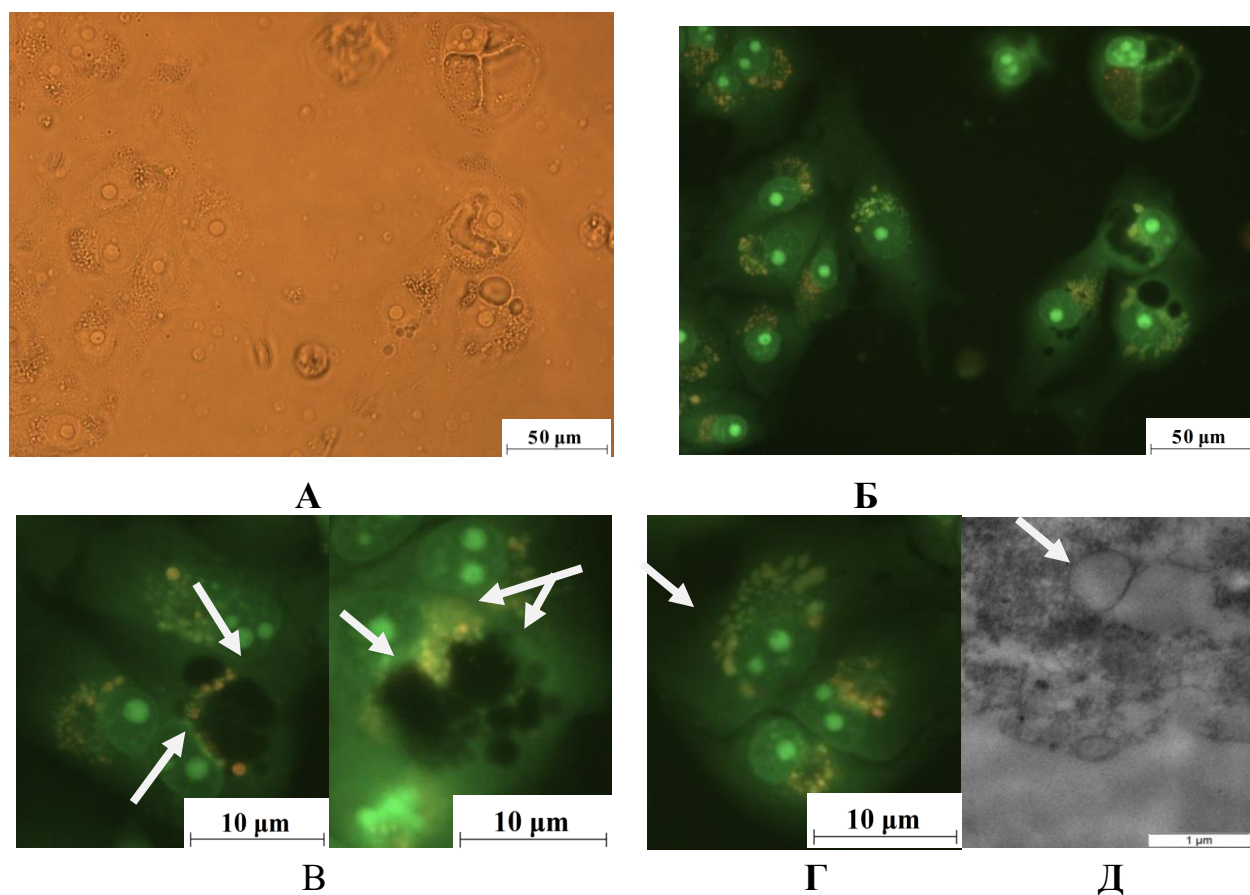


Рисунок 16. Клетки культуры HeLa через 72 часа после инкубации с экстрактом бессмертника в концентрации 10 мг/мл.: А – фазовый контраст Ув. 200.; Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием Ув. 200., В – образование аутофаголизосом Ув. 1000., Г – выраженные вторичные лизосомы Ув. 1000.; Электронная микроскопия: Д – появление вакуолей в клетке (показаны стрелками). Ув. 12000.

Таким образом, в первые двое суток не возникало значимых морфологических изменений при изученном диапазоне концентраций экстракта бессмертника от 0,009 до 10 мг/мл, что не противоречило предыдущему эксперименту. Только на третьи сутки и только при концентрации 10 мг/мл значительно менялась морфология клеток. В целом

полученные результаты свидетельствовали о низкой цитотоксической, цитостатической и апоптотической активности экстракта в отношении клеточной культуры HeLa. Морфологические признаки апоптоза и гибели клеток появлялись только при концентрации экстракта бессмертника 10 мг/мл.

***Морфологические изменения под действием экстрактов антоциановой кукурузы.*** Через 24 ч после инкубации с экстрактом как антоциановой кукурузы ВОУ, так и кукурузы ВЗУ, не отмечали существенных морфологических изменений по сравнению с контролем, кроме того, что ядра и ядрышки клеток при 10 мг/мл были окрашены слабее (Рисунок 17).

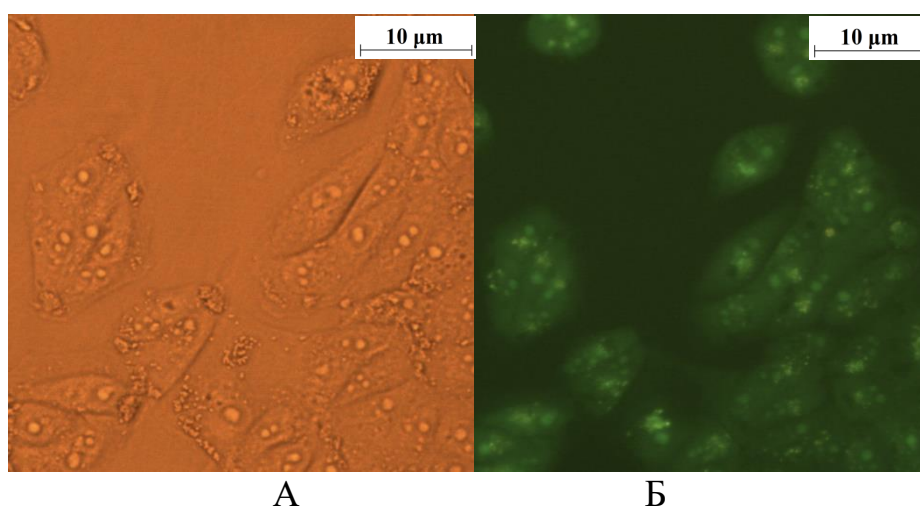


Рисунок 17. Клетки культуры HeLa через 24 ч после инкубации с экстрактом антоциановой кукурузы, выросшей в обычных условиях, в концентрации 10 мг/мл: А – фазовый контраст, Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 400.

СКК под действием экстракта кукурузы ВОУ при концентрации 10 мг/мл было больше (128-133), чем в контроле (108,7), а при действии экстракта кукурузы ВЗУ не отличалось от контроля (Таблица 7). Кроме того, экстракт кукурузы ВОУ повышал пролиферативную активность опухолевых клеток. Цитотоксической активности под действием обоих экстрактов также не выявлено. Экстракт кукурузы ВОУ при 10 мг/мл вызывал образование аутофагосом в 12% клеток, по 1-2 в каждой клетке (Рисунок 18, Таблица 7). Цитостатический эффект не был выявлен при действии экстрактов обеих

кукуруз. Морфологических признаков апоптоза в клетках под действием экстрактов кукурузы не выявлено.

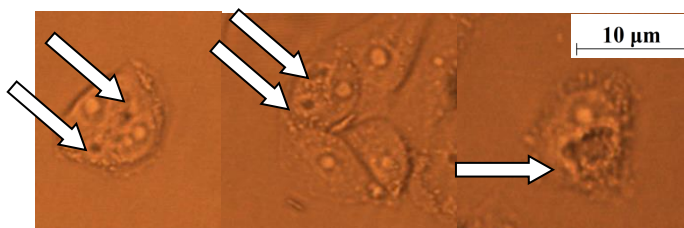


Рисунок 18. Клетки культуры HeLa с аутофагосомами (указаны стрелками) через 24 ч после инкубации с экстрактом антоциановой кукурузы, выросшей в обычных условиях, в концентрации 10 мг/мл, фазовый контраст. Ув. 400.

Через 48 ч СКК под действием обоих экстрактов кукурузы при концентрации 10 мг/мл было меньше (соответственно, 106,5 и 64), чем в контроле (145,3) (Таблица 7), т.е. на вторые сутки воздействия экстракты стали обладать цитостатическим действием. Ядра и ядрышки при концентрации 10 мг/мл были окрашены слабее, чем в контроле. Цитотоксической активности под действием обоих экстрактов не выявлено. Количество клеток с аутофагосомами возросло до 34% под действием экстракта кукурузы ВОУ при концентрации 10 мг/мл по сравнению с контролем (Таблица 7). Под действием экстракта кукурузы ВЗУ количество клеток с аутофагосомами составило 7%. Единичные апоптотические тельца выявлены только при концентрации 10 мг/мл у экстракта кукурузы ВОУ (Рисунок 19, 20).

Через 72 часа: клетки правильной полигональной формы и почти образуют монослой под действием обоих экстрактов в низких концентрациях (до 5 мг/мл). Количество клеток под действием экстрактов при 5-10 мг/мл было меньше, чем в контроле (Таблица 7), т.е. и на третьи сутки воздействия цитостатическое действие обоих экстрактов сохранилось. Ядра и ядрышки клеток под действием экстрактов при концентрации от 5 мг/мл и выше были окрашены слабее, чем в контроле (Рисунок 21, 22), что свидетельствовало об угнетении синтеза рРНК в клетках.

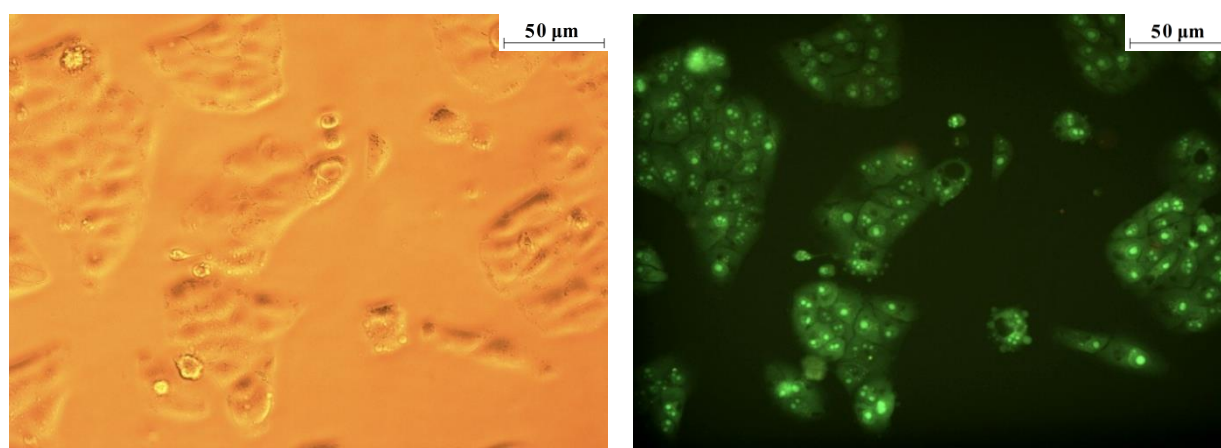
**А****Б**

Рисунок 19. Клетки культуры HeLa через 48 ч после инкубации с экстрактом антоциановой кукурузы, выросшей в обычных условиях, в концентрации 10 мг/мл. Ув. 200: А – фазовый контраст, Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием.

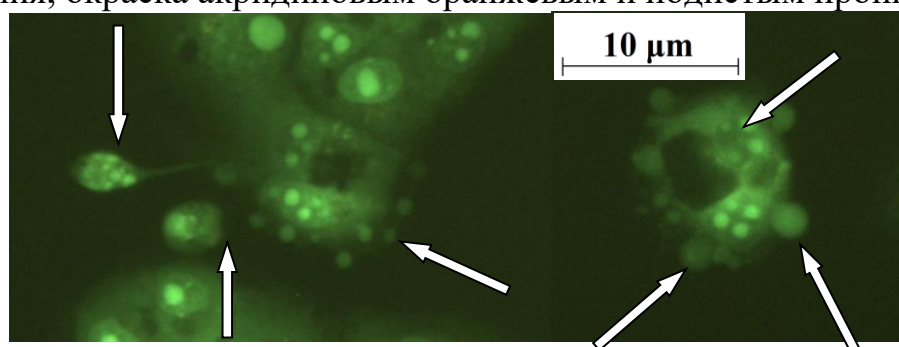


Рисунок 20. Клетки культуры HeLa через 48 часов, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием, после инкубации с экстрактом антоциановой кукурузы, выросшей в обычных условиях, в концентрации 10 мг/мл. Стрелками обозначены апоптотные тельца. Ув. 1000.

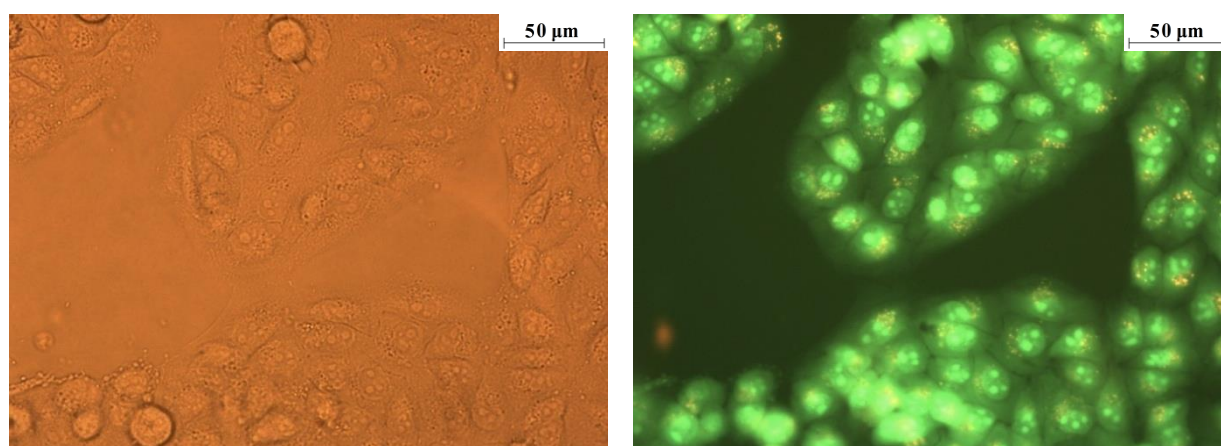
**А****Б**

Рисунок 21. Клетки культуры HeLa через 72 часа после инкубации с экстрактом антоциановой кукурузы, выросшей в обычных условиях, в концентрации 2,5 мг/мл. Ув. 200: А – фазовый контраст, Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием.

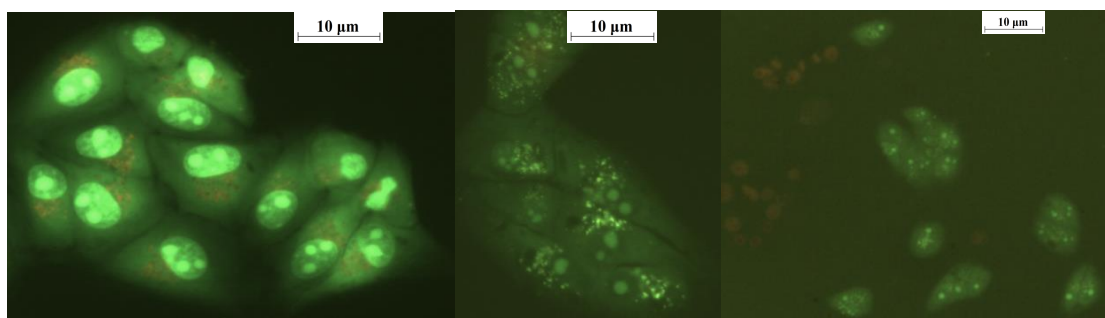
**А****Б****В**

Рисунок 22. Клетки культуры HeLa через 72 часа, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 1000: А – в контроле, Б – после инкубации с экстрактом антоциановой кукурузы, выросшей в обычных условиях, в концентрации 10 мг/мл, В – после инкубации с экстрактом антоциановой кукурузы, выросшей в засушливых условиях, в концентрации 10 мг/мл.

По сравнению с контролем появлялись единичные клетки с морфологическими признаками гибели, однако при действии экстракта кукурузы ВЗУ число таких мертвых клеток возрастало (Таблица 7). При концентрации 10 мг/мл экстракта кукурузы ВЗУ это количество возрастало до 31%, что свидетельствовало о наличии цитотоксического воздействия. Свидетельств апоптотической активности обоих экстрактов не обнаружено.

Аутофагия в клетках под действием обоих экстрактов на третьи сутки эксперимента возникала даже при малых концентрациях (Таблица 7). Количество аутофагосом в клетке при воздействии экстракта в концентрации до 10 мг/мл составляло от 2-х до 4-х, они были мелкие и округлой формы, на фазовом контрасте выявлялись как зернистость цитоплазмы.

При концентрации экстракта 10 мг/мл в клетке встречалась одна, реже две аутофагосомы. До 90% клеток с аутофагосомами образовывались при концентрации 0,22 мг/мл экстракта кукурузы ВОУ, при других концентрациях количество клеток с аутофагосомами плавно возрастало с 2 до 22%, в то время как под действием экстракта кукурузы ВЗУ количество клеток с аутофагосомами нелинейно варьировало от 2,5 до 7,5%.

Таблица 7 – Морфологические показатели в клеточной культуре HeLa на протяжении трех дней под действием экстракта кукурузы

| Группа                                    | Конт<br>роль | 0,011-0,18<br>мг/мл                          | 0,37<br>мг/мл      | 0,75<br>мг/мл      | 1,25<br>мг/мл        | 2,5<br>мг/мл         | 5<br>мг/мл          | 10<br>мг/мл         |
|-------------------------------------------|--------------|----------------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| <b>24 часа</b>                            |              |                                              |                    |                    |                      |                      |                     |                     |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)                | 108<br>±11   | 133±25,3<br>*/107±13                         | 135±17<br>*/108±14 | 136±20<br>*/109±13 | 138±20<br>*/109±10,1 | 134±18<br>*/106±11,1 | 130±15<br>*/104±9,7 | 128±10<br>*/90±12,2 |
| Доля мертвых клеток в п/зр (%)            | 0<br>±0      | 0<br>±0                                      | 0<br>±0            | 0<br>±0            | 0<br>±0              | 0<br>±0              | 0<br>±0             | 0<br>±0             |
| Доля пикноза в п/зр (%)                   | 0<br>±0      | 0<br>±0                                      | 0<br>±0            | 0<br>±0            | 0<br>±0              | 0<br>±0              | 0<br>±0             | 0<br>±0             |
| Доля клеток с аутофагосомами от живых (%) | 1<br>±1      | 1±1<br>(до 20 % -<br>0,022<br>мг/мл)<br>/2±1 | 1,1±1<br>/1±0,5    | 1,3±1<br>/1,7±1    | 2,8±0,9*<br>/1±1     | 3,1±1*<br>/2,5±0,9   | 4,6±1*<br>/1±0,2    | 12 ±3*<br>/0±0      |
| <b>48 часа</b>                            |              |                                              |                    |                    |                      |                      |                     |                     |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)                | 145<br>±21   | 111±31<br>*/72±5*                            | 112±19<br>*/73±2*  | 113±29*<br>/71±5*  | 114±30*<br>/71±7*    | 110±11*<br>/70±2*    | 108±11*<br>/67±6*   | 106±25*<br>/64±3*   |
| Доля мертвых клеток в п/зр (%)            | 0<br>±0      | 0<br>±0                                      | 0<br>±0            | 0<br>±0            | 0<br>±0              | 0<br>±0              | 0<br>±0             | 0<br>±0             |
| Доля пикноза в п/зр (%)                   | 0<br>±0      | 0<br>±0                                      | 0<br>±0            | 0<br>±0            | 0<br>±0              | 0<br>±0              | 0<br>±0             | 0<br>±0             |
| Доля клеток с аутофагосомами от живых (%) | 1±1          | 2±1<br>/5±1                                  | 1,4±1<br>/1,7±1,5  | 2,3±1<br>/2,7±2,1  | 5±0,5*<br>/1,7±1     | 6±1*<br>/4,5±1*      | 9±2<br>/1,5±0,6     | 34±7*/<br>7±0,3*    |
| <b>72 часа</b>                            |              |                                              |                    |                    |                      |                      |                     |                     |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)                | 161<br>±18   | 93 ±28*<br>/100±4*                           | 90±20*<br>/98±12*  | 92±18*<br>/98±12*  | 74±24*<br>/83±16*    | 91 ±16*<br>/66±28*   | 70±16,5*<br>/74±14* | 31 ±17*<br>/27±4*   |
| Доля мертвых клеток в п/зр (%)            | 0            | 1±1<br>/3±1*                                 | 1±1<br>/1±1        | 1±1<br>/5±3*       | 1±1<br>/3±2*         | 3±2*<br>/5±2*        | 4±3*<br>/3±2*       | 1±1<br>/31±12*      |
| Доля пикноза в п/зр (%)                   | 0±0          | 0±0                                          | 0±0                | 0±0                | 0±0                  | 0±0                  | 0±0                 | 0±0                 |
| Доля клеток с аутофагосомами от живых (%) | 1±1          | 2,4±2<br>/10±6*                              | 2,3±1,5<br>/3±2    | 3±2<br>/5±3*       | 9±0*<br>/3±2         | 9±1*<br>/8±1*        | 20±4*<br>/2±0*      | 22±7*<br>/5±0*      |

Примечание: значение показателей антоциановой кукурузы BOY – в числителе; экстракта антоциановой кукурузы ВЗУ- в знаменателе; \*достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

Таким образом, морфологические изменения в клетках под действием экстрактов кукурузы наблюдались только на вторые сутки и проявлялись в виде снижения количества клеток и отсутствия фигур митозов. В опухолевых

клетках появлялись аутофагосомы, а также единичные апоптозные тельца под действием экстракта кукурузы ВОУ только при концентрации 10 мг/мл. Цитостатическая активность обоих экстрактов сохранилась и на третьи сутки воздействия. Гибель значительной части клеток (цитотоксическая активность) происходила на третьи сутки после воздействия экстракта кукурузы ВЗУ. Появление аутофагосом в опухолевых клетках под действием обоих экстрактов также наблюдалось только на третьи сутки при низких концентрациях. Морфологических признаков апоптоза в данные промежутки времени и при изученных концентрациях экстрактов кукурузы не было.

***Морфологические изменения под действием экстракта аврана.*** Через 24 ч после инкубации с экстрактом аврана при низких концентрациях выявлены клетки в основном полигональной формы, фрагментарно представлен монослой (Рисунок 23). Активность ядрышковых организаторов сохранялась, количество ядрышек в ядре чаще от двух до трех. СКК по сравнению с контролем при воздействии экстракта с концентрацией 0,09-3 мг/мл сократилось в два раза, а при 6 мг/мл – в три раза, что свидетельствовало о высокой цитостатической активности экстракта. Процент мертвых клеток прямо пропорционально увеличивался, начиная от 0,18 мг/мл (Таблица 8), т.е. экстракт обладал и значительной цитотоксической активностью. Большинство погибших клеток находилось на стадии пикноза, что позволило предположить высокую апоптотическую активность экстракта. В диапазоне 3 - 6 мг/мл при максимальном количестве гибели клеток установить, каким именно образом происходила гибель, было невозможно.

Появление аутофагосом в опухолевых клетках под действием экстракта максимально наблюдали при 0,09 и 0,18 мг/мл (Таблица 8). Образование аутофагосом при 0,09 мг/мл свидетельствовало об активном действии экстракта на опухолевые клетки, с помощью аутофагии клетки не только пытались выживать, но и образовывали конгломераты с выраженными цитоплазматическими контактами (Рисунок 24). При большей концентрации – 0,18 мг/мл агломерации клеток и цитоплазматических контактов уже не

образовывалось. Выявлена достаточно четкая тенденция – при резком падении количества клеток с аутофагосомами резко увеличивается количество мертвых клеток (Таблица 8), что подтверждает роль аутофагии при выживании опухолевой клетки в условиях токсического стресса, в т.ч. и обусловленного противоопухолевой терапией.

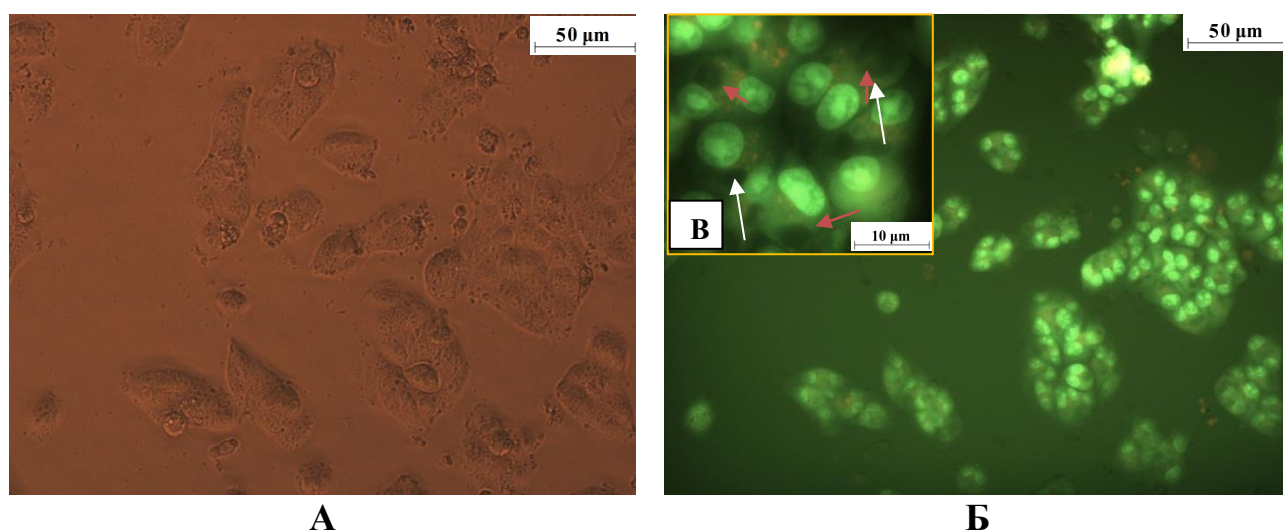


Рисунок 23. Клетки культуры HeLa через 24 часа после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0,18 мг/мл, появление аутофагосом: А – фазовый контраст, Б – флуоресцентная окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 200, В – стрелкой указаны аутофагосомы. Ув. 400.

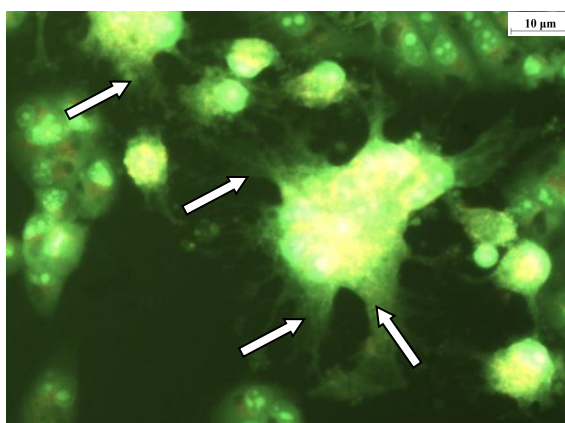


Рисунок 24. Клетки культуры HeLa через 24 часа после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0,09 мг/мл, флуоресцентная окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Стрелками указаны цитоплазматические контакты между клетками. Ув. 600.

Таблица 8 – Морфологические показатели в клеточной культуре HeLa на протяжении трех дней под действием экстракта аврана

| Группа                                    | Контроль     | 0,09<br>мг/мл | 0,18<br>мг/мл | 0,4<br>мг/мл | 0,9<br>мг/мл  | 1,5<br>мг/мл | 3<br>мг/мл  | 6<br>мг/мл  |
|-------------------------------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| Через 24 часа                             |              |               |               |              |               |              |             |             |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)                | 324<br>±32,3 | 163<br>±15*   | 168<br>±15*   | 161<br>±18*  | 133<br>±12*   | 123<br>±17*  | 132<br>±15* | 95<br>±9*   |
| Доля мертвых клеток в п/зр (%)            | 0±0          | 0,4<br>±0,1 * | 2,8<br>±0,5*  | 8,4<br>±3*   | 13,2<br>±4*   | 41,2<br>±3*  | 97,6<br>±2* | 93,6<br>±5* |
| Доля пикноза в п/зр (%)                   | 0±0          | 40<br>±9*     | 61<br>±8*     | 51,1<br>±5*  | 71<br>±11*    | 18<br>±1*    | 0<br>±0     | 0<br>±0     |
| Доля клеток с аутофагосомами от живых (%) | 1±1          | 96,5<br>±3*   | 99<br>±4*     | 19<br>±2*    | 0,3<br>±0,1*  | 0,3<br>±0,1* | 0<br>±0     | 0<br>±0     |
| Через 48 часов                            |              |               |               |              |               |              |             |             |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)                | 437<br>±41,8 | 284<br>±15*   | 231<br>±21*   | 228<br>±23*  | 205<br>±19*   | 136<br>±9*   | 90<br>±7*   | 86<br>±13*  |
| Доля мертвых клеток в п/зр (%)            | 0±0          | 0±0           | 9<br>±2,4*    | 8<br>±1,7*   | 7<br>±2,9*    | 21<br>±8,7*  | 99<br>±1*   | 99<br>±0,5* |
| Доля пикноза в п/зр (%)                   | 0±0          | 0,1±0,1       | 0,2±0,1       | 1±1          | 0,2±0,1       | 0,1±0,1      | 0±0         | 0±0         |
| Доля клеток с аутофагосомами от живых (%) | 1±1          | 16<br>±2*     | 23,6<br>±3*   | 12<br>±4*    | 89<br>±15*    | 1,7<br>±1    | 0±0         | 0±0         |
| Через 72 часа                             |              |               |               |              |               |              |             |             |
| Кол-во клеток в п/зр (СКК)                | 484<br>±50   | 297<br>±31*   | 309<br>±29*   | 240<br>±21*  | 126<br>±11*   | 72<br>±5*    | 84<br>±7*   | 81<br>±9*   |
| Доля мертвых клеток в п/зр (%)            | 0±0          | 0±0           | 0±0           | 0±0          | 14,8<br>±2,3* | 76<br>±5,4*  | 100<br>±0*  | 100<br>±0*  |
| Доля пикноза в п/зр (%)                   | 0±0          | 0±0           | 0±0           | 1±1          | 2±0,1         | 1±1          | 0±0         | 0±0         |
| Доля клеток с аутофагосомами от живых (%) | 1±1          | 7<br>±2*      | 37<br>±5*     | 93<br>±6*    | 82<br>±9*     | 0±0          | 0±0         | 0±0         |

Примечание: \* достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

При концентрациях экстракта начиная с 0,4 мг/мл клетки приобрели овальную форму, что свидетельствовало об уменьшении связи клеток с подложкой, их откреплении от подложки. Клетки лежали отдельными группами, не образуя монослоя (Рисунок 25). При этом резко сократилось число клеток с аутофагосомами, при 0,9 мг/мл аутофагосомы не образовывались. Количество ядрышек в ядре сократилось до одного, при этом

наблюдалась их более слабая окраска, что свидетельствовало о снижении активности ядрышковых организаторов (Рисунок 25). Наблюдали клетки с ярким свечением ядра, что свидетельствовало о конденсации хроматина и возможном запуске апоптоза, но апоптотических телец было немного (Таблица 8).

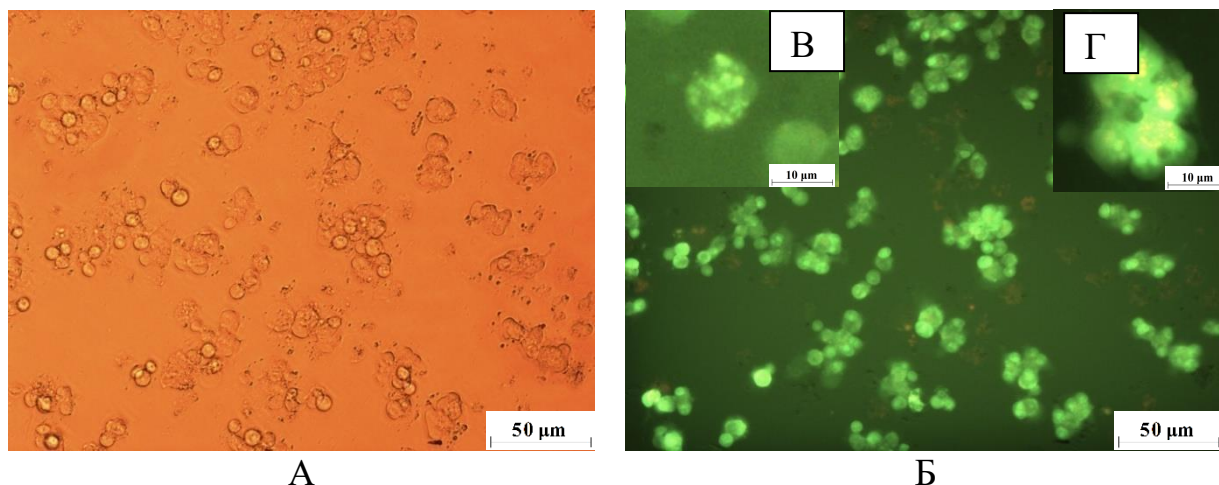


Рисунок 25. Клетки культуры HeLa через 24 часа после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0,8 мг/мл. Ув. 200: А – фазовый контраст; Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 1000: В – фрагментация ядра; Г – аутофагосомы.

При концентрации экстракта 1,5 мг/мл количество мертвых клеток было более 40%. Не погибшие клетки были открепленными от подложки. Активность ядрышковых организаторов отсутствовала.

При концентрации экстракта 3 мг/мл практически все клетки были погибшими (Рисунок 26). Аутофагия-индуцирующая активность отсутствовала. В небольшом количестве выявлены апоптотические тельца. Все клетки имели округлую форму.

Через 48 ч клетки имели полигональную форму и частично образовывали монослой (Рисунок 27 А-В) после действия экстракта при концентрациях 0,09 - 0,4 мг/мл, хотя по сравнению с контролем СКК было в 1,5 - 2 раза меньше (Таблица 8). Количество ядрышек в ядрах – от 1 до 2. Более 16% клеток имели 1-2 аутофагосомы. Выявлены апоптотические тельца, но в небольшом количестве (Таблица 8). Обнаружены клетки с аутофаголизосомами, ядро которых приобретало серповидную форму

(Рисунок 27 Г, Д), что свидетельствовало о том, что дальнейшей судьбой клетки с аутофагосомой мог стать переход в апоптоз. При 0,9 мг/мл клетки становились овальными, аутофагия-индуцирующая активность у них снизилась. Ядрышки слабо окрашены. При 1,5 мг/мл клетки стали округлыми. При концентрациях 3 мг/мл и выше практически все клетки были погибшими.

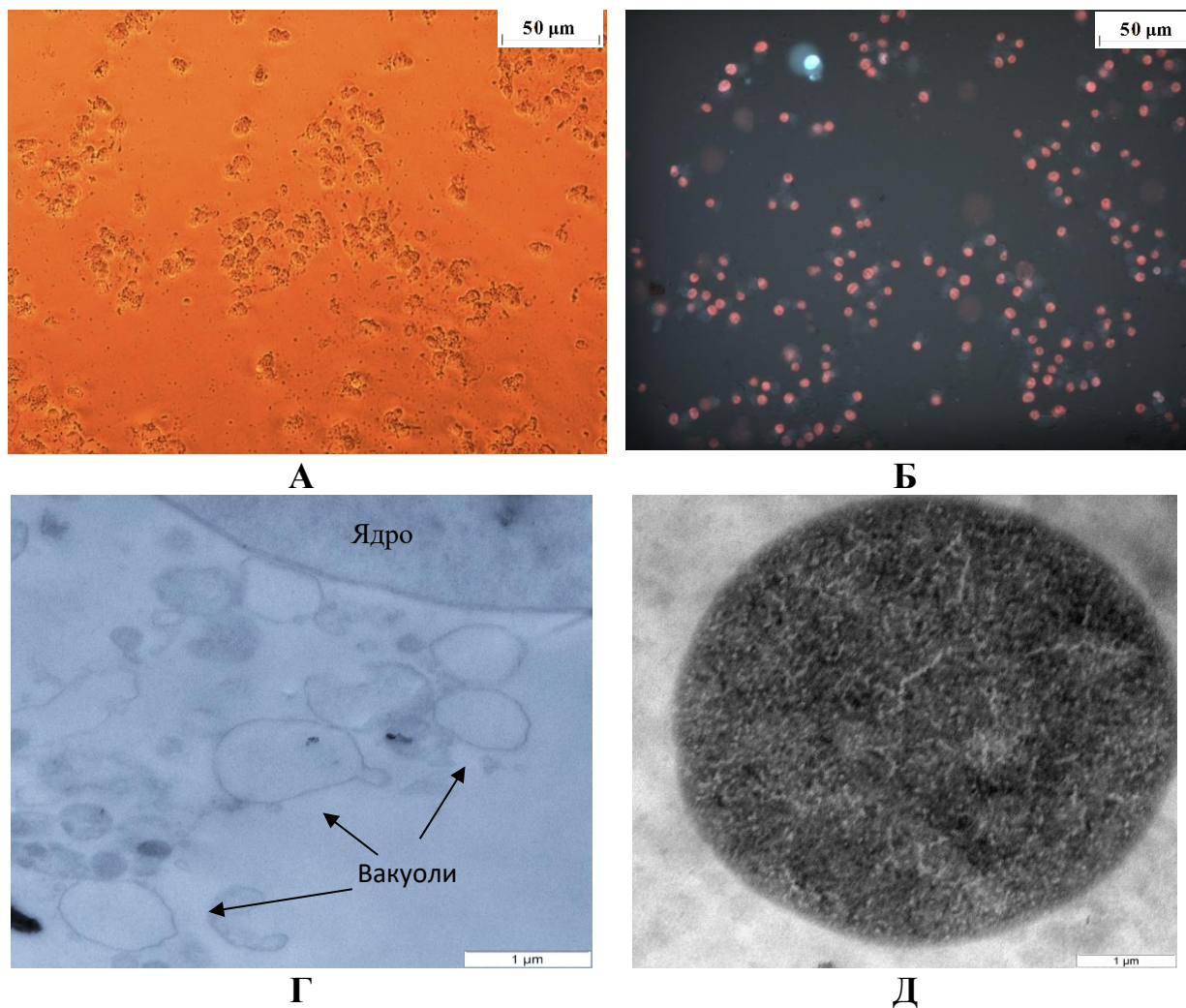
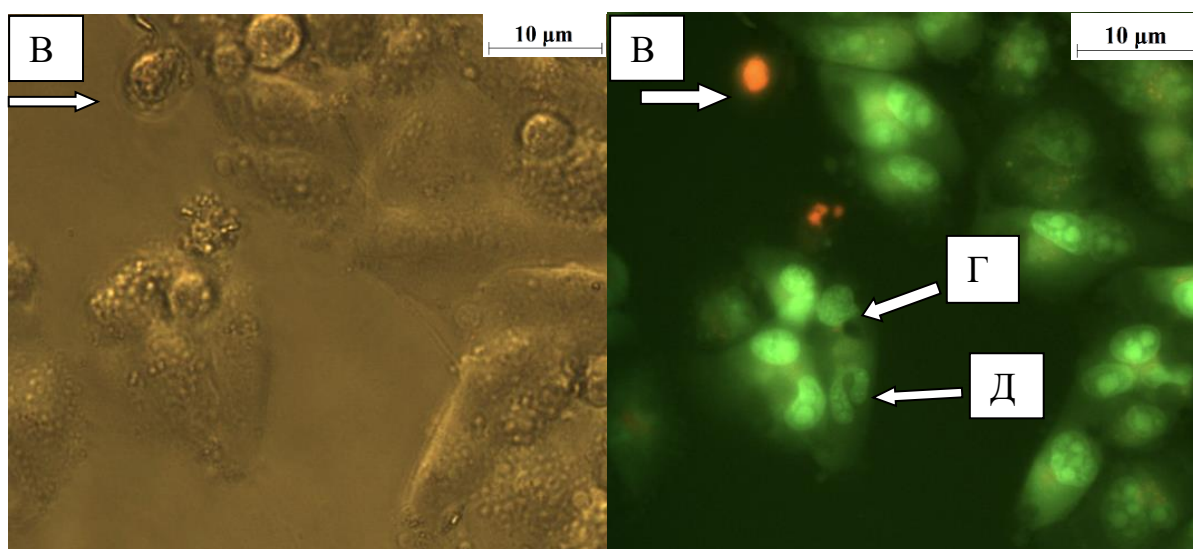


Рисунок 26. Клетки культуры HeLa через 24 часа после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 3 мг/мл: А – фазовый контраст. Ув. 200; Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием. Ув. 200; Г – электронная микроскопия, концентрация экстракта аврана 0,4 мг/мл, появление вакуолей в клетке (аутофагосом) Ув.15000; Д – электронная микроскопия, Ув. 12000, концентрация экстракта аврана 3 мг/мл, конденсация ядерного хроматина (пикноз).

Через 72 ч действие экстракта было сходно с действием через 48 часов, хотя, по сравнению с контролем, СКК было меньше при действии экстракта в концентрациях от 0,09 до 0,4 мг/мл (Таблица 8). Количество ядрышек в ядрах:

1-2. Количество мертвых клеток: 2%. Клеток с аутофагосомами: от 7 до 93%. Апоптотических телец мало (Таблица 8). При концентрации 0,75 мг/мл клетки приобретали овальную форму, аутофагия-индуцирующая активность у них снизилась. Ядрышки слабо окрашены. При концентрации 1,5 мг/мл клетки стали округлыми. Начиная с этой концентрации и выше, аутофагосом не образовывалось. При 3 мг/мл и выше почти все клетки были погибшими.



А

Б

Рисунок 27. Клетки культуры HeLa через 48 часов после инкубации с экстрактом аврана в концентрации 0,18 мг/мл. Ув. 400: А – фазовый контраст, Б – флуоресцентная микроскопия, окраска акридиновым оранжевым и йодистым пропидием, В – мертвая клетка, Г – аутофагосома, Д – ядро еще живой клетки в виде серпа (стадия, предшествующая апоптотической гибели).

Таким образом, экстракт аврана уже на первые сутки после воздействия приводил к резкому снижению количества клеток и их гибели. Минимальные концентрации экстракта приводили к активному образованию аутофагосом, что свидетельствовало о его высокой активности в отношении опухолевых клеток. По итогам экспериментов *in vitro* экстракт аврана является наиболее перспективным для его дальнейшего исследования.

### 3.3. Морфологические показатели жизнеспособности и апоптотической гибели опухолевых клеток человека в тесте на прижизненное окрашивание хроматина ядра

*Клетки карциномы молочной железы (SK-BR-3).* В контроле в клеточной культуре SK-BR-3 через сутки СКЖК (среднее количество живых клеток) составляло 365 клеток в поле зрения, из них 0,6% находилось на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза и 0,56% – в виде апоптотических телец. При этом хроматин ядер клеток был окрашен не интенсивно (Рисунок 28).

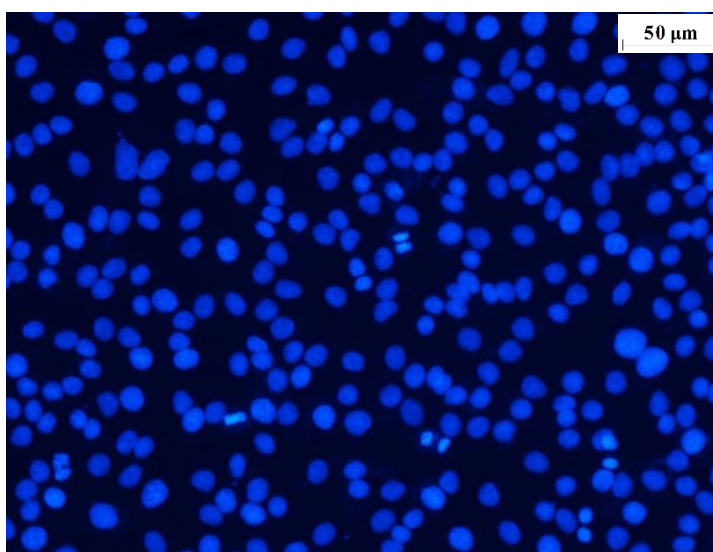


Рисунок 28. Клетки рака молочной железы линии SK-BR-3 в контроле, режим флуоресценции при 435-485 нм, окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

*Морфологические изменения при действии экстракта аврана.* При воздействии на клеточную культуру экстрактом аврана в концентрации 0,035 мг/мл отмечали увеличение в 1,2 раза СКЖК по сравнению с контролем (увеличение пролиферативной активности). При этом количество клеток, находящихся в митозе на стадиях метафазы, анафазы и телофазы не менялось по сравнению с контролем. Возросло число клеток с признаками апоптоза – в 3,5 раза по сравнению с контролем (все они были представлены апоптотическими тельцами) (Таблица 9, Рисунок 29).

При воздействии экстрактом аврана в концентрации 0,18 мг/мл СКЖК и число клеток в митозе (на стадиях метафазы, анафазы и телофазы) не

отличались от контроля (Таблица 8). Число клеток с признаками апоптоза возросло в 1,6 раз. Большая их часть выявлялась в виде апоптотических телец (75%), остальные были с пикнозом ядра (25%), что выражалось в ярком окрашивании ядер.

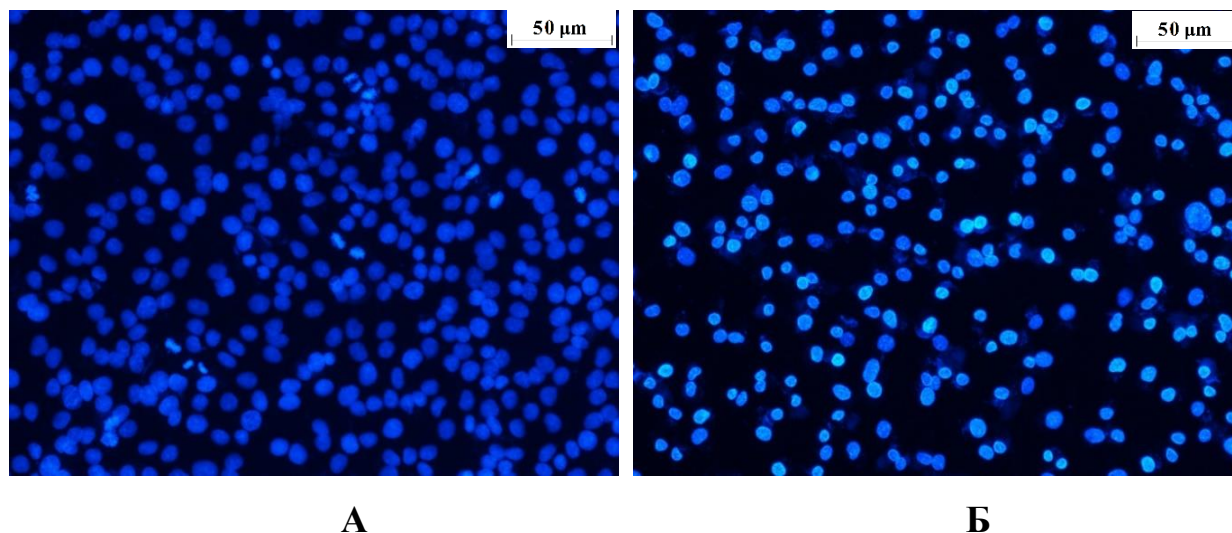


Рисунок 29. Клетки линии SK-BR-3 под действием экстракта аврана при концентрациях: А – 0,035 мг/мл; Б – 0,9 мг/мл, режим флуоресценции при 435-485нм, окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

При воздействии экстрактом аврана в концентрации 0,9 мг/мл (Рисунок 29) отмечали уменьшение СКЖК на 35% по сравнению с контролем, отсутствие клеток на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза (Таблица 9), что свидетельствовало о наличии цитостатической активности. Подавляющее большинство клеток были с явными признаками апоптоза (86%), а именно: с конденсированным ярко окрашенным ядерным хроматином (Рисунок 29), что свидетельствовало о наличии выраженной апоптотической активности.

Таким образом, мы отмечали признаки апоптоза в клетках рака молочной железы SK-BR-3 как через 24 часа, так и 48 часов при всех изученных концентрациях экстракта аврана (Таблица 8). При низких концентрациях большее количество клеток было представлено уже апоптотическими тельцами.

Таблица 9 – Морфологические показатели жизнеспособности и гибели опухолевых клеток SK-BR-3 под действием экстрактов

| Группы                               | СКЖК             | индекс пролиф ерации | доля метафаз, анафаз и телофаз | доля апоптоза (в п/зр) | доля клеток в апоптозе |            |
|--------------------------------------|------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------|
|                                      |                  |                      |                                |                        | с пикно- зом           | с тельцами |
| 24 часа                              |                  |                      |                                |                        |                        |            |
| Контроль                             | 365±24,59        | -                    | 0,68±0,13                      | 0,56±3                 | 0                      | 0          |
| под действием экстракта аврана       |                  |                      |                                |                        |                        |            |
| 0,035 мг/мл                          | 454±14,9*        | 1,24                 | 0,56±0,14                      | 1,96±0,37*<br>*        | 0                      | 100        |
| 0,18 мг/мл                           | 354,6±4,2        | 0,97                 | 0,46±0,15                      | 2.3±0,04*              | 25                     | 75         |
| 0,9 мг/мл                            | 236,6±7,8<br>*** | 0,65                 | 0***                           | 86,3±1,4<br>***        | 100                    | 0          |
| под действием экстрактов кукурузы    |                  |                      |                                |                        |                        |            |
| ВЗУ 0,071 и 0,352 мг/мл              | 354 ±94          | 0,97                 | 0,38±0,07<br>**                | 1,4 ±0,14*             | 5                      | 95         |
| ВЗУ 1,76 мг/мл                       | 249±10,17<br>*** | 0,68                 | 0,40±0,01<br>***               | 2,79±0,17<br>***       | 15                     | 85         |
| ВОУ 0,071; 0,352; 1,76 мг/мл         | 275 ±0,01*       | 0,75                 | 0<br>*                         | 0,36 ±0,01*            | 0                      | 100        |
| под действием экстракта бессмертника |                  |                      |                                |                        |                        |            |
| 0,071; 0,352; 1,76 мг/мл             | 261±5,5<br>*     | 0,72                 | 0*                             | 0,38 ±0,01*            | 0                      | 100        |
| 48 часов                             |                  |                      |                                |                        |                        |            |
| Контроль                             | 383±22,21        | 1,04                 | 0,5±0,11                       | 0,61±3                 | 0                      | 0          |
| под действием экстракта аврана       |                  |                      |                                |                        |                        |            |
| 0,035 мг/мл                          | 462 ±14,9*       | 1,25                 | 0,56±0,14                      | 1,96 ±0,37**           | 0                      | 100        |
| 0,18 мг/мл                           | 354 ±4,2         | 0,96                 | 0,5±0,15                       | 2 ±0,04*               | 28                     | 72         |
| 0,9 мг/мл                            | 243,6±9,2<br>**  | 0,66                 | 0***                           | 90,3±1,8<br>***        | 100                    | 0          |
| под действием экстрактов кукурузы    |                  |                      |                                |                        |                        |            |
| ВЗУ 0,071 и 0,352 мг/мл              | 352 ±91          | 0,96                 | 0,4±0,09<br>**                 | 1,9 ±0,2*              | 8                      | 92         |
| ВЗУ 1,76 мг/мл                       | 232±11<br>***    | 0,64                 | 0,41±0,01<br>***               | 2,9±0,2<br>***         | 13                     | 87         |
| ВОУ 0,071; 0,352; 1,76 мг/мл         | 275 ±0,01*       | 0,75                 | 0<br>*                         | 0,41 ±0,01*            | 0                      | 100        |
| под действием экстракта бессмертника |                  |                      |                                |                        |                        |            |
| 0,071; 0,352; 1,76 мг/мл             | 268±7<br>*       | 0,73                 | 0<br>*                         | 0,42 ±0,01*            | 0                      | 100        |

Примечание: при \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,005$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  достоверность отличий между значениями экспериментальной и контрольной групп определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча

**Морфологические изменения при воздействии экстрактами антоциановой кукурузы.** При воздействии экстракта кукурузы ВЗУ в концентрациях 0,071; 0,352; 1,76 мг/мл морфологических отличий в клетках выявлено не было, но по сравнению с контролем отмечали снижение митотической активности на 45% и увеличение индекса апоптотической активности в 2,5 раза (Таблица 10). При воздействии экстракта в концентрации 1,76 мг/мл происходило уменьшение СКЖК на 32%, снижение митотической и увеличение апоптотической активности (Рисунок 30 А) по сравнению с контролем. В результате экстракт кукурузы ВЗУ только при концентрации 1,76 мг/мл обладал слабой апоптотической активностью (Таблица 10) в отношении клеток SK-BR-3.

При воздействии экстракта кукурузы ВОУ при концентрациях 0,071; 0,352; 1,76 мг/мл отличий между группами не было, отмечали уменьшение СКЖК на 25% (Рисунок 30 Б), снижение количества митозов и увеличение клеток с признаками апоптоза (Таблица 10, Рисунок 30).

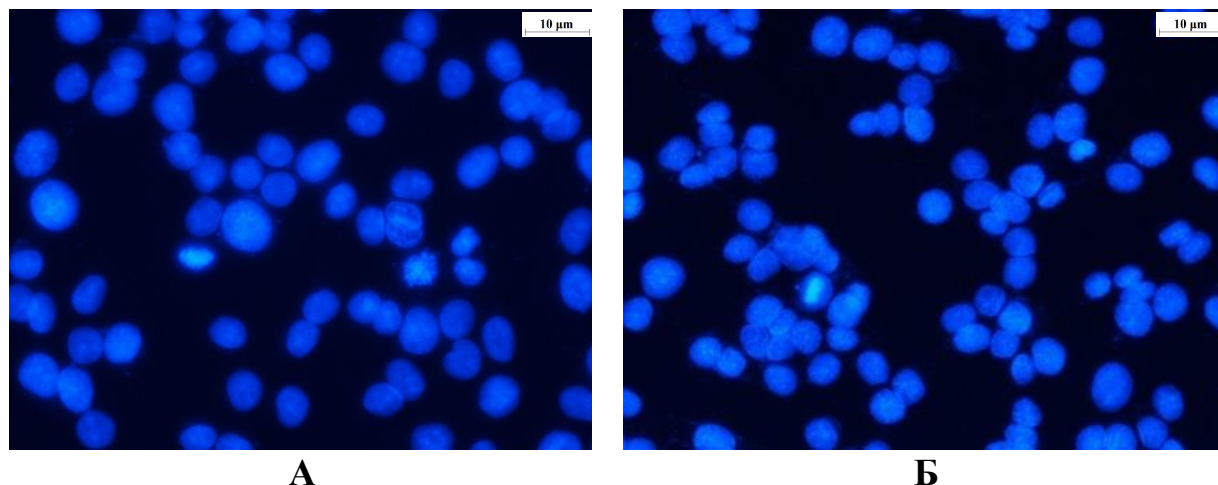


Рисунок 30. Клетки линии SK-BR-3 под действием экстракта кукурузы при концентрации 1,76 мг/мл: А – ВЗУ, Б – ВОУ, режим флуоресценции при 435-485нм, окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

Таким образом, как через 24 часа, так и 48 часов оба экстракта кукурузы не влияли на пролиферацию и способствовали активации апоптоза в опухолевых клетках, при этом сравнительно более активным в отношении клеток линии SK-BR-3 оказался экстракт кукурузы ВЗУ.

***Морфологические изменения при влиянии экстракта бессмертника.***

При воздействии экстрактом бессмертника в концентрациях 0,071; 0,352; 1,76 мг/мл значимых отличий в морфологии клеток не выявлялось; но по сравнению с контролем отмечали уменьшение СКЖК на 29%, снижение митотической и апоптотической активности (Таблица 9, Рисунок 31), т.е. в отношении клеток линии SK-BR-3 экстракт обладал только цитостатической активностью как через 24 часа, так и 48 часов.

Таким образом, наиболее значимая противоопухолевая (цитостатическая, цитотоксическая и апоптотическая) активность в клетках линии рака молочной железы SK-BR-3 была выявлена при воздействии экстракта аврана. Гораздо меньшая активность наблюдалась при воздействии экстрактов кукурузы ВЗУ. При воздействии экстрактами кукурузы ВОУ и бессмертника отмечалась только цитостатическая активность.

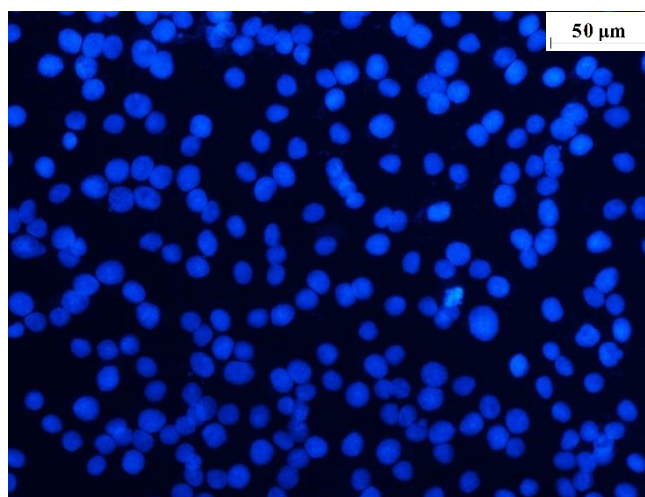
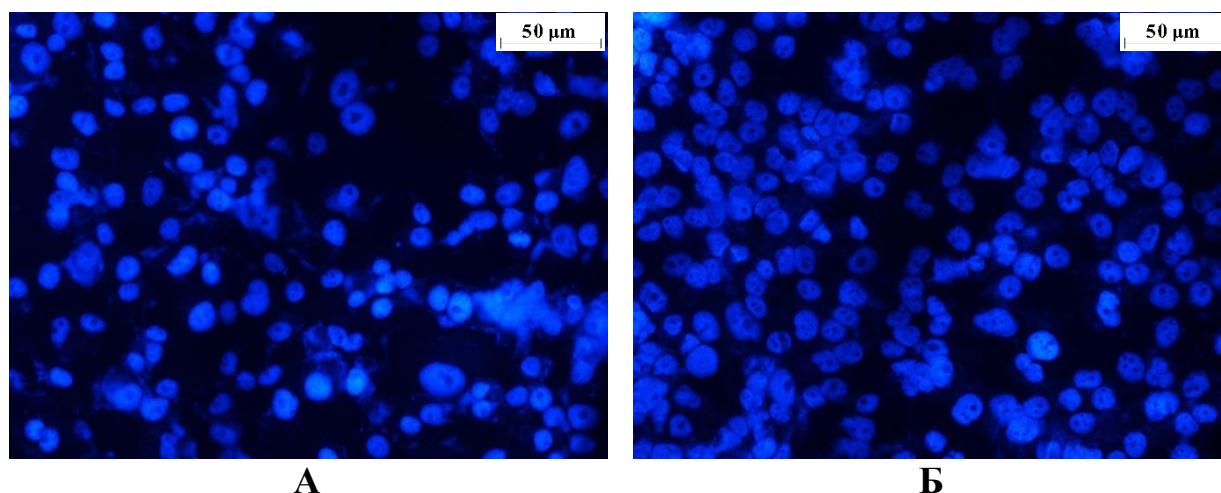


Рисунок 31. Клетки линии SK-BR-3 под действием экстракта бессмертника при концентрации 1,76 мг/мл, режим флуоресценции при 435-485нм, окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

***Клетки карциномы почки (Сакі-1).*** В контроле в клеточной культуре Сакі через 24 ч (Рисунок 32 А) наблюдали низкую митотическую активность (процент клеток на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза  $1,2 \pm 0,3\%$ ) и слабую апоптотическую активность. Через 48 ч (Рисунок 32 Б) не отмечали в клетках признаков апоптоза и митоза, СКЖК увеличивалось на 8%.



А

Б

Рисунок 32. Клетки линии Сакі без воздействия (в контроле): А – через 24 часа, Б – через 48 часов в режиме флуоресценции (при 435-485нм), окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

**Морфологические изменения при влиянии экстракта аврана.** Через 24 ч в культуре клеток Сакі под воздействием экстракта аврана в концентрации 0,035 мг/мл (Таблица 10) СКЖК не изменилось, увеличилось количество клеток в апоптозе, находящихся преимущественно на стадии пикноза (на 31,5%) и находящихся в митозе (на 1,3%). Индекс пролиферации составил 0,97. При воздействии авраном в концентрации 0,18 мг/мл СКЖК в поле зрения оставалось прежним и наблюдалось резкое увеличение количества клеток в апоптозе – на 11,2%, в основном за счет клеток на стадии пикноза (80,7%).

При воздействии экстрактом аврана в концентрации 0,9 мг/мл (Рисунок 33 А) наблюдали уменьшение на 63,3% СКЖК и увеличение количества клеток в апоптозе на 17,6% по сравнению с контролем, в основном за счет клеток на стадии пикноза (на 47,5% больше). Индекс пролиферации составил 0,36, а клетки на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза отсутствовали.

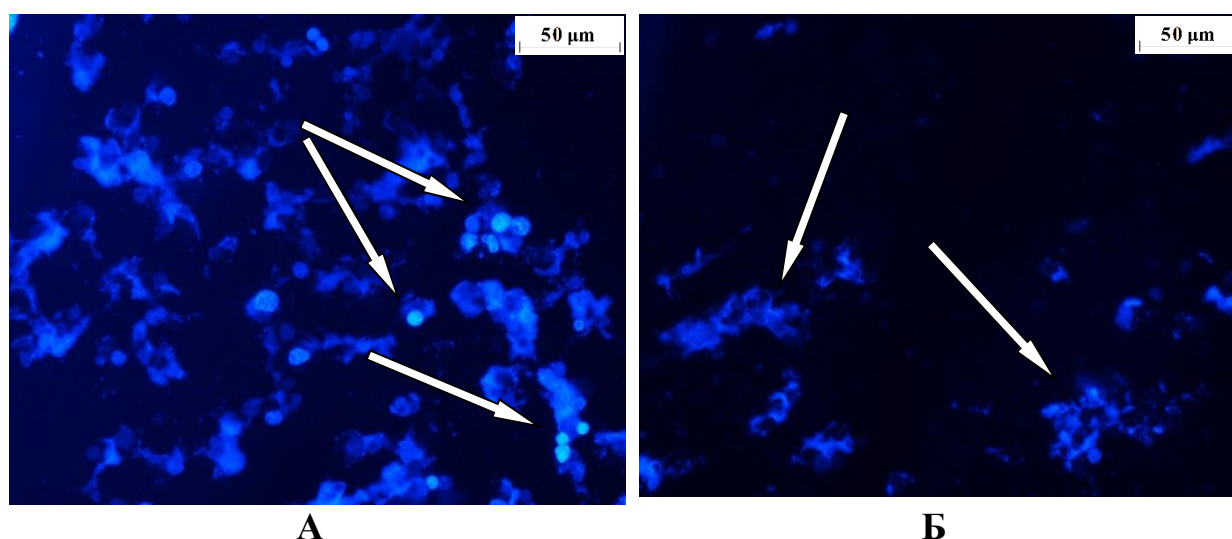


Рисунок 33. Клетки линии Saki под действием экстракта аврана при концентрации 0,9 мг/мл: А – через 24 ч (стрелкой обозначены апоптотические тельца), Б – через 48 часов (стрелкой обозначен клеточный дебрис), режим флуоресценции при 435-485нм, окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

Через 48 ч в культуре клеток Saki при воздействии экстрактом аврана (Рисунок 33 Б) в концентрациях 0,035; 0,18 и 0,9 мг/мл наблюдали резкое снижение СКЖК на 97%, 99% и 99%, соответственно. При этом при концентрации 0,9 мг/мл отмечали резкое увеличение количества клеток, находящихся в апоптозе, – на 22,9% (по 50% в стадии пикноза и апоптотических телец) и клеточный дебрис, возникший при полной деградации клеток.

В результате проведенного исследования установлена выраженная апоптотическая активность экстракта аврана в отношении культуры опухолевых клеток Saki; показана динамика развития клеточной гибели в результате апоптоза: пикноз ядра, образование апоптотических телец и возникновение клеточного дебриса в результате полной деградации опухолевых клеток.

**Морфологические изменения при влиянии экстрактами антоциановой кукурузы.** Через 24 ч после воздействия на культуру клеток Saki экстрактом кукурузы ВЗУ в концентрации 17,6 мг/мл не наблюдали изменения СКЖК (индекс пролиферации 0,86), но отмечали увеличение клеток в апоптозе, в основном за счет клеток, находящихся на стадии пикноза

| <b>Группы</b>                               | <b>СКЖК</b>                                  | <b>Индекс пролиф ерации</b> | <b>доля метафаз, анафаз и телофаз</b> | <b>доля апоптоз а<br/>(в п/зр)</b> | <b>Доля кл. в апоптозе</b>    |                                |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
|                                             |                                              |                             |                                       |                                    | <b>пикноз</b>                 | <b>апопт. тельца</b>           |
| <b>Культура клеток Сакі через 24 часа</b>   |                                              |                             |                                       |                                    |                               |                                |
| <b>Контроль</b>                             | 172,7±10,<br>8                               | 1                           | 1,2±0,3                               | 2,1±0,3                            | 49,2±11,<br>5                 | 50,8±11,<br>5                  |
| <b>экстракт аврана<br/>0,035 мг/мл</b>      | 168<br>±7,52                                 | 0,97                        | <b>2,5±0,3</b><br><b>*</b>            | <b>10,0±0,6</b><br><b>***</b>      | <b>80,7±1</b><br><b>*</b>     | <b>19,3±1</b><br><b>*</b>      |
| <b>экстракт аврана<br/>0,18 мг/мл</b>       | 154,6<br>±14,7                               | 0,89                        | 1,2±0,4                               | <b>13,3±1,6</b><br><b>***</b>      | <b>86,2±2,9</b><br><b>*</b>   | <b>13,8±2,9</b><br><b>*</b>    |
| <b>экстракт аврана 0,9<br/>мг/мл</b>        | <b>63,3</b><br><b>±6,7*</b>                  | 0,37                        | 0,0±0<br><b>***</b>                   | <b>19,7±2,5</b><br><b>***</b>      | <b>96,7±2,1</b><br><b>***</b> | <b>3,3±2,1</b><br><b>***</b>   |
| <b>экстракт бессмертника 17,6<br/>мг/мл</b> | <b>212,6</b><br><b>±6,52</b><br><b>**</b>    | 1,23                        | 1,3±0,2                               | <b>6,1±0,5</b><br><b>***</b>       | <b>78,6±2,2</b><br><b>*</b>   | <b>21,4±2,2</b><br><b>*</b>    |
| <b>экстракт кукурузы ВЗУ 17,6 мг/мл</b>     | 148<br>±7,07                                 | 086                         | 0,9±0,4                               | <b>5,8±0,1</b><br><b>***</b>       | <b>87,8±4,1</b><br><b>*</b>   | <b>12,2±4,1</b><br><b>*</b>    |
| <b>экстракт кукурузы ВОУ 17,6 мг/мл</b>     | <b>128±6,52</b><br><b>***</b>                | 0,74                        | 1,8±0,1                               | <b>13,8±4,1</b><br><b>**</b>       | <b>83,2±5,5</b><br><b>*</b>   | <b>16,8±5,5</b><br><b>*</b>    |
| <b>Культура клеток Сакі через 48 часов</b>  |                                              |                             |                                       |                                    |                               |                                |
| <b>Контроль</b>                             | 187±8,7                                      | 1                           | 0,0±0                                 | 0,0±0                              | 0,0±0                         | 0,0±0                          |
| <b>экстракт аврана<br/>0,035 мг/мл</b>      | <b>2±0,1</b><br><b>*****</b>                 | 0,01                        | 0,0±0                                 | 0,0±0                              | 0,0±0                         | 0,0±0                          |
| <b>экстракт аврана<br/>0,18 мг/мл</b>       | <b>1±0,44</b><br><b>***</b>                  | 0,01                        | 0,0±0                                 | 0,0±0                              | 0,0±0                         | 0,0±0                          |
| <b>экстракт аврана 0,9<br/>мг/мл</b>        | <b>5,5±1</b><br><b>***</b><br><b>■■■■■■■</b> | 0,03                        | 0,0±0                                 | <b>22,9±6</b><br><b>***</b>        | <b>50,0±28,</b><br><b>9*</b>  | <b>50,0±28,</b><br><b>9*</b>   |
| <b>экстракт бессмертника 17,6<br/>мг/мл</b> | <b>84,5</b><br><b>±8,7</b><br><b>***</b>     | 0,45                        | 0,0±0                                 | <b>4,6±1,4</b><br><b>**</b>        | 100,0±0                       | 0,0±0                          |
| <b>экстракт кукурузы ВЗУ 17,6 мг/мл</b>     | <b>47±18,33</b><br><b>***</b>                | 0,25                        | 0,0±0                                 | 2,3±1,3                            | 50,0±28,<br>8                 | 50,0±0                         |
| <b>экстракт кукурузы ВОУ 17,6 мг/мл</b>     | <b>53,6±21,5</b><br><b>***</b>               | 0,29                        | 0,0±0                                 | <b>20,2±9,4</b><br><b>*</b>        | <b>41,7±13,</b><br><b>9*</b>  | <b>58,3±13,</b><br><b>9***</b> |

Примечание: при \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,005$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  достоверность отличий между значениями экспериментальной и контрольной групп определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча

Через 48 часов при воздействии на культуру Саkі экстрактом кукурузы как ВЗУ, так и ВОУ в концентрации 17,6 мг/мл выявили уменьшение СКЖК по сравнению с контролем на 74,8% и 71,3%, соответственно, индекс пролиферации составил 0,24 и 0,28, соответственно. Только при воздействии кукурузы ВОУ отмечали увеличение числа клеток в апоптозе на 20,2% (Таблица 10, Рисунок 34 Б).

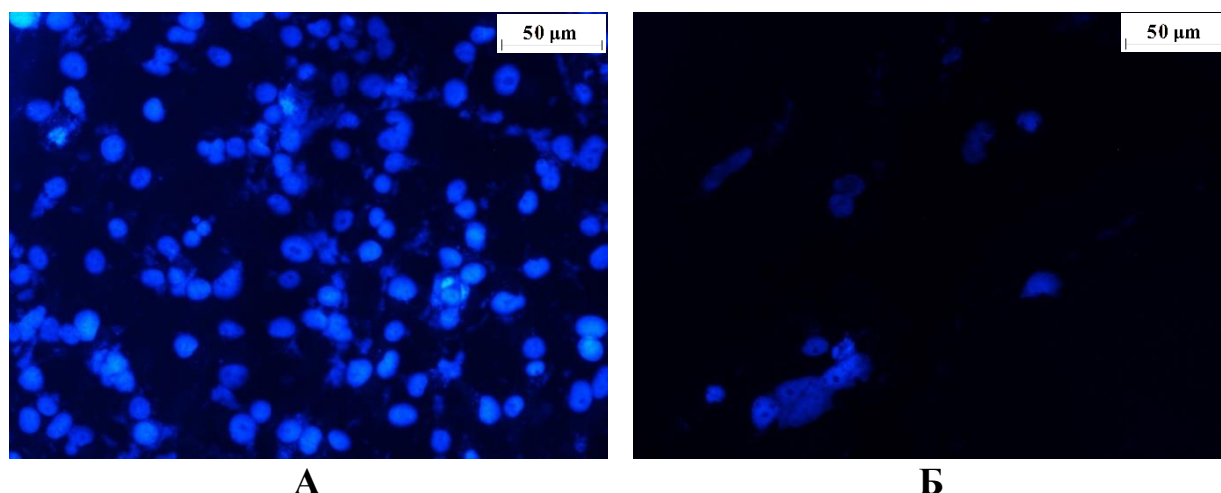
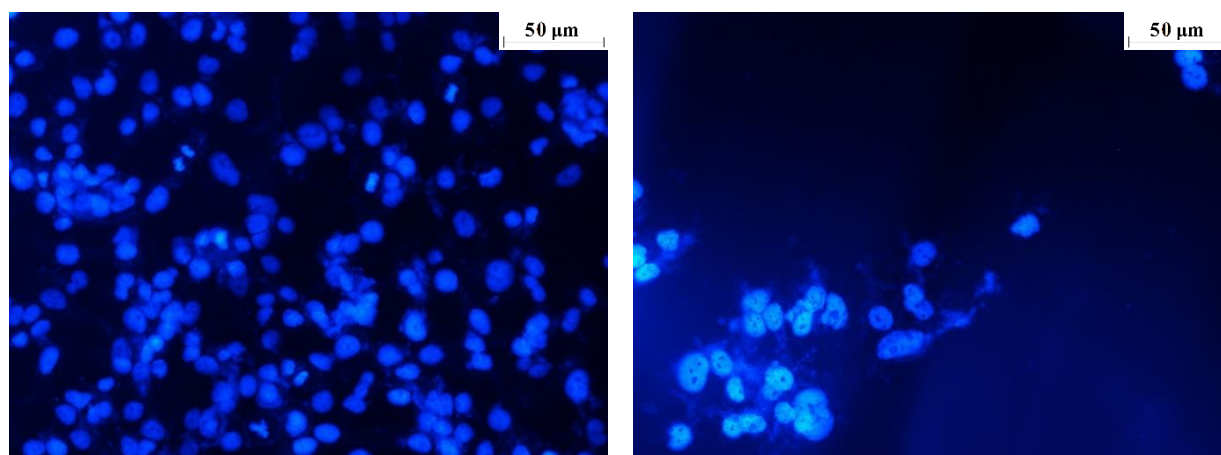


Рисунок 34. Клетки линии Саkі под действием экстракта кукурузы ВОУ при концентрации 17,6 мг/мл: А – через 24 ч, Б – через 48 ч, режим флуоресценции при 435-485нм, окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

**Влияние экстрактом бессмертника.** Через 24 ч при воздействии на культуру Саkі экстрактом бессмертника в концентрации 17,6 мг/мл (Рисунок 35 А) отмечали увеличение СКЖК на 23%, высокий индекс пролиферации 1,23, а также увеличение числа клеток в апоптозе на 3,9%, в основном за счет клеток на стадии пикноза (на 29,4% больше, чем в контроле).

Через 48 часов после воздействия экстрактом бессмертника в концентрации 17,6 мг/мл (Рисунок 35 Б) отмечали уменьшение СКЖК на 54,8% и увеличение количество клеток в апоптозе на 4,6%.

Таким образом, наибольшее количество клеток с морфологическими признаками апоптоза в отношении опухолевых клеток Саkі наблюдалось под воздействием экстрактов аврана и кукурузы ВОУ.



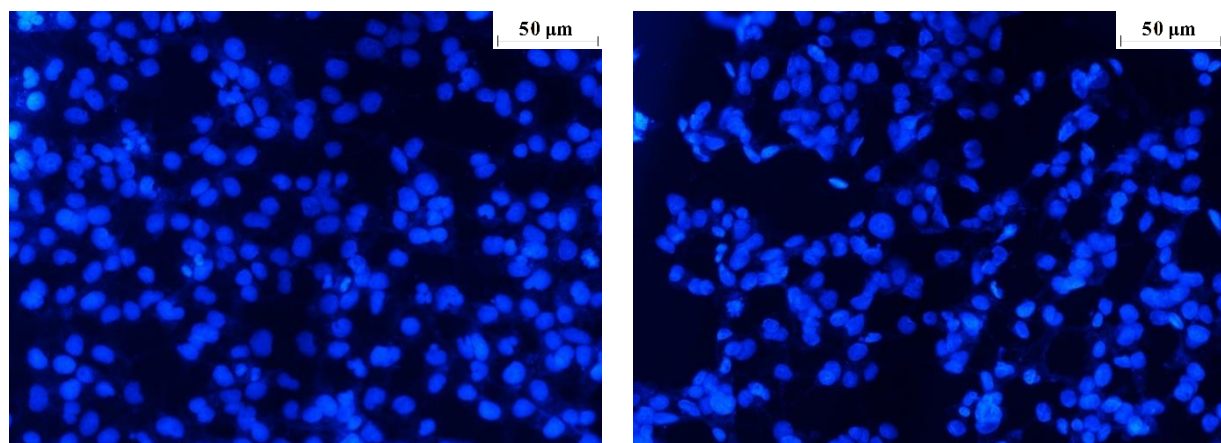
А

Б

Рисунок 35. Клетки линии Saki под действием экстракта бессмертника при концентрации 17,6 мг/мл: А – через 24 ч, Б – через 48 ч, режим флуоресценции при 435-485 нм, окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

**Клетки карциномы почки (Sn12c).** В контроле в клеточной культуре Sn12c через 24 ч наблюдали отсутствие клеток на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза и низкий процент клеток в апоптозе ( $1,8 \pm 0,1\%$ ), на стадии пикноза – ( $71,7 \pm 3,8\%$ ).

Через 48 ч отмечали незначительное (на 10%) уменьшение СКЖК, низкий процент клеток на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза и низкий процент клеток в апоптозе.



А

Б

Рисунок 36. Клетки линии Sn12c в контроле: А – через 24 ч, Б – через 48 ч, режим флуоресценции при 435-485 нм, окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200.

**Морфологические изменения при влиянии экстрактом аврана.** Через 24 ч в культуре клеток Sn12с при воздействии экстрактом аврана в концентрациях 0,035; 0,18 и 0,9 мг/мл наблюдали увеличение клеток в апоптозе, соответственно, на 7,9%, 11,2% и 17,6%, находящихся, преимущественно, на стадии пикноза (более 80%). При воздействии экстрактом в концентрации 0,9 мг/мл (Рисунок 37 А, Таблица 11) наблюдали также снижение СКЖК на 63,3%, низкий индекс пролиферации – 0,36 и отсутствие клеток на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза.

Через 48 ч при воздействии экстракта в концентрации 0,035 мг/мл наблюдали увеличение СКЖК на 14%, индекс пролиферации высокий – 1,14.

При концентрации 0,18 мг/мл отмечали увеличение СКЖК на 19,5% по сравнению с контролем, индекс пролиферации высокий – 1,19. Только при концентрации 0,9 мг/мл (Рисунок 37 Б) отмечали увеличение клеток в состоянии апоптоза на 81,4%, снижение СКЖК на 94,6% и очень низкий индекс пролиферации – 0,06.

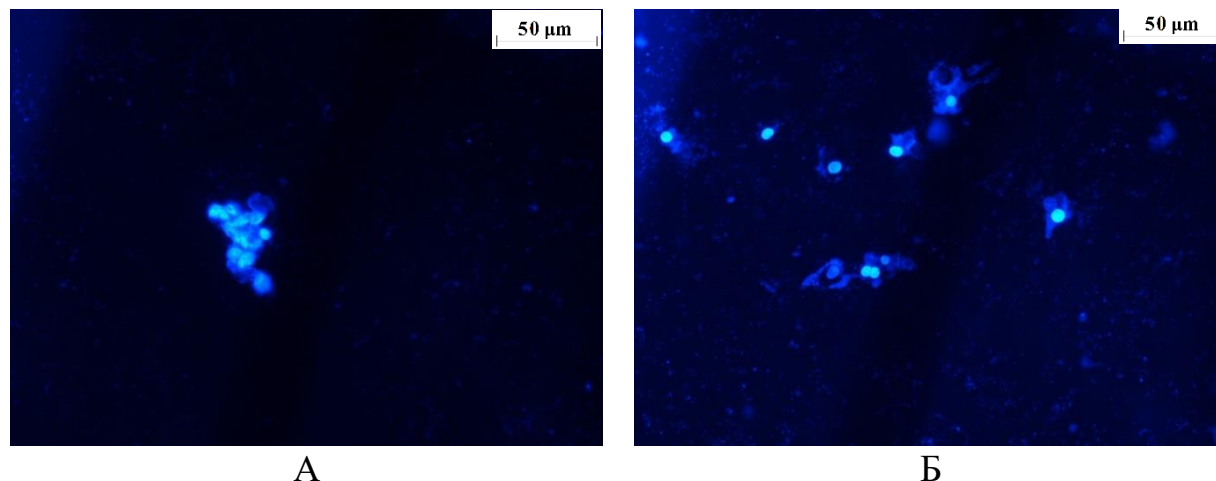


Рисунок 37. Клетки линии Sn12с после воздействия экстракта аврана в концентрации 17,6 мг/мл. Ув. 200: А – через 24 ч; Б – через 48 ч, режим флуоресценции при 435-485 нм, окраска красителем Хехст 33258.

**Морфологические изменения при влиянии экстрактами антоциановой кукурузы.** Через 24 ч после воздействия на культуру Sn12с (Рисунок 38) экстрактом кукурузы ВЗУ в концентрации 17,6 мг/мл выявили

увеличение количества клеток в апоптозе на 3,5%. При воздействии экстракта кукурузы ВОУ значимых изменений не выявили (Таблица 11).

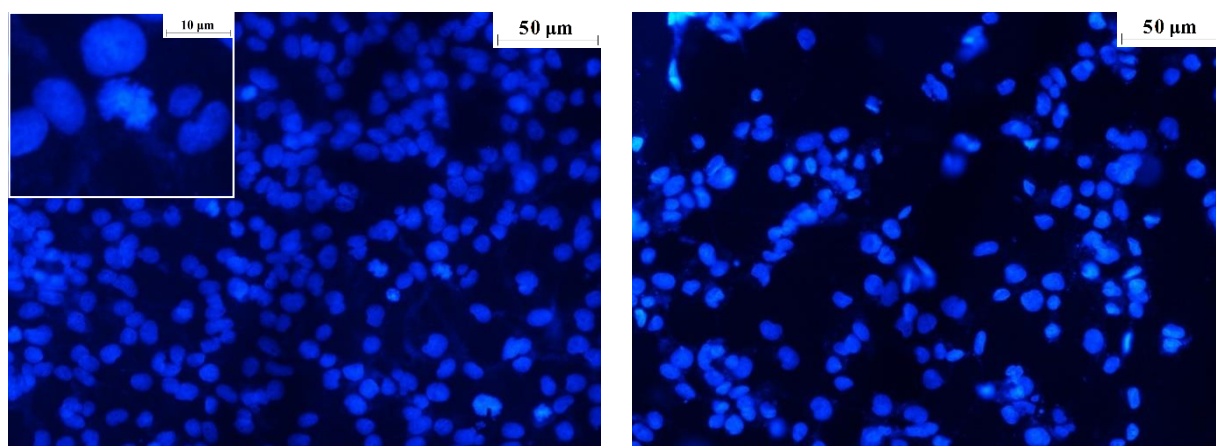
Таблица 11 –Морфологические показатели жизнеспособности и гибели опухолевых клеток Sn12с под действием экстрактов

| Группа                                 | СКЖК                   | Индекс<br>пролиф. | Доля<br>метафаз,<br>анафаз и<br>телофаз | доля<br>апоптоза<br>(в п/зр) | Доля кл. в апоптозе |                           |
|----------------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------------|
|                                        |                        |                   |                                         |                              | Пикноз<br>в п/зр    | Апопто-<br>зные<br>тельца |
| Культура клеток Sn12с через 24 часов   |                        |                   |                                         |                              |                     |                           |
| Контроль                               | 261,3<br>±16,04        | 1                 | 0,0±0                                   | 1,8±0,1                      | 71,7±3,8            | 28,3±3,8                  |
| Экстракт аврана<br>0,035 мг/мл         | 269±22                 | 1,03              | 0,2±0,1                                 | 3,4±0,6<br>*                 | 91,9±2,6<br>***     | 8,1±2,6<br>***            |
| Экстракт аврана<br>0,18 мг/мл          | 291,6<br>±9,2          | 1,11              | 0,5±0,2                                 | 3,6±0,9*                     | 55,7±11,<br>3       | 44,3±11,3                 |
| Экстракт аврана<br>0,9 мг/мл           | 16,66<br>±5,5<br>****  | 0,06              | 0,0±0                                   | 84,2±10<br>****              | 100,0±0<br>****     | 0,0±0<br>****             |
| Экстракт<br>бессмертника 17,6<br>мг/мл | 320,6<br>±6,17<br>***  | 1,22              | 0,2±0,1                                 | 3,2±0,1<br>****              | 35,8±2,7<br>****    | 64,2±2,7<br>****          |
| Экстракт<br>кукурузы ВЗУ<br>17,6 мг/мл | 294<br>±8,52           | 1,12              | 0,2±0,1                                 | 5,3±0,5<br>****              | 68,6±3,4            | 31,4±3,4                  |
| Экстракт<br>кукурузы ВОУ<br>17,6 мг/мл | 244±14                 | 0,93              | 0,3±0,2                                 | 1,8±0,2                      | 48,9±15,<br>7       | 51,1±15,7                 |
| Культура клеток Sn12с через 48 часов   |                        |                   |                                         |                              |                     |                           |
| Контроль                               | 235,6±8                | 1                 | 0,4±0,1                                 | 2,1±0,3                      | 48,8±15,<br>4       | 51,2±15,4                 |
| Экстракт аврана<br>0,035 мг/мл         | 268<br>±3,5<br>***     | 1,14              | 0,6±0,1                                 | 1,7±0,1                      | 77,5±1,4            | 22,5±1,4                  |
| Экстракт аврана<br>0,18 мг/мл          | 281,75<br>±5,5<br>**** | 1,19              | 0,0±0<br>*                              | 3,3±1,3                      | 50,4±11,<br>2       | 44,6±5,7                  |
| Экстракт аврана<br>0,9 мг/мл           | 12,5±1,<br>1<br>****   | 0,05              | 0,0±0<br>*                              | 95,0±2,9<br>****             | 100,0±0<br>*        | 0,0±0<br>*                |
| Экстракт<br>бессмертника 17,6<br>мг/мл | 254<br>±8,81           | 1,08              | 0,4±0,3                                 | 5,0±1,3                      | 91,7±2,8<br>*       | 8,3±2,8<br>*              |
| Экстракт<br>кукурузы ВЗУ<br>17,6 мг/мл | 262±4<br>**            | 1,11              | 0,1±0,1                                 | 1,1±0,1                      | 88,9±7<br>*         | 11,1±7<br>*               |
| Экстракт<br>кукурузы ВОУ<br>17,6 мг/мл | 174,3<br>±14,3<br>***  | 0,74              | 0,0±0<br>*                              | 10,0±3,3<br>*                | 92,3±4,9<br>*       | 7,7±4,9<br>*              |

Примечание: при \* -  $p<0,05$ , \*\* -  $p<0,005$ , \*\*\* -  $p<0,001$  достоверность отличий между значениями экспериментальной и контрольной групп определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча

Через 48 ч после воздействия экстрактом кукурузы ВЗУ в концентрации 0,352 мг/мл выявили увеличение СКЖК на 11,5% и увеличение доли пикнотичных клеток при одинаковом с контролем общем числе клеток в

апоптозе. После воздействия экстрактом кукурузы ВОУ в той же концентрации (Рисунок 38 Б) отмечали уменьшение СКЖК на 25,8%, уменьшение клеток на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза на 0,4% по сравнению с контролем, низкий индекс пролиферации (0,74), а также увеличение количества клеток в апоптозе на 7,9%, преимущественно за счет клеток в стадии пикноза.



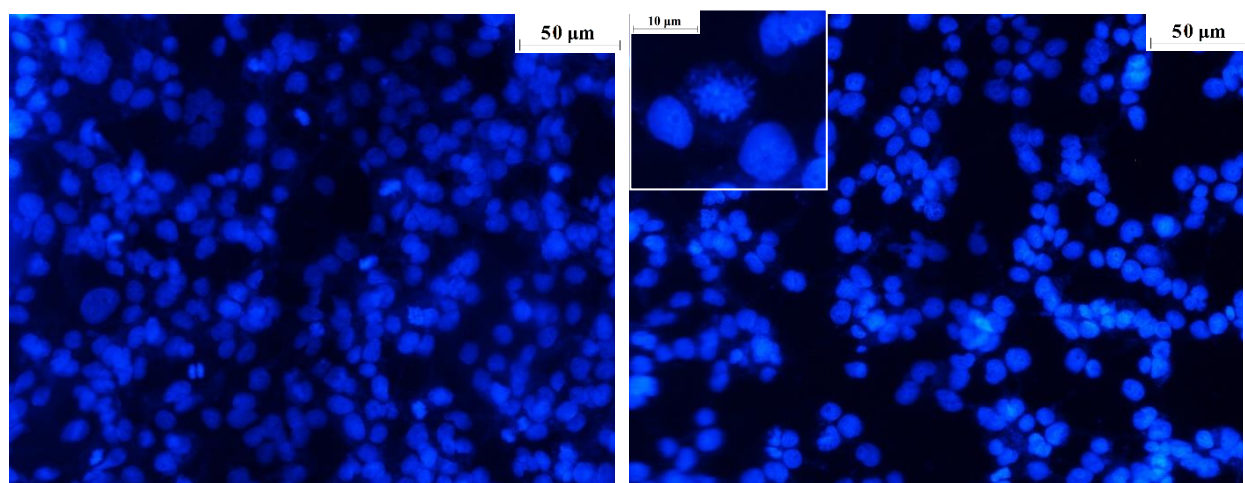
А

Б

Рисунок 38. Клетки линии Sn12с после воздействия экстракта кукурузы ВЗУ в концентрации 17,6 мг/мл. Ув. 200: А – через 24 ч, Б – через 48 ч, режим флуоресценции при 435-485 нм, окраска красителем Хехст 33258.

**Морфологические изменения при влиянии экстрактом бессмертника.** Через 24 ч после воздействия на культуру Sn12с экстрактом бессмертника в концентрации 17,6 мг/мл (Рисунок 39 А) наблюдали увеличение СКЖК на 22,6% и отсутствие клеток на стадиях метафазы, анафазы и телофазы митоза. Индекс пролиферации составил 1,22. Отмечали увеличение на 1,4% по сравнению с контролем количества клеток в состоянии апоптоза, преимущественно за счет клеток в состоянии пикноза.

Через 48 ч после воздействия экстракта в концентрации 17,6 мг/мл (Рисунок 39Б) СКЖК не изменилось. Наблюдали увеличение количества клеток в состоянии апоптоза на 2,9% по сравнению с контролем, преимущественно за счет увеличения числа клеток в состоянии пикноза на 42,9%. Индекс пролиферации – 1,08.



А

Б

Рисунок 39. Клетки линии Sn12c под действием экстракта бессмертника в концентрации 17,6 мг/мл. Окраска красителем Хехст 33258. Ув. 200: А – через 24 ч; Б – через 48 ч, режим флуоресценции при 435-485 нм.

В результате проведенной работы установлено, что цитостатической активностью в отношении культуры Sn12c обладают экстракты аврана при концентрации 1,76 мг/мл в первые сутки воздействия и при концентрациях 1,76 и 0,18 мг/мл через 48 ч, а также экстракты кукурузы ВОУ только через 48 ч при концентрации 17,6 мг/мл. При всех исследованных концентрациях экстракта аврана в течение первых суток воздействия отмечали активацию апоптоза. Зависимость являлась прямой и линейной, то есть с увеличением концентрации усиливалась апоптотическая активность; через 48 ч такая активность сохранялась только при концентрации 0,9 мг/мл.

#### **3.4. Морфологические показатели жизнеспособности и апоптотической гибели опухолевых клеток рака шейки матки человека (HeLa), карциномы молочной железы (SK-BR-3) и карцином почки (Сакі-1, Sn12c)**

Выраженной (более 11%) апоптотической активностью через 24 ч воздействия обладал экстракт аврана (в отношении всех исследованных культур опухолевых клеток) и экстракт кукурузы ВОУ (в отношении культуры клеток рака почки Сакі-1). Наиболее чувствительными к воздействию

экстракта аврана оказались клетки рака шейки матки HeLa и рака почки Сакі-1 (Таблица 12).

Через 48 ч воздействия экстрактов количество клеток с морфологическими признаками апоптоза не менялось. (Таблица 12).

СКК в поле зрения уменьшалось (цитостатическая активность) через 24 часа после воздействия экстракта аврана (в отношении всех культур), экстракта бессмертника (в отношении всех культур), экстракта кукурузы ВЗУ (в отношении культуры клеток SK-BR-3) и экстракта кукурузы ВОУ (в отношении культуры клеток SK-BR-3 и Сакі-1).

Через 48 часов среднее количество клеток в поле зрения могло оставаться неизменным, увеличиваться или уменьшаться по сравнению с контролем в зависимости от вида клеточной культуры и действующего экстракта.

Таблица 12 – Концентрации экстрактов, при которых через 24 ч и 48 ч воздействия цитологические признаки апоптоза возникают более чем в 11% клеток опухолей человека

| Экстракты           | Культуры опухолевых клеток человека |      |              |              |                     |               |              |              |
|---------------------|-------------------------------------|------|--------------|--------------|---------------------|---------------|--------------|--------------|
|                     | HeLa                                |      | SK-BR-3      |              | Сакі-1              |               | Sn12c        |              |
|                     | 24 ч                                | 48 ч | 24 ч         | 48 ч         | 24 ч                | 48 ч          | 24 ч         | 48 ч         |
| <b>Аврана</b>       | 0,09<br>мг/мл                       | -    | 0,9<br>мг/мл | 0,9<br>мг/мл | 0,18 - 0,9<br>мг/мл | 0,9<br>мг/мл  | 0,9<br>мг/мл | 0,9<br>мг/мл |
| <b>Бессмертника</b> | -                                   | -    | -            | -            | -                   | -             | -            | -            |
| <b>Кукурузы ВЗУ</b> | -                                   | -    | -            | -            | -                   | -             | -            | -            |
| <b>Кукурузы ВОУ</b> | -                                   | -    | -            | -            | 17,6<br>мг/мл       | 17,6<br>мг/мл | -            | -            |

В ряде случаев цитостатическая активность проявлялась только на вторые сутки воздействия: под действием экстракта кукурузы ВЗУ в отношении клеток HeLa, Сакі-1 и Sn12c, а также экстракта кукурузы ВОУ в отношении клеток HeLa и Sn12c (Таблица 13).

Перечисленные изменения прежде всего отражают индивидуальность активности как экстрактов в определенной концентрации, так и избирательность клеточных линий к воздействию разных экстрактов.

Таким образом, три из четырех исследованных нами экстрактов, содержащих флавоноиды, – экстракты аврана, бессмертника и антоциановой кукурузы ВОУ – обнаружили в той или иной степени противоопухолевую активность в отношении разных культур опухолевых клеток. Экстракт аврана вызывал изменения во всех исследуемых культурах опухолевых клеток. Обращает на себя внимание, что у одного и того же экстракта могли проявляться разные активности, что, по-видимому, является результатом действия разных его компонентов. В любом случае, сумма таких эффектов, как цитостатическая и апоптотическая активность на фоне низкой токсичности экстракта, безусловно, предопределяет перспективность его дальнейшего исследования в экспериментах *in vivo*.

Таблица 13 – Концентрации экстрактов, вызывающие подавление пролиферации клеток (цитостатическая активность) через 24 ч и 48 ч воздействия

| Экстракты                 | Культуры опухолевых клеток человека |                     |                          |                          |               |                     |               |               |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|---------------------|---------------|---------------|
|                           | HeLa                                |                     | SK-BR-3                  |                          | Сакі-1        |                     | Sn12c         |               |
|                           | 24 ч                                | 48 ч                | 24 ч                     | 48 ч                     | 24 ч          | 48 ч                | 24 ч          | 48 ч          |
| <b>Авра́на</b>            | 0,4 – 24<br>мг/мл                   | 0,4 – 24<br>мг/мл   | 0,9<br>мг/мл             | 0,9<br>мг/мл             | 0,9<br>мг/мл  | 0,035 -<br>0,9мг/мл | 0,9<br>мг/мл  | 0,9<br>мг/мл  |
| <b>Бессмерт-<br/>ника</b> | 0,009 –<br>17,3<br>мг/мл            | 0,75 – 10<br>мг/мл  | 0,071 -<br>1,76<br>мг/мл | 0,071 -<br>1,76<br>мг/мл | 17,6<br>мг/мл | 17,6<br>мг/мл       | 17,6<br>мг/мл | -             |
| <b>Кукурузы<br/>ВЗУ</b>   | -                                   | 0,011 –<br>10 мг/мл | 1,76<br>мг/мл            | 1,76<br>мг/мл            | -             | 17,6<br>мг/мл       | -             | 17,6<br>мг/мл |
| <b>Кукурузы<br/>ВОУ</b>   | -                                   | 5 – 10<br>мг/мл     | 0,071<br>1,76<br>мг/мл   | 0,071<br>1,76<br>мг/мл   | 17,6<br>мг/мл | 17,6<br>мг/мл       | -             | 17,6<br>мг/мл |

### **3.5. Оценка активации апоптоза в опухолевых клетках линий Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарцином молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, карциномы почки A498 под действием разных экстрактов**

Клеточные линии обрабатывали экстрактами бессмертника песчаного, антоциановой кукурузы и аврана лекарственного при концентрации 0,9 мг/мл. Аннексин V, меченный FITC, окрашивал клетки, находившиеся в раннем апоптозе. Двойное окрашивание аннексином V и йодистым пропидием свидетельствовало о наличии позднего апоптоза.

***Индукция апоптоза под действием экстракта бессмертника.*** Более 11% клеток, погибших апоптозом, наблюдали при действии экстракта бессмертника в концентрации 0,9 мг/мл на четырех культурах опухолевых клеток человека: карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, аденокарциномы молочной железы MCF-7 (Рисунок 40, Таблица 14).

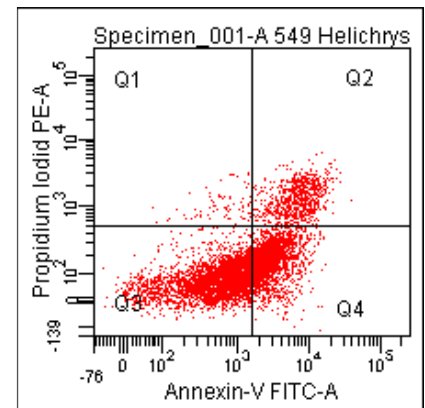
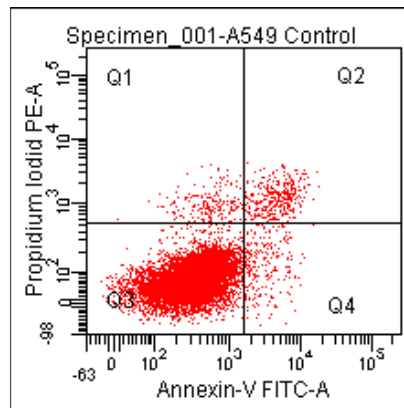
Через сутки детектировали клетки, находившиеся в раннем апоптозе (от 36,1% на линии карциномы легкого A549 до 49,2% на линии карциномы толстой кишки HCT-116) и позднем апоптозе (от 11,7% на линии карциномы толстой кишки HCT-116 до 37,7% на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7) (Рисунок 40, Таблица 14), что свидетельствует о наличии противоопухолевой активности у экстракта бессмертника и его способности активировать апоптоз в исследованной концентрации. Кроме того, клетки разных культур реагировали с разной чувствительностью: в одних преобладал ранний апоптоз, в других – поздний апоптоз или даже полное разрушение клеток.

**Клеточная  
культура**

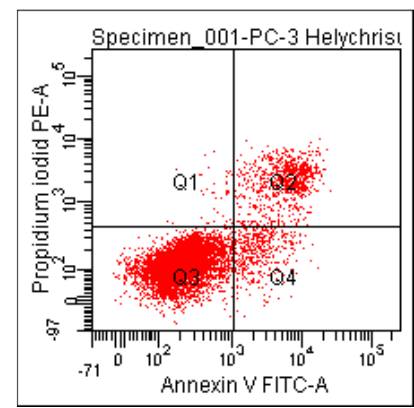
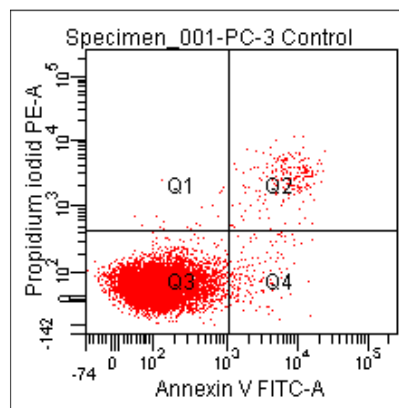
**Контроль**

**Экстракт бессмертника**

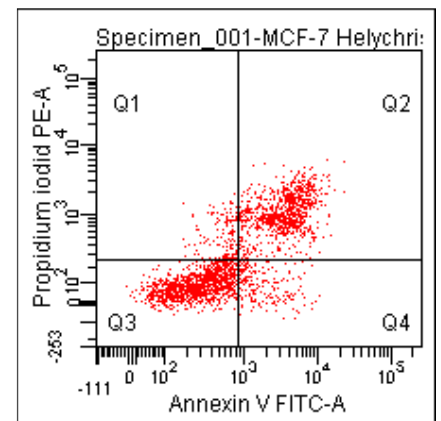
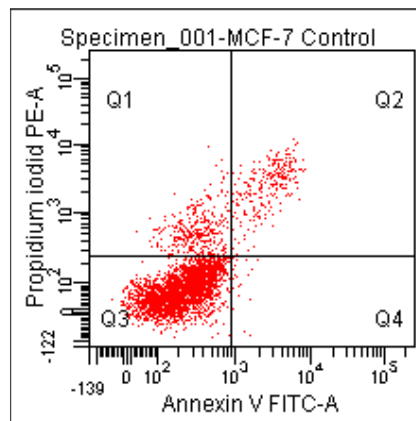
**A549**



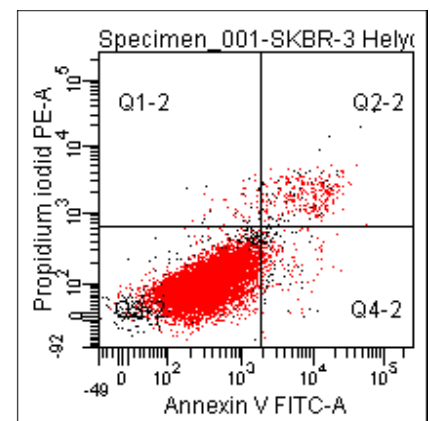
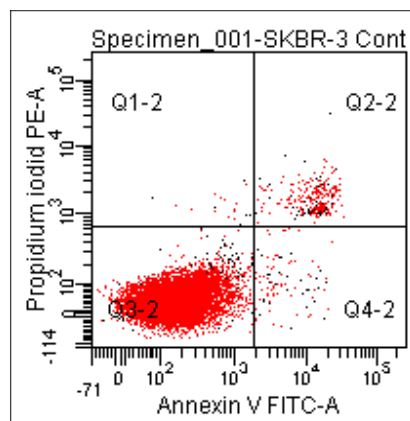
**PC-3**



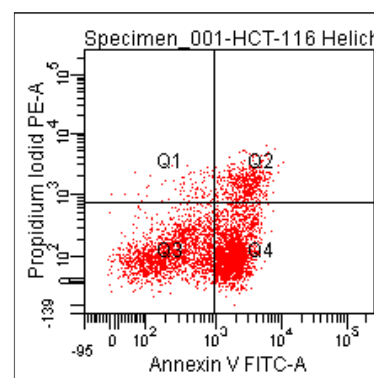
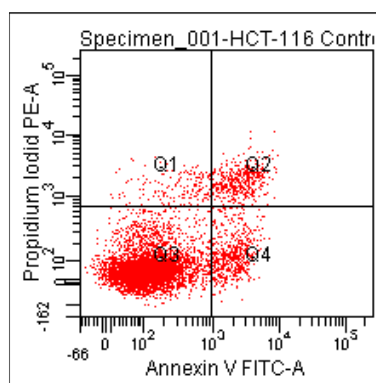
**MCF-7**



**SK-BR-3**



HCT-116



Jurkat

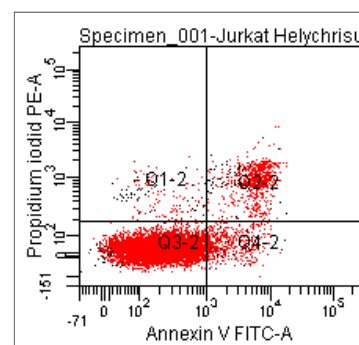
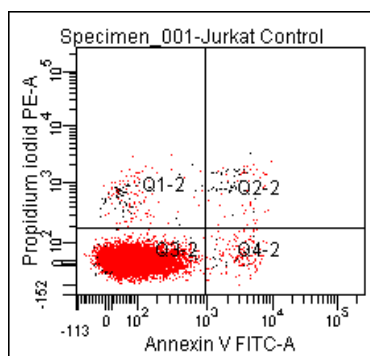


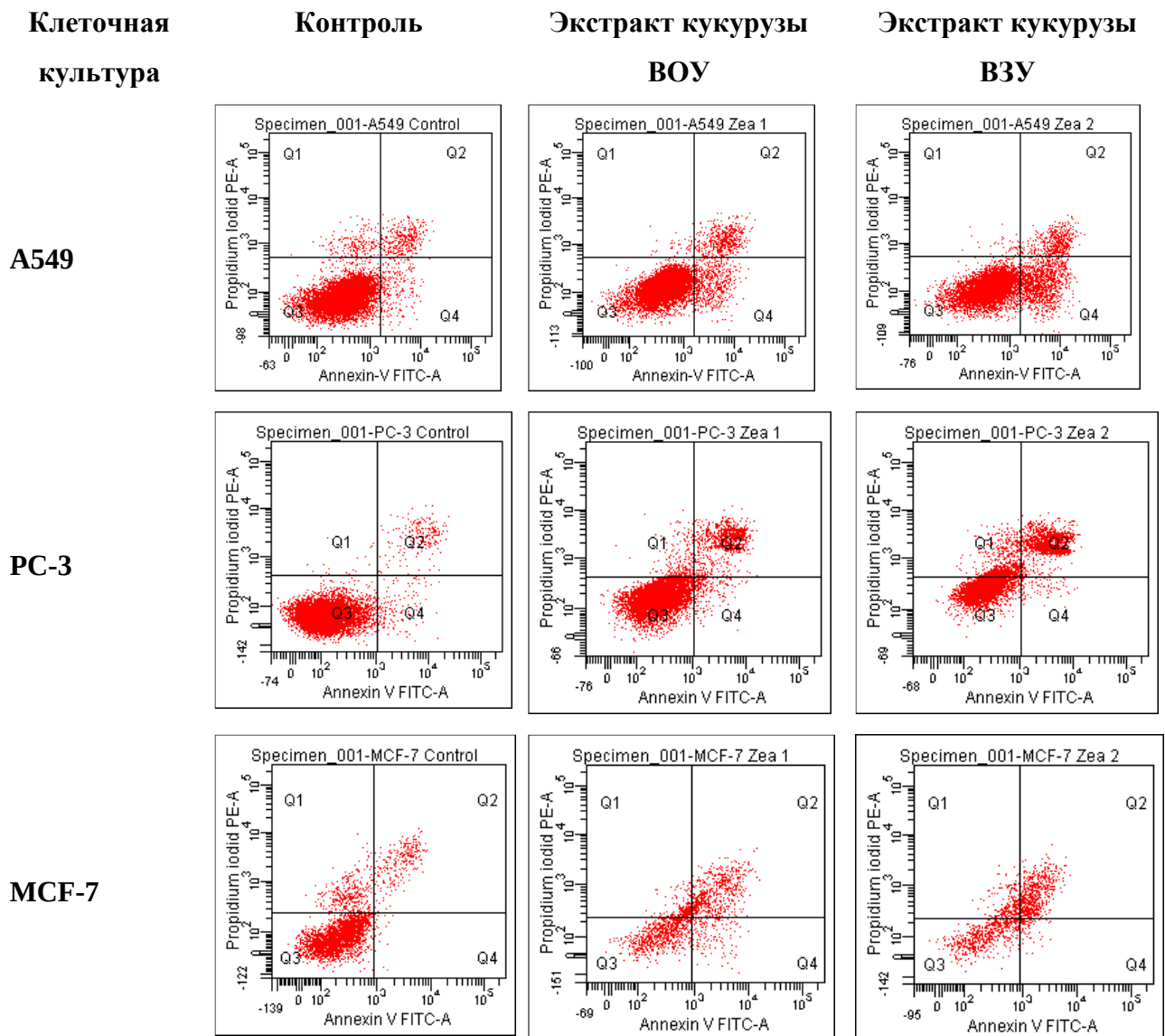
Рисунок 40. Результаты проточной цитофлуориметрии по воздействию экстракта бессмертника в концентрации 0,9 мг/мл в отношении опухолевых клеток человека: Jurkat – Т-клеточного лимфобластного лейкоза, MCF-7 – аденокарциномы молочной железы, A549 – карциномы легкого, PC-3 – карциномы простаты, HCT-116 – карциномы толстой кишки, SK-BR-3 – карциномы молочной железы человека.

Таблица 14 – Процентное распределение клеток опухолей при воздействии экстракта бессмертника в концентрации 0,9 мг/мл по данным проточной цитофлуориметрии

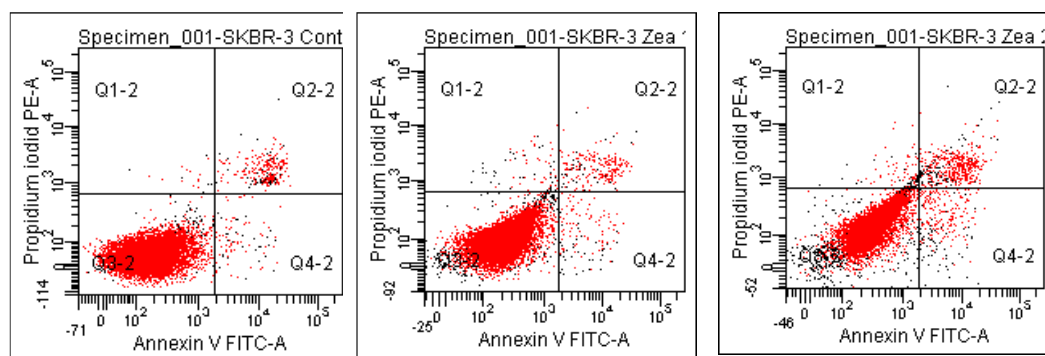
| Клеточные линии | Группа      | Квадрат Q3<br>Живые клетки<br>(AnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> ), % | Квадрат Q4<br>Ранние<br>апоптотические<br>клетки (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> ), % | Квадрат Q2<br>Поздние<br>апоптотические<br>клетки (AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> ), % | Квадрат Q1<br>Некротические<br>клетки (AnV <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> ), % |
|-----------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| A549            | Контроль    | 90,8±3,1                                                              | 2,9±1,5                                                                                  | 4,1±1,2                                                                                   | 2,3±0,2                                                                       |
|                 | Бессмертник | <b>51,6±4,2*</b>                                                      | <b>36,1±2,2*</b>                                                                         | <b>10,2±2,4*</b>                                                                          | <b>1,1±0,6</b>                                                                |
| PC-3            | Контроль    | 95,7±2,7                                                              | 1,6±1,1                                                                                  | 2,4±0,8                                                                                   | 0,2±0,1                                                                       |
|                 | Бессмертник | <b>81,4±3,8*</b>                                                      | <b>6,0±2,1*</b>                                                                          | <b>12,0±2,1*</b>                                                                          | <b>0,7±0,2*</b>                                                               |
| HCT-116         | Контроль    | 79,4±2,4                                                              | 9,9±2,8                                                                                  | 7,6±1,8                                                                                   | 3,0±1,2                                                                       |
|                 | Бессмертник | <b>37,3±1,5*</b>                                                      | <b>49,2±5,2*</b>                                                                         | <b>11,7±2,4*</b>                                                                          | <b>1,8±0,5*</b>                                                               |
| MCF-7           | Контроль    | 81,5±4,9                                                              | 0,7±0,5                                                                                  | 8,0±2,2                                                                                   | 9,9±2,4                                                                       |
|                 | Бессмертник | <b>47,8±3,4*</b>                                                      | <b>7,7±3,7*</b>                                                                          | <b>37,7±4,2*</b>                                                                          | <b>6,7±1,8</b>                                                                |
| SK-BR-3         | Контроль    | 96,7±2,8                                                              | 0,9±0,4                                                                                  | 2,3±1,2                                                                                   | 0,2±0,1                                                                       |
|                 | Бессмертник | <b>94,2±3,1</b>                                                       | <b>2,6±0,8*</b>                                                                          | <b>2,6±1,5</b>                                                                            | <b>0,5±0,3</b>                                                                |
| Jurkat          | Контроль    | 97,2±1,5                                                              | 1,4±0,7                                                                                  | 0,4±0,2                                                                                   | 1,0±0,4                                                                       |
|                 | Бессмертник | <b>87,3±5,5*</b>                                                      | <b>4,3±1,2*</b>                                                                          | <b>7,5±2,1*</b>                                                                           | <b>0,9±0,4</b>                                                                |

Примечание: \* достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

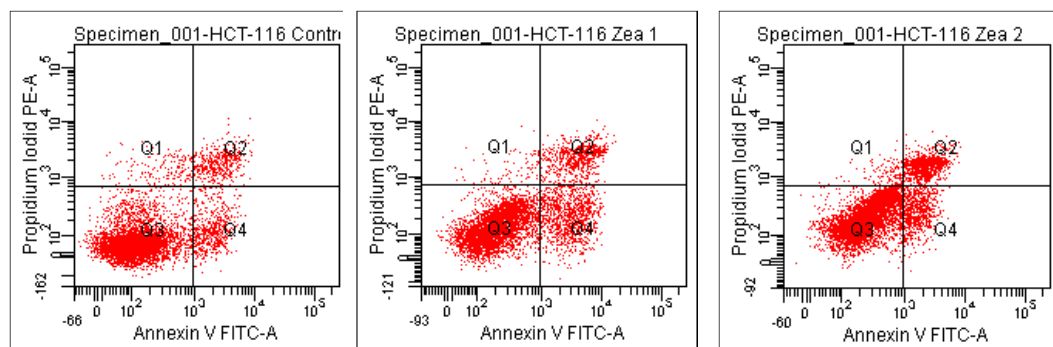
**Индукция апоптоза под действием экстрактов антоциановой кукурузы.** Экстракты антоциановой кукурузы в концентрации 0,9 мг/мл также проявляли противоопухолевое действие в отношении пяти исследованных линий опухолевых клеток человека: карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, аденокарциномы молочной железы MCF-7, Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat. Все они дали более 11% клеток, погибших апоптозом) (Рисунок 41, Таблица 15).



SK-BR-3



HCT-116



Jurkat

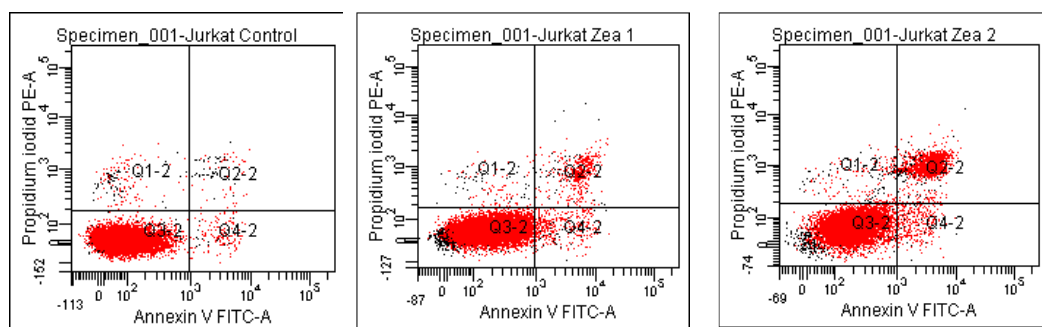


Рисунок 41. Результаты проточной цитофлуориметрии по воздействию экстракта антоциановой кукурузы в концентрации 0,9 мг/мл в отношении опухолевых клеток человека: Jurkat – Т-клеточного лимфобластного лейкоза, MCF-7 – аденокарциномы молочной железы, A549 – карциномы легкого, PC-3 – карциномы простаты, HCT-116 – карциномы толстой кишки, SK-BR-3 – карциномы молочной железы человека.

В исследованной концентрации экстракта антоциановой кукурузы ВОУ через сутки определяли клетки, находившиеся в раннем апоптозе на линии карциномы толстой кишки HCT-116 (18,6%), в позднем апоптозе (от 11,9% на линии карциномы простаты PC-3 до 35,7% на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7) (Рисунок 41, Таблица 15).

В исследованной концентрации экстракта антоциановой кукурузы ВЗУ через сутки обнаруживали клетки, находившиеся в раннем апоптозе на линии карциномы легкого A549 (16,7%), в позднем апоптозе (от 15,6% на линии

карциномы толстой кишки НСТ-116 до 39,8% на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7) (Рисунок 41, Таблица 15).

Таблица 15 – Распределение опухолевых клеток при воздействии экстракта антоциановой кукурузы ВОУ/ВЗУ в концентрации 0,9 мг/мл по данным проточной цитофлуориметрии

| Клеточные линии | Группа                | Квадрат Q3<br>Живые клетки<br>(AnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> ), % | Квадрат Q4<br>Ранние апоптотические клетки<br>(AnV <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> ), % | Квадрат Q2<br>Поздние апоптотические клетки<br>(AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> ), % | Квадрат Q1<br>Некротические клетки<br>(AnV <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> ), % |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A549</b>     | Контроль              | 90,8±3,1                                                              | 2,9±1,5                                                                               | 4,1±1,2                                                                                | 2,3±0,2                                                                       |
|                 | Экстракт кукурузы ВОУ | <b>84,9±2,4</b>                                                       | <b>7,7±1,8*</b>                                                                       | <b>6,9±1,7</b>                                                                         | <b>0,5±0,2*</b>                                                               |
|                 | Экстракт кукурузы ВЗУ | <b>76,1±3,8*</b>                                                      | <b>16,7±2,7*</b>                                                                      | <b>6,6±1,8</b>                                                                         | <b>0,6±0,3*</b>                                                               |
| <b>PC-3</b>     | Контроль              | 95,7±2,7                                                              | 1,6±1,1                                                                               | 2,4±0,8                                                                                | 0,2±0,1                                                                       |
|                 | Экстракт кукурузы ВОУ | <b>81,9±3,2*</b>                                                      | <b>2,8±0,7</b>                                                                        | <b>11,9±3,4*</b>                                                                       | <b>3,3±1,2*</b>                                                               |
|                 | Экстракт кукурузы ВЗУ | <b>65,6±2,5*</b>                                                      | <b>1,2±0,3</b>                                                                        | <b>21,5±4,7*</b>                                                                       | <b>11,7±3,4*</b>                                                              |
| <b>НСТ-116</b>  | Контроль              | 79,4±2,4                                                              | 9,9±2,8                                                                               | 7,6±1,8                                                                                | 3,0±1,2                                                                       |
|                 | Экстракт кукурузы ВОУ | <b>67,0±3,2*</b>                                                      | <b>18,6±4,1*</b>                                                                      | <b>12,9±3,5*</b>                                                                       | <b>1,6±0,7</b>                                                                |
|                 | Экстракт кукурузы ВЗУ | <b>72,6±3,5*</b>                                                      | <b>10,0±1,1</b>                                                                       | <b>15,6±4,2*</b>                                                                       | <b>1,7±0,4</b>                                                                |
| <b>MCF-7</b>    | Контроль              | 81,5±4,9                                                              | 0,7±0,5                                                                               | 8,0±2,2                                                                                | 9,9±2,4                                                                       |
|                 | Экстракт кукурузы ВОУ | <b>43,8±7,5*</b>                                                      | <b>8,9±2,4*</b>                                                                       | <b>35,7±3,4*</b>                                                                       | <b>11,7±2,1</b>                                                               |
|                 | Экстракт кукурузы ВЗУ | <b>39,2±6,4*</b>                                                      | <b>5,7±2,1*</b>                                                                       | <b>39,8±4,8*</b>                                                                       | <b>15,3±2,6*</b>                                                              |
| <b>SK-BR-3</b>  | Контроль              | 96,7±2,8                                                              | 0,9±0,4                                                                               | 2,3±1,2                                                                                | 0,2±0,1                                                                       |
|                 | Экстракт кукурузы ВОУ | <b>96,2±3,1</b>                                                       | <b>1,0±0,1</b>                                                                        | <b>2,2±0,3</b>                                                                         | <b>0,6±0,2</b>                                                                |
|                 | Экстракт кукурузы ВЗУ | <b>90,4±4,5*</b>                                                      | <b>1,5±0,5</b>                                                                        | <b>5,4±2,3*</b>                                                                        | <b>2,7±1,4*</b>                                                               |
| <b>Jurkat</b>   | Контроль              | 97,2±1,5                                                              | 1,4±0,7                                                                               | 0,4±0,2                                                                                | 1,0±0,4                                                                       |
|                 | Экстракт кукурузы ВОУ | <b>91,6±4,2</b>                                                       | <b>3,5±0,7</b>                                                                        | <b>4,3±0,9*</b>                                                                        | <b>0,7±0,3</b>                                                                |
|                 | Экстракт кукурузы ВЗУ | <b>79,7±7,1*</b>                                                      | <b>3,0±1,1</b>                                                                        | <b>16,0±2,2*</b>                                                                       | <b>1,4±0,7</b>                                                                |

Примечание: \* достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

Таким образом, экстракт антоциановой кукурузы ВЗУ проявил противоопухолевую активность на сравнительно большем числе линий опухолевых клеток человека, чем экстракт антоциановой кукурузы ВОУ.

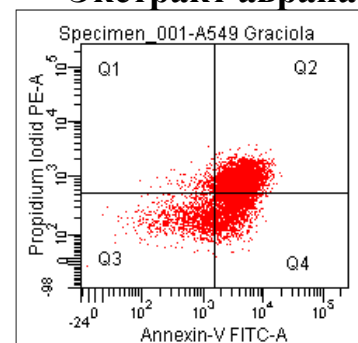
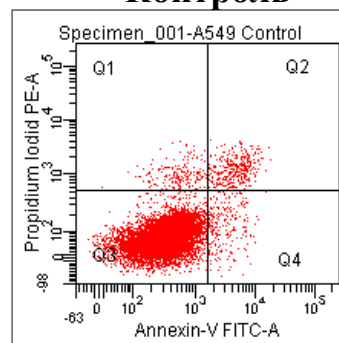
**Индукция апоптоза под действием экстракта аврана.** Во всех исследованных линиях опухолевых клеток человека отмечали увеличение количества клеток в состоянии апоптоза при действии экстракта аврана в концентрации 0,9 мг/мл, в отличие от контроля (Рисунок 42, Таблица 16).

### Клеточная культура

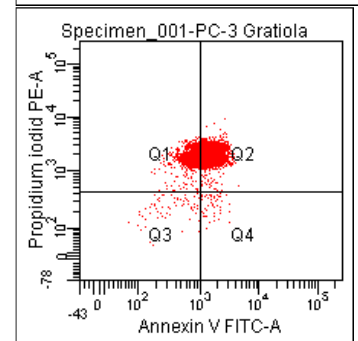
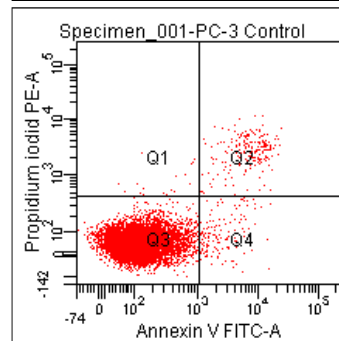
### Контроль

### Экстракт аврана

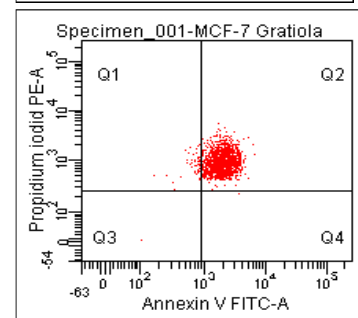
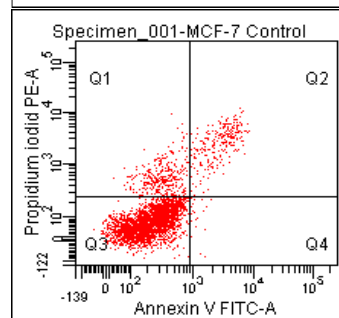
A549



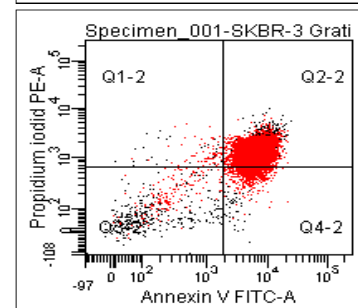
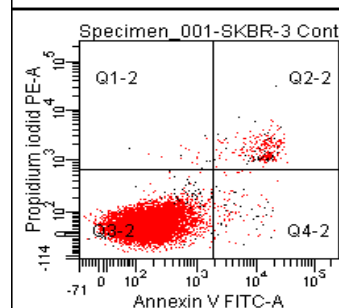
PC-3



MCF-7



SK-BR-3



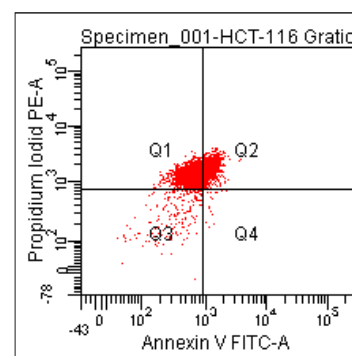
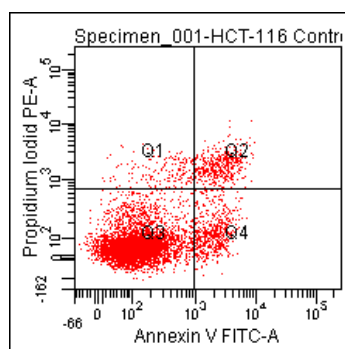
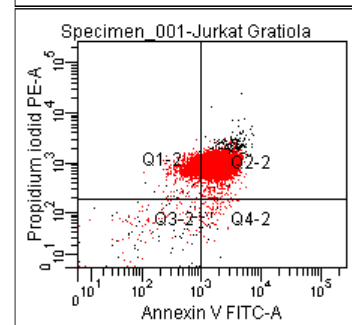
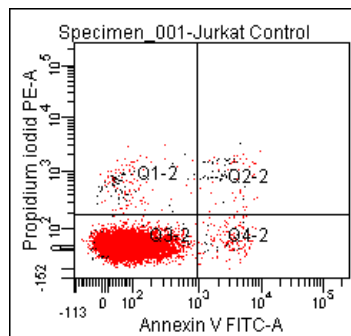
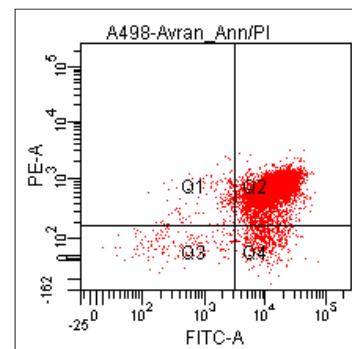
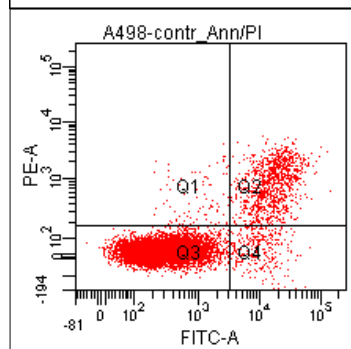
**HCT-116****Jurkat****A498**

Рисунок 42. Результаты проточной цитофлуориметрии по воздействию экстракта аврана лекарственного в концентрации 0,9 мг/мл в отношении опухолевых клеток человека: Jurkat – Т-клеточного лимфобластного лейкоза, MCF-7 – аденокарциномы молочной железы, A549 – карциномы легкого, PC-3 – карциномы простаты, HCT-116 – карциномы толстой кишки, A498 – карциномы почки, SK-BR-3 – карциномы молочной железы человека.

В исследованной концентрации экстракта аврана через сутки детектировали в основном клетки, находившиеся в позднем апоптозе (от 27,8 % на линии карциномы толстой кишки HCT-116 до 96,8% на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7) (Рисунок 42, Таблица 16), что может свидетельствовать о большей чувствительности клеток этих линий к экстракту аврана. На линии рака легкого A549 отмечали 26,9% клеток, находившихся в стадии раннего апоптоза, что, по-видимому, объясняется меньшей чувствительностью данной культуры, поздний апоптоз развивался в 55,4% клеток. Данные результаты подтверждают факт различной степени

чувствительности опухолевых клеток к экстракту, но все исследуемые культуры оказались восприимчивы к воздействию экстракта аврана, которое заканчивалось активацией апоптоза.

Таблица 16 – Распределение опухолевых клеток при воздействии экстракта аврана в концентрации 0,9 мг/мл по данным проточной цитофлуориметрии

| Клеточные линии | Группа   | Квадрат Q3<br>Живые клетки<br>(AnV <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> ), % | Квадрат Q4<br>Ранние апоптотические клетки<br>(AnV <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> ), % | Квадрат Q2<br>Поздние апоптотические клетки<br>(AnV <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> ), % | Квадрат Q1<br>Некротические клетки<br>(AnV <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> ), % |
|-----------------|----------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| A549            | Контроль | 90,8±3,1                                                              | 2,9±1,5                                                                               | 4,1±1,2                                                                                | 2,3±0,2                                                                       |
|                 | Авран    | 15,2±5,3*                                                             | 26,9±3,4*                                                                             | 55,4±7,1*                                                                              | 2,5±0,5                                                                       |
| PC-3            | Контроль | 95,7±2,7                                                              | 1,6±1,1                                                                               | 2,4±0,8                                                                                | 0,2±0,1                                                                       |
|                 | Авран    | 1,2±0,4*                                                              | 0,9±0,4                                                                               | 68,6±3,7*                                                                              | 29,3±4,8*                                                                     |
| HCT-116         | Контроль | 79,4±2,4                                                              | 9,9±2,8                                                                               | 7,6±1,8                                                                                | 3,0±1,2                                                                       |
|                 | Авран    | 4,4±1,1*                                                              | 0,4±0,8*                                                                              | 27,8±4,5*                                                                              | 67,4±7,1*                                                                     |
| MCF-7           | Контроль | 81,5±4,9                                                              | 0,7±0,5                                                                               | 8,0±2,2                                                                                | 9,9±2,4                                                                       |
|                 | Авран    | 0,1±0,1*                                                              | 0,1±0,1                                                                               | 96,8±5,5*                                                                              | 3,1±1,2*                                                                      |
| SK-BR-3         | Контроль | 96,7±2,8                                                              | 0,9±0,4                                                                               | 2,3±1,2                                                                                | 0,2±0,1                                                                       |
|                 | Авран    | 1,3±0,2*                                                              | 1,5±0,5                                                                               | 96,3±2,7*                                                                              | 0,9±0,2                                                                       |
| Jurkat          | Контроль | 97,2±1,5                                                              | 1,4±0,7                                                                               | 0,4±0,2                                                                                | 1,0±0,4                                                                       |
|                 | Авран    | 1,0±0,2*                                                              | 0,9±0,3                                                                               | 79,7±3,8*                                                                              | 18,4±3,2*                                                                     |
| A498            | Контроль | 82,9±3,1                                                              | 3,8±3,1                                                                               | 12,2±3,1                                                                               | 1,1±0,2                                                                       |
|                 | Авран    | 2,1±0,6*                                                              | 6,4±1,8                                                                               | 89,5±3,3*                                                                              | 2,0±0,4                                                                       |

Примечание: \* достоверные отличия при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  между экспериментальной группой и контролем определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

## ГЛАВА 4. АУТОФАГИЯ И МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОД ВЛИЯНИЕМ ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩИХ ЭКСТРАКТОВ

### 4.1. Оценка аутофагии в опухолевых клетках

#### *Анализ количества опухолевых клеток HeLa с аутофагосомами под действием экстрактов*

Аутофагия в клеточной линии HeLa развивалась с разной частотой как в контроле (не более 1%), так и эксперименте, при воздействии различных экстрактов.

Опухолевые клетки линии HeLa неодинаково реагировали на разные экстракты. Так, количество клеток с аутофагосомами могло существенно увеличиваться при максимальной концентрации и с увеличением экспозиции (под действием экстрактов антоциановой кукурузы). При низких концентрациях наиболее активного экстракта – аврана – количество клеток с аутофагосомами было существенно больше (до 90% и выше), при высоких – сводилось к нулю, при этом практически все клетки были мертвыми.

В контроле, как правило, на одну клетку полигональной формы, прикрепленной к подложке, приходилась одна крупная или мелкая аутофагосома. Под действием экстракта в одной клетке могло образоваться несколько мелких аутофагосом.

Клетки с аутофагосомами могли быть как полигональной формы, прикрепленные к подложке (живые), так и округлой формы, уже открепившиеся от субстрата (мертвые или погибающие). В ряде случаев обнаружены одиночные аутофагосомы крупных размеров в округлых по форме клетках, которые могли окрашиваться в зеленый цвет акридиновым оранжевым (т.е. живых), и в красно-оранжевый цвет йодистым пропидием (т.е. считающихся уже мертвыми), то есть клетки с аутофагосомами могли быть как живыми, так и мертвыми.

В эксперименте с экстрактом аврана были обнаружены также клетки с аутофагосомой и ядром в виде серпа, что свидетельствовало о том, что

дальнейшей судьбой клетки с аутофагосомой могла стать апоптотическая гибель.

Мы сравнили зависимость между процентом опухолевых клеток рака шейки матки HeLa с аутофагосомами и процентом мертвых под действием четырех экстрактов: бессмертника, антоциановой кукурузы ВОУ, антоциановой кукурузы ВЗУ и аврана разных концентраций в течение суток.

Под действием экстрактов бессмертника и антоциановой кукурузы клеток с аутофагосомами было мало (1-3%). Зависимости между количеством клеток с аутофагосомами и концентрацией экстрактов не выявлено (Таблица 9). Так, под действием экстракта бессмертника при концентрациях от 0,009 мг/мл до 5 мг/мл процент клеток с аутофагосомами не отличался от контроля, при этом мертвых клеток не было (Рисунок 43). Клетки с аутофагосомами появлялись только при высокой концентрации (10 мг/мл). Зависимости между процентом опухолевых клеток и концентрацией экстракта, а также между процентом мертвых клеток и концентрацией экстракта бессмертника отсутствовали.

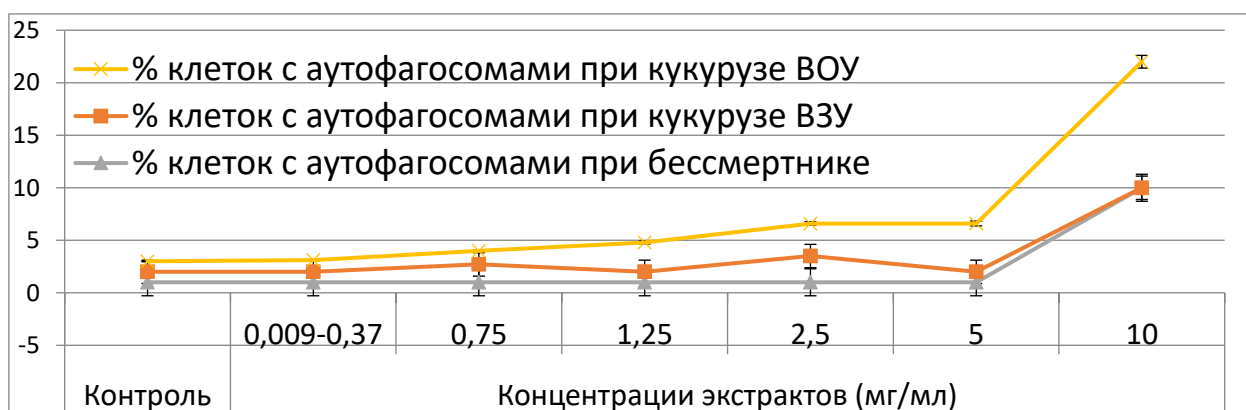


Рисунок 43. Доля клеток с аутофагосомами при действии экстрактов (%).

Под действием экстракта антоциановой кукурузы ВЗУ при концентрациях от 0,011 до 0,75 мг/мл процент клеток с аутофагосомами не отличался от контроля, при этом мертвых клеток не было (Рисунок 43). Клетки с аутофагосомами появлялись только при концентрации 1,25 мг/мл, и их количество увеличивалось до концентрации 10 мг/мл. Зависимость между процентом мертвых клеток и концентрацией экстракта кукурузы ВЗУ

отсутствовала. Аутофагия-индуцирующая активность этого экстракта зависела от концентрации экстракта, с увеличением концентрации повышался процент клеток с аутофагосомами.

Под действием экстракта антоциановой кукурузы ВОУ при минимальной концентрации 0,022 мг/мл процент клеток с аутофагосомами был максимален. Начиная с концентрации 1,25 мг/мл, количество клеток с аутофагосомами возрастало (Рисунок 43), при этом мертвых клеток не было. Зависимость между процентом мертвых клеток и концентрацией экстракта кукурузы ВОУ отсутствовала. Аутофагия-индуцирующая активность этого экстракта зависела от концентрации. Процент клеток с аутофагосомами возрастал, затем резко снижался, а затем плавно снова повышался.

При действии экстракта аврана наблюдалась совершенно иная тенденция: была выявлена достаточно четкая обратная корреляционная зависимость (умеренная связь) между процентом мертвых клеток и процентом клеток с аутофагосомами, а также между процентом клеток с аутофагосомами и концентрацией экстракта. Под действием экстракта аврана (Рисунок 43) при минимальных концентрациях (0,09-0,18 мг/мл) процент клеток с аутофагосомами был максимален (около 100), а с увеличением концентрации резко падал. При этом процент мертвых клеток при увеличении концентрации резко возрастал. В результате корреляционного анализа в культуре HeLa была выявлена обратная двусторонняя взаимосвязь средней силы ( $r=-0,56$ ) высокой статистической значимости ( $p=0,004$ ) между концентрацией и количеством клеток с аутофагосомами и обратная двусторонняя взаимосвязь средней силы ( $r=-0,41$ ) высокой статистической значимости ( $p=0,0036$ ) между количеством клеток с аутофагосомами и процентом погибших клеток, а также прямая двусторонняя взаимосвязь средней силы ( $r=0,57$ ) высокой статистической значимости ( $p=0,004$ ) между концентрацией и процентом погибших клеток. Так при концентрации 0,75 мг/мл аутофагосомы в клетках уже не образуются, и начинается стремительный рост числа мертвых опухолевых клеток, следовательно, данная концентрация является эффективной (Рисунок 44).

Полученные данные подтверждают роль аутофагии при выживании опухолевой клетки в условиях токсического стресса, в т.ч. и противоопухолевой терапии и, кроме того, позволяют использовать такой показатель, как «% клеток с аутофагосомами от числа живых клеток» в качестве дополнительного показателя для оценки цитотоксичности лекарственного средства.

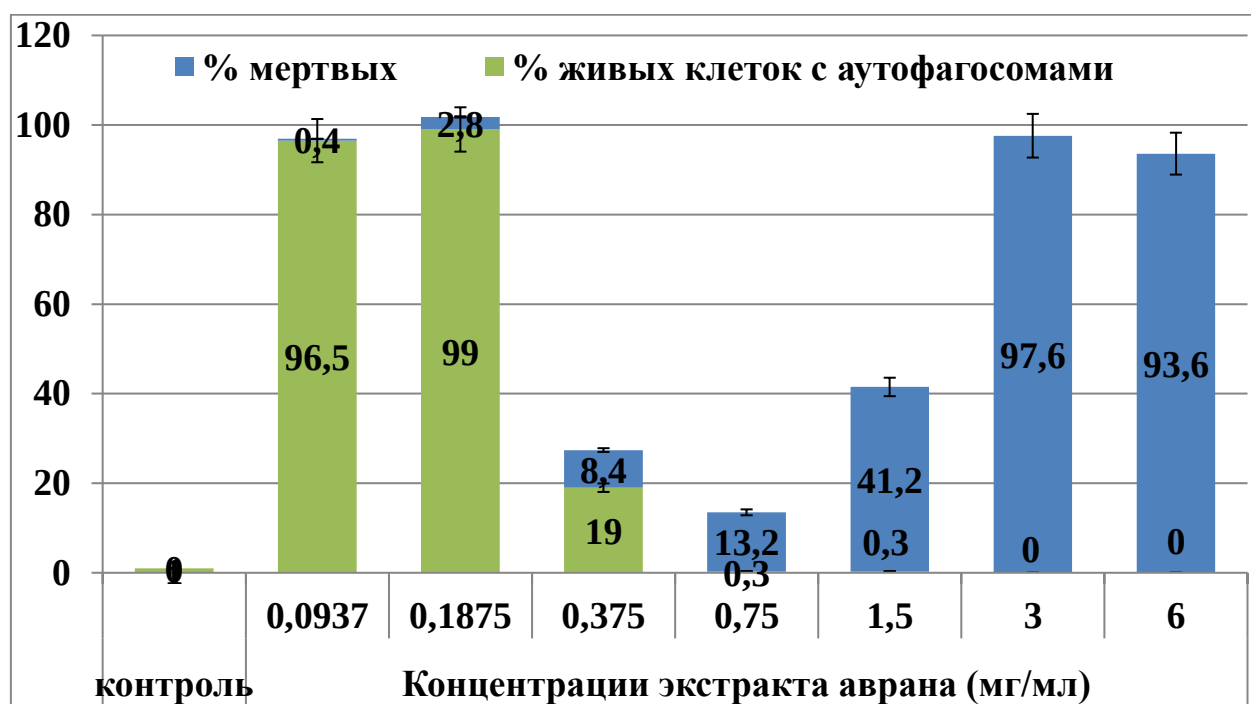


Рисунок 44. Зависимость количества клеток с аутофагосомами (%) и мертвых клеток (%) от концентраций экстракта аврана.

Таким образом, индукция аутофагии уже при низких концентрациях экстракта свидетельствует о наличии ответной реакции опухолевых клеток линии HeLa на воздействие экстрактов антоциановой кукурузы ВОУ и экстракта аврана. Но при действии экстракта аврана наблюдается также и выраженная обратная корреляция между процентом клеток с аутофагосомами и процентом мертвых клеток. Под действием экстрактов бессмертника, антоциановой кукурузы ВЗУ и ВОУ обратной корреляции между процентом мертвых клеток и процентом клеток с аутофагосомами не выявлено.

Таким образом, по нашему мнению, появление в клетках аутофагосом может являться морфологическим маркером развития резистентности опухолевых клеток к действию химиопрепаратов. Увеличение концентрации

действующего вещества блокирует образование аутофагосом и приводит к гибели клеток и, следовательно, является одним из путей преодоления резистентности опухолей к терапии.

***Уровень экспрессии генов, ассоциированных с путями гибели в клетках карциномы почки человека (линия A498) по результатам in silico.***

Результаты, полученные с применением обеих баз данных SRX1896988 и SRX1084573, оказались схожими (Рисунки 45,46). В неподверженной внешним воздействиям клеточной культуре карциномы почки человека сравнительно больших показателей достигает экспрессия четырех генов, ассоциированных с аутофагией: APP (NM\_000484.3), CTSB (NM\_001317237.1), IGF1 (NM\_000618.4), SQSTM1 (NM\_001142298.1).

Сверхэкспрессия белка APP обнаруживается, по данным некоторых авторов, при аденокарциноме пищевода и других опухолях (Abdulla M.H., 2017). Ген IGF1 кодирует инсулиноподобный фактор роста 1, участвующий в процессах старения организма (Partridge L., Alic N., Bjedov I., Piper M.D., 2011). Ген SQSTM1 кодирует убиквитин-связывающий белок p62, который связывается с другими белками для селективной аутофагии (<http://marrvel.org/search/gene/SQSTM1>).

Полученные нами данные о гиперэкспрессии генов, ассоциированных с аутофагией даже в неподверженной внешним воздействиям клеточной культуре карциномы почки A498, вполне объясняют ее устойчивость к химиотерапии за счет высокой способности к цитопротекторной аутофагии. Таким образом, не только экспрессия гена MUC13 отвечает за высокую резистентность рака почки (Zhang L., Bhasin M., 2011; Sheng Y., Ng C.P, 2017), но и экспрессия генов аутофагии.

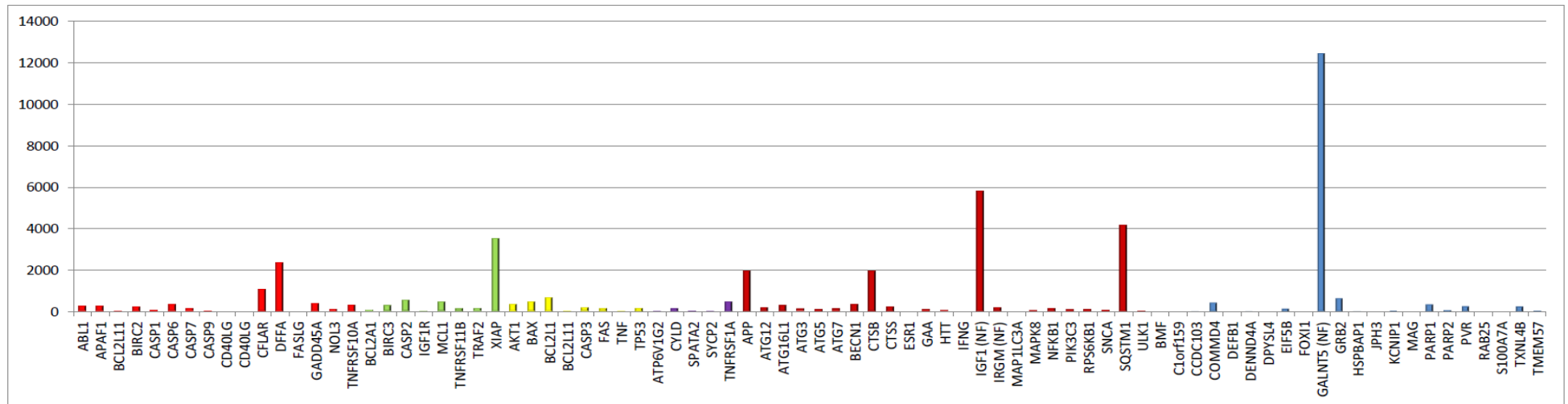


Рисунок 45. Транскрипция 82 генов в линии A498 на основе базы данных SRX1896988.

Про-апоптотические гены – красный; анти-апоптотические гены – зеленый; апоптоз и аутофагия – желтый; апоптоз и некроз – фиолетовый; аутофагия – коричневый; некроз – синий.

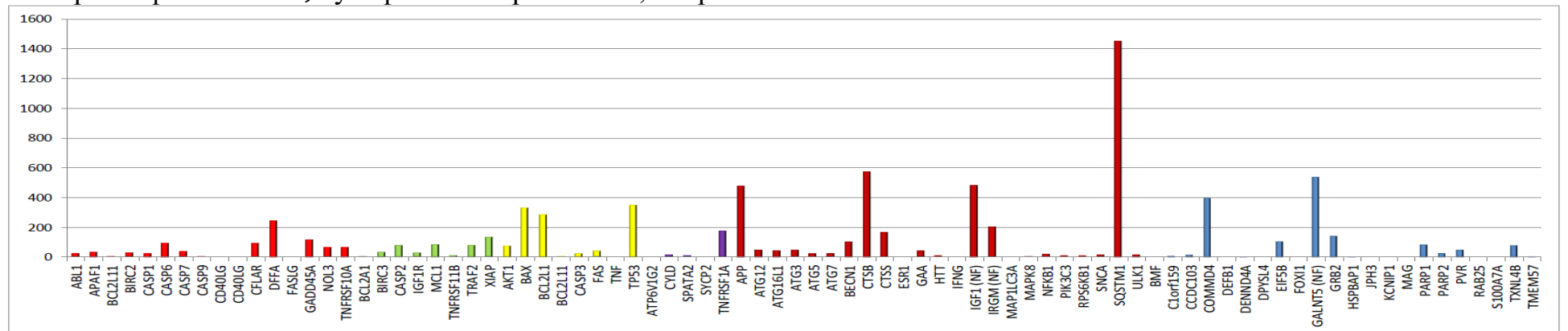


Рисунок 46. Транскрипция 82 генов в линии A498 на основе базы данных SRX1084573.

Про-апоптотические гены – красный; анти-апоптотические гены – зеленый; апоптоз и аутофагия – желтый; апоптоз и некроз – фиолетовый; аутофагия – коричневый; некроз – синий.

Можно предположить, что именно аутофагия объясняет ранее непонятное исчезновение резистентности рака почки A498 при применении комбинированной терапии в отличие от стандартной. Полученные нами результаты о роли аутофагии в развитии резистентности согласуются с имеющимися данными в литературе (Williams R.T., Yu A.L., 2013).

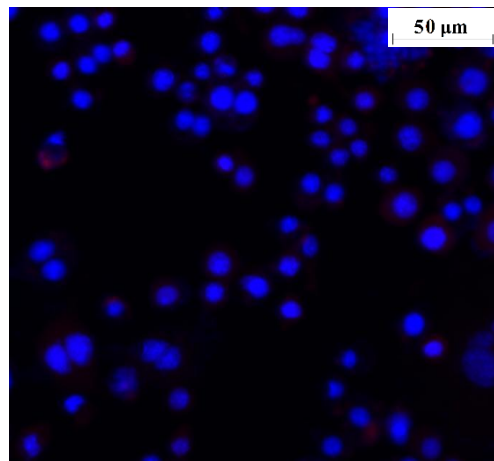
***Выявление белка LC3B как маркера аутофагии в клетках карциномы почки человека A498 после влияния экстрактом аврана.*** Для исследования индукции аутофагии на клеточном анализаторе Muse (Millipore) была выбрана культура клеток карциномы почки A498.

Клеточную линию карциномы почки в течение суток обрабатывали экстрактом аврана в разных концентрациях при двукратном разведении, начиная от 3,6 мг/мл: 3,6; 1,8; 0,9; 0,45; 0,225; 0,113; 0,056; 0,028; 0,014; 0,007; 0,004 мг/мл. Клетки окрашивались на белок LC3B, ядра клеток окрашивались красителем Хёкст.

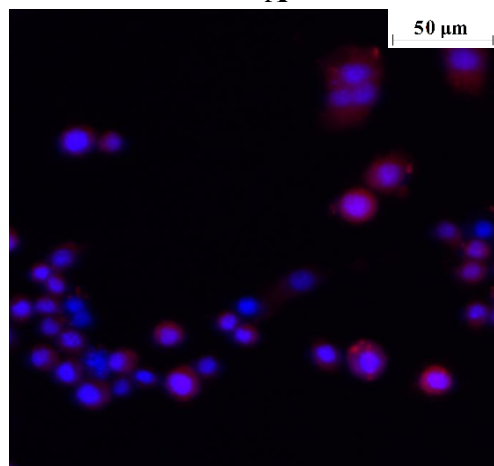
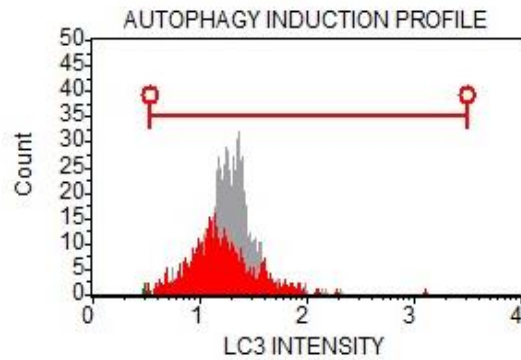
В результате окраски реагентами Muse Autophagy LC3-Antibody BasedKit (Millipore Sigma) клетки приобретали тусклое красное свечение, при образовании аутофагосом, и ярко-алое свечение, когда аутофагосомы связывались с лизосомами и начинался процесс переваривания (Рисунок 47 А-В).

В контроле коэффициент индукции аутофагии был равен 1. Начиная с концентрации экстракта 0,004 мг/мл, коэффициент индукции аутофагии увеличивался, достигая максимума при концентрации 0,056 мг/мл, и затем с увеличением концентрации экстракта аврана коэффициент индукции аутофагии снова уменьшался (Таблица 17). При остальных концентрациях экстракта аврана аутофагия в клетках отсутствовала.

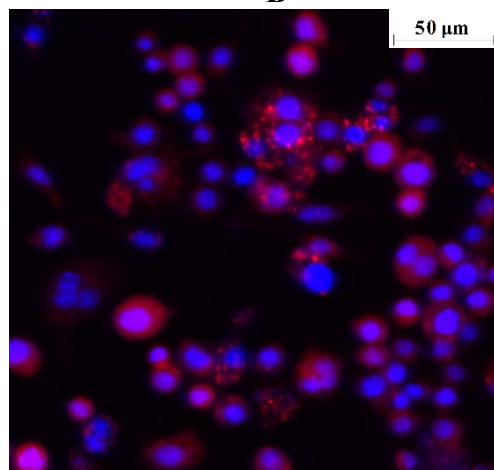
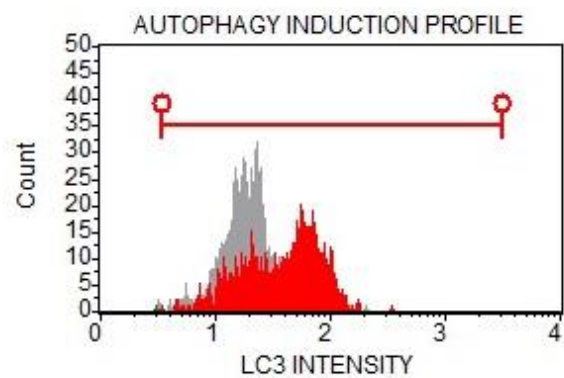
Уменьшение общего количества живых клеток начиная с концентрации 0,225 мг/мл и выше (Таблица 4) вполне согласуется с описанной ранее цитостатической активностью экстракта аврана.



А



Б



В

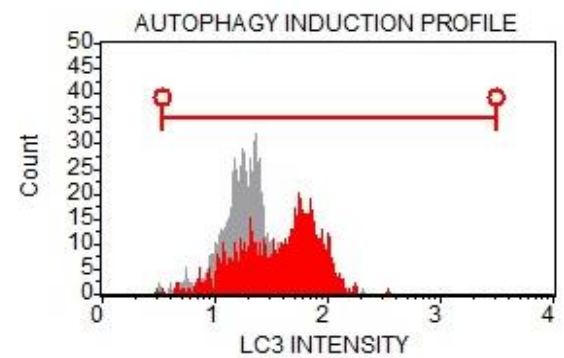


Рисунок 47. Индукция аутофагии в клетках карциномы почки человека A498. Ув. 200: А – в контроле, Б – при концентрации экстракта аврана 0,028 мг/мл, В – при концентрации экстракта аврана 0,056 мг/мл.

*Примечание: Слева клетки при двойном окрашивании на белок LC3B (красный и алый цвет) и красителем Хёкст (синий цвет); справа результаты проточной цитофлуориметрии по воздействию экстракта аврана на индукцию аутофагосом.*

Таблица 17 – Данные проточной цитофлуориметрии по опухолевым клеткам карциномы почки (A498) с аутофагосомами при воздействии экстракта аврана в течение 24 ч

| Концентрация экстракта (мг/мл) | Средняя интенсивность аутофагии | Коэффициент индукции аутофагии | Общее кол-во клеток |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| 3,6                            | 24,3±2,3                        | 1,1                            | 447±20              |
| 1,8                            | 27,4±3,2*                       | 1,2                            | 479±24              |
| 0,9                            | 25,8±2,1                        | 1,2                            | 431±19              |
| 0,45                           | 28,5±3,4*                       | 1,3                            | 585±28              |
| 0,225                          | 25±1,7                          | 1,1                            | 605±31              |
| 0,113                          | 29,5±2,4                        | 1,3                            | 707±38              |
| 0,056                          | 50,3±4,8*                       | 2,3                            | 694±28              |
| 0,028                          | 31,1±2,5*                       | 1,4                            | 699±25              |
| 0,014                          | 25,5±1,9                        | 1,2                            | 683±27              |
| 0,007                          | 27,8±2,1*                       | 1,3                            | 657±23              |
| 0,004                          | 25,8±1,8                        | 1,2                            | 649±25              |
| Контроль                       | 22,2±1,5                        | 1                              | 739±41              |

Примечание: \* при  $p < 0,05$  и  $T > 1,56$  достоверность отличий при сравнении значений опытных и контрольной групп определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

\*\*\*

Как известно, в неопухолевых клетках макроаутофагия инициируется токсическим стрессом (в условиях обеднения среды питательными веществами и т.п.) и направлена на избавление клеток от ненужных органелл, а также и организма от ненужных клеток (Farrugia G., Balzan R., 2012). В то время как в опухолевых клетках на определенном этапе аутофагия может стать цитопротекторной и способствовать формированию их резистентности к химиотерапии. Такая резистентность обусловлена недостаточным повреждением клетки, в результате чего происходит деградация только отдельных поврежденных органелл и других компонентов клетки в результате терапии, но сама клетка при этом выживает. Формирование такой резистентности может привести к быстрой прогрессии заболевания. Следовательно, при лечении онкологических заболеваний важна разработка лекарственных средств, ингибирующих цитопротекторную аутофагию.

Индукция аутофагии в опухолевых клетках под действием низких концентраций экстракта аврана вполне объясняет механизм его

цитопротекторной активности, выявленной нами в эксперименте на клетках карциномы молочной железы SK-BR-3. Концентрация экстракта 0,035 мг/мл, под действием которой наблюдалось увеличение числа живых клеток SK-BR-3, входит в диапазон концентраций экстракта от 0,028 до 0,45 мг/мл, при которых детектирована аутофагия в клетках A498.

Нами впервые предложен способ определения минимальной эффективной концентрации противоопухолевого лекарственного средства, ингибирующего цитопротекторную аутофагию *in vitro*. Суть способа заключается в следующем: на опухолевые клетки человека в культуре воздействуют лекарственным средством в разных концентрациях в течение 24 часов; проводят окрашивание клеток флуоресцентными красителями в тесте «живые и мертвые». Минимально эффективной концентрацией будет являться та, при которой аутофагосомы не образуются.

Разработанный способ выявления минимально эффективных концентраций противоопухолевых лекарственных средств, ингибирующих цитопротекторную аутофагию в опухолевых клетках, позволит повысить эффективность скрининга новых средств для лечения злокачественных новообразований.

Максимальная аутофагия-индуцирующая активность экстракта аврана, как было представлено выше, наблюдалась при концентрациях 0,09 мг/мл и 0,18 мг/мл. Выявлена обратная корреляционная связь ( $r=-0,56$ ) – при резком падении количества клеток с аутофагосомами резко увеличивается количество мертвых клеток (Таблица 8), что подтверждает роль цитопротекторной аутофагии при выживании опухолевых клеток в условиях противоопухолевой терапии.

Начиная с концентрации экстракта 0,375 мг/мл, число клеток HeLa с аутофагосомами резко сократилось и не отличалось от контроля.

На рисунке 44 представлена зависимость между процентом клеток с аутофагосомами и концентраций экстракта. Для выявления взаимосвязи был проведен корреляционный анализ методом Спирмана. В результате анализа

выявлена обратная двусторонняя взаимосвязь средней силы ( $r=-0,56$ ) высокой статистической значимости ( $p=0,004$ ). При концентрации 0,75 мг/мл экстракт аврана ингибирует процесс образования аутофагосом и начинается резкая гибель опухолевых клеток, следовательно, эта концентрация является минимально эффективной в преодолении формирования резистентности опухолевых клеток. Концентрация экстракта аврана, при которой погибает наибольшее количество опухолевых клеток, составила 3 мг/мл.

Таким образом, установлено, что при использовании экстракта аврана механизм преодоления резистентности в опухолевых клетках заключается в блокировании протекторной аутофагии при определенных концентрациях.

#### **4.2. Морфологические изменения в опухолевых клетках при воздействии микрокапсулированного экстракта аврана в эксперименте *in vitro***

Задача разработки мультимодальных средств доставки лекарственных веществ и их форм заключается в получении биосовместимых и биodeградируемых микро- и нанокапсулированных препаратов, способных адресно транспортировать их к патологическому очагу и контролируемо высвобождать лекарство при определенных условиях.

Нами изучена морфология клеточных культур опухолей человека – линий рака молочной железы человека SK-BR-3 и рака шейки матки HeLa при воздействии капсулированного флавоноидсодержащего экстракта аврана. Включение экстрактов в полиэлектролитные оболочки осуществляли с помощью метода последовательной адсорбции полиэлектролитов на поверхность впоследствии экстрагируемого твердого сферического ядра, впервые описанного в работе G.B. Sukhorukova (1998). Методом осаждения в поры сферических кальций-карбонатных микрочастиц со средним размером 5 мкм был помещен экстракт аврана, после чего из полиэлектролитов и бычьего сывороточного альбумина, меченного флуоресцентным красителем TRITC, была сформирована структурная оболочка PSS/PAH/BSA-TRITC/PAH/PSS/PAH/DS. Концентрация экстракта аврана с капсулами - 0,18 мг/мл (рассчитывалась на объем суспензии микрокапсул).

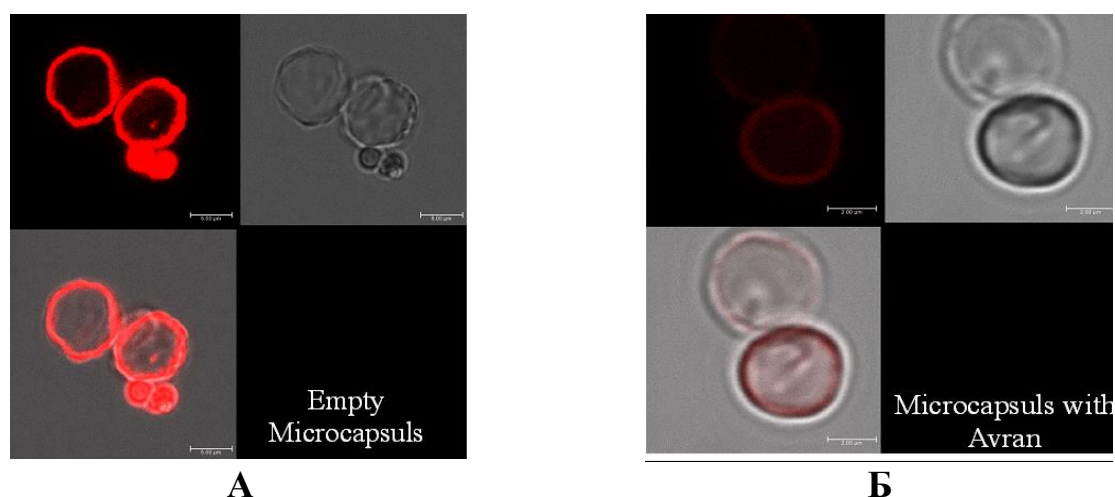


Рисунок 48. Изображения микрокапсул со структурной оболочкой PSS/PAH/BSA-TRITC/PAH/PSS/PAH/DS. Каждое изображение представляет собой конфокальное и оптическое изображения микрокапсул, а также их наложение, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, ув. 1000: не содержащих экстракт аврана, контрольная группа микрокапсул (А), содержащих экстракт аврана, экспериментальная группа микрокапсул (Б).

Все клетки культуры SK-BR-3 при воздействии капсулированного экстракта аврана уже через сутки были мертвыми и разрушенными, на рисунке 49 виден клеточный дебрис с неразрушенными капсулами округлой формы. Такого выраженного эффекта не наблюдалось даже при большей концентрации (0,9 мг/мл) экстракта аврана без капсул (Рисунок 49, Таблица 9, Таблица 18).

В эксперименте с опухолевыми клетками HeLa и капсулированным экстрактом аврана через сутки аутофагосом в опухолевых клетках отсутствовали, в отличие от группы под действием экстракта аврана без капсул и чистого экстракта в сопоставимой концентрации (Рисунок 50), а также увеличивалось количества мертвых клеток на 34% и клеток в состоянии апоптоза на 9% по сравнению с контролем. Данный эффект связан, по-видимому, с деградацией капсул внутри клетки, что обеспечивает высокую концентрацию экстракта и препятствует образованию аутофагосом.

Таким образом, в опухолевых клетках под действием капсулированного экстракта аврана не развивается цитопротекторная аутофагия и происходит выраженная гибель клеток.

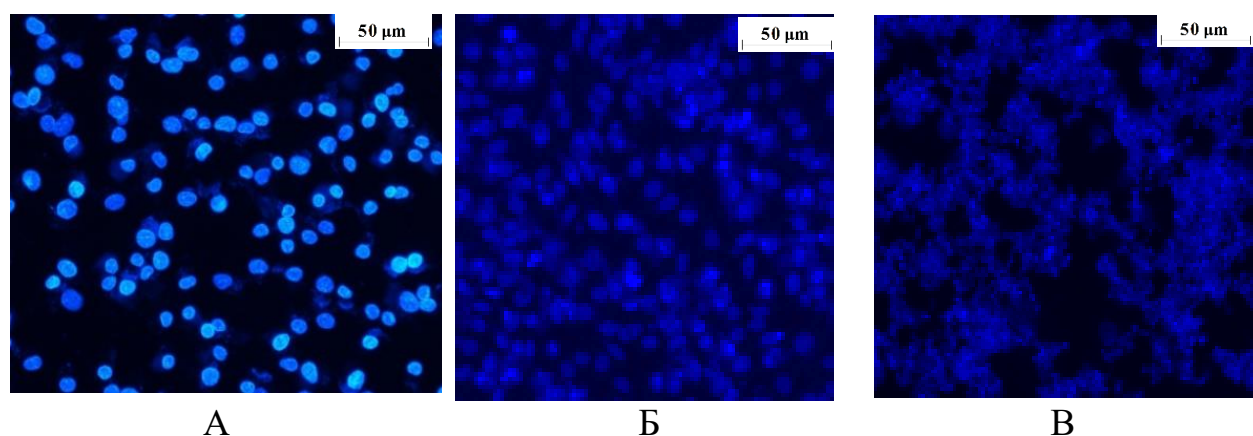


Рисунок 49. Клетки линии рака молочной железы человека SK-BR-3 через сутки. Ув. 200: под действием экстракта аврана в концентрации 0,9 мг/мл (А), в эксперименте с добавлением контрольных пустых капсул через сутки (Б), в эксперименте с капсулами с экстрактом аврана в концентрации 0,18 мг/мл через сутки (В).

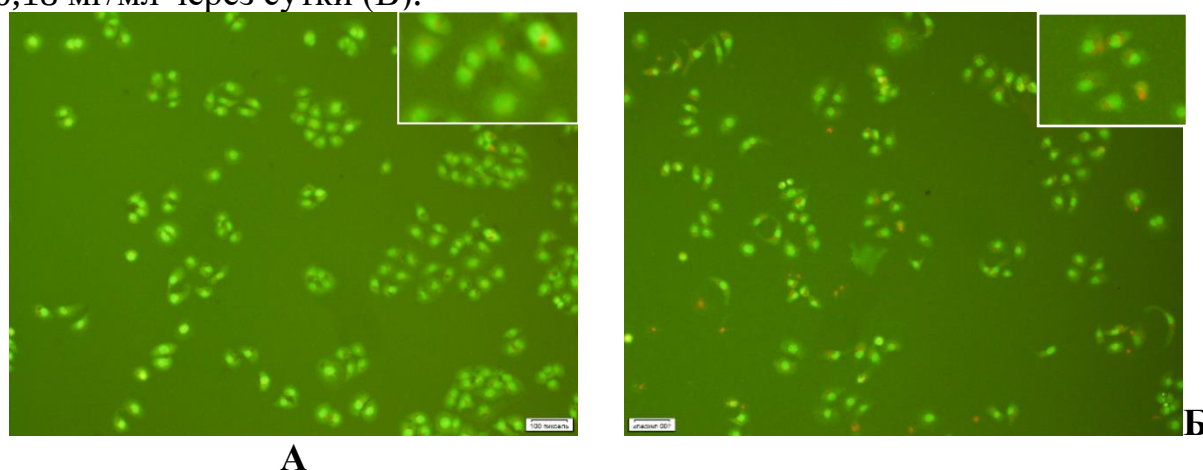


Рисунок 50. Клетки линии рака шейки матки HeLa в эксперименте через сутки. Ув. 200: с добавлением пустых капсул (А) и с капсулами с экстрактом аврана в концентрации 0,18 мг/мл (Б). Флуоресцентная микроскопия при окраске акридиновым оранжевым и йодистым пропидием.

Таблица 18 – Морфологические показатели жизнеспособности и гибели опухолевых клеток

| Культура<br>Группы         | SK-BR-3     |                        | HeLa           |                         |                         |                                            |
|----------------------------|-------------|------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|
|                            | СКЖК        | доля апоптоза (в п/зр) | СКК            | Доля мертвых клеток (%) | Доля пикноза в п/зр (%) | Доля клеток с аутофагосомам и от живых (%) |
| Контроль                   | 365±24,59   | 0,56±0,3               | 324 ±32,3      | 0±0                     | 0±0                     | 1±1                                        |
| Авран 0,18 мг/мл           | 354,6±4,2   | <b>2,3±0,04*</b>       | <b>168±15*</b> | <b>2,8±0,5*</b>         | <b>61±8*</b>            | <b>71±11*</b>                              |
| Пустые капсулы             | 342±11      | 1±0,5                  | 330 ±40,8      | 0±0                     | 0±0                     | <b>54±10*</b>                              |
| Капсулы + авран 0,18 мг/мл | <b>0±0*</b> | <b>0±0*</b>            | <b>180±19*</b> | <b>34±0,5*</b>          | <b>9±3*</b>             | 0±0                                        |

Примечание: \* при  $p < 0,05$  и  $T > 1,56$  достоверность отличий при сравнении значений опытных и контрольной групп определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

### **4.3. Исследование каспазо-зависимого пути апоптоза и его индукция в клетках разных опухолей человека и животных**

#### ***Сравнение индукции апоптоза в опухолевых клетках разных линий под действием разных экстрактов***

Наибольшей апоптотической активностью в отношении клеточной культуры HeLa обладал экстракт аврана даже при минимальных из исследованных концентраций (Таблица 8). Увеличение времени экспозиции экстрактов не приводило к существенным различиям в их активности по отношению к опухолевым клеткам.

Ниже представлены сводные результаты проточной цитофлуориметрии после воздействия экстрактов аврана, бессмертника и антоциановой кукурузы в концентрации 0,9 мг/мл на опухолевые клетки разных линий (Рисунок 50). Полученные данные свидетельствуют о наличии апоптотической активности экстрактов, содержащих флавоноиды.

Как видно из рисунка 48, за сутки под воздействием экстрактов у большинства опухолевых клеточных линий обнаружен большой процент клеток в позднем апоптозе, что свидетельствует о чувствительности опухолевых клеток к исследуемым экстрактам.

Причем клеточные линии неодинаково реагировали на разные экстракты, за счет их индивидуальной чувствительности. Так, клеточная линия MCF-7 – аденокарцинома молочной железы – оказалась весьма чувствительной ко всем экстрактам, на втором месте по чувствительности – РС-3 – карцинома простаты и НСТ-116 – карцинома толстой кишки, затем уже А549 – карцинома легкого. Клеточные культуры SK-BR-3 – карциномы молочной железы и Jurkat – Т-клеточного лимфобластного лейкоза оказались чувствительны только в основном к экстракту аврана, остальные экстракты не давали высокие цифры апоптоза.

Таким образом, только под действием экстракта аврана индукция апоптоза наблюдалась во всех исследованных клеточных линиях (Jurkat – Т-клеточного лимфобластный лейкоз, MCF-7 – аденокарцинома молочной

железы, A549 – карцинома легкого, PC-3 – карцинома простаты, HCT-116 – карцинома толстой кишки, A498 – карцинома почки, SK-BR-3 – карцинома молочной железы).

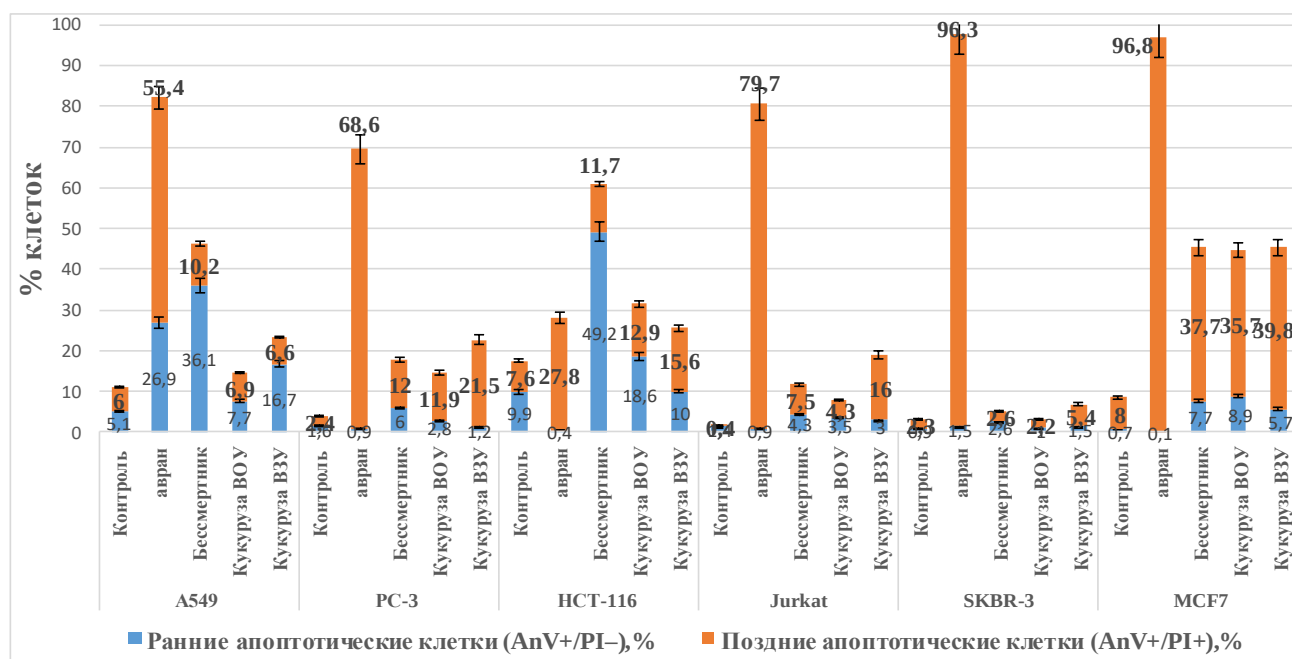


Рисунок 50. Результаты проточной цитофлуориметрии после воздействия экстрактов аврана лекарственного, бессмертника песчаного и антоциановой кукурузы в концентрации 0,9 мг/мл на опухолевые клетки человека: Jurkat – Т-клеточного лимфобластного лейкоза, MCF-7 – аденокарциномы молочной железы, A549 – карциномы легкого, PC-3 – карциномы простаты, HCT-116 – карциномы толстой кишки, A498 – карциномы почки, SK-BR-3 – карциномы молочной железы.

### ***Исследование каспазо-зависимого пути апоптоза в опухолевых клетках Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat***

***Под действием экстракта бессмертника.*** На клеточной линии Jurkat был исследован каспазо-зависимый апоптоз (каспаза-3) экстракта бессмертника.

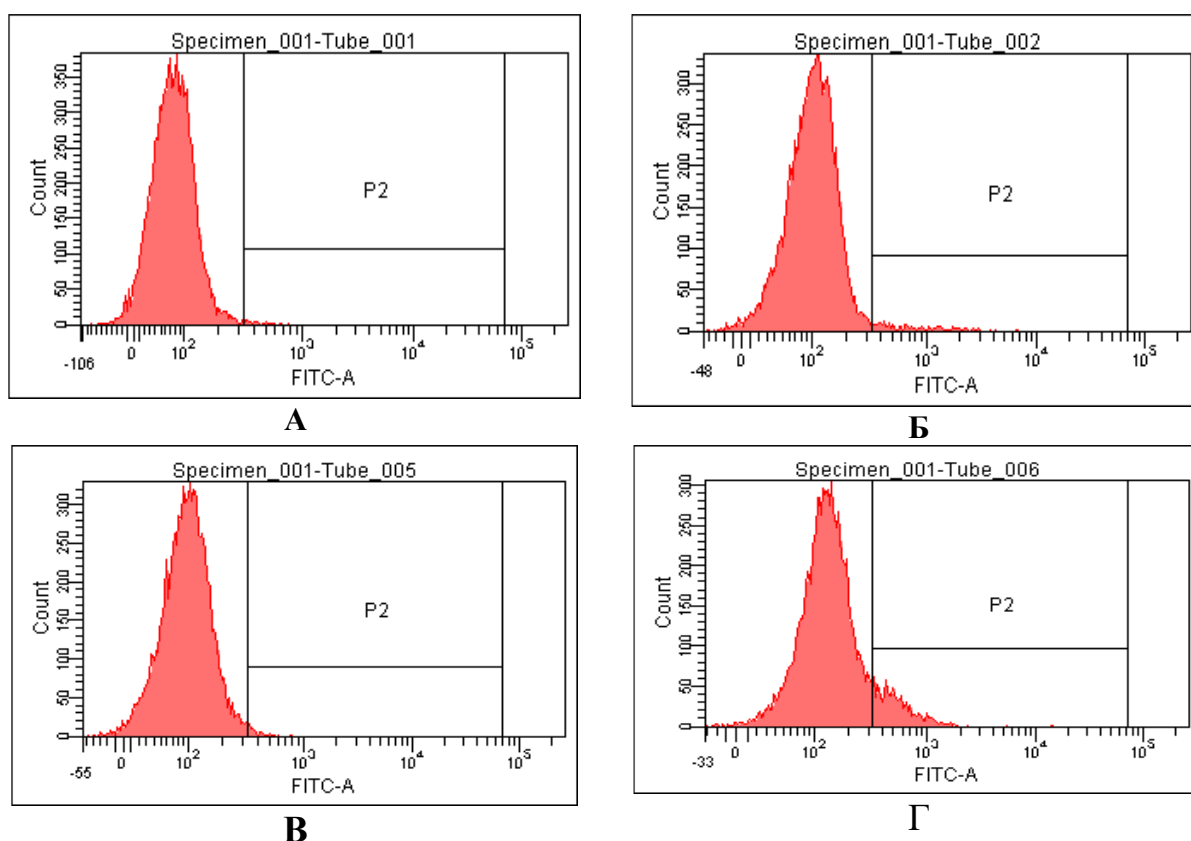


Рисунок 51. А – контроль – клеточная культура без воздействия - 0,5%; Б – контроль + anti-caspase-3-FITC (BD) - 2,3%; В – контроль – клетки с экстрактом бессмертника (проверка флуоресценции экстракта) - 0,7%; Г – клетки + экстракт бессмертника + anti-caspase-3-FITC (BD) - 10,1%.

В эксперименте с anti-caspase-3-FITC (BD) получен достаточно выраженный сигнал – 10,1% положительных клеток (Рисунок 51). Установлено, что под действием экстракта бессмертника в опухолевой линии Jurkat апоптоз каспазо-зависимый и его индукция осуществляется через каспазу-3 (Рисунок 51).

**Под действием экстракта аврана.** На клеточной линии Jurkat был исследован каспазо-зависимый апоптоз (каспаза-3) после воздействия экстракта аврана.

Под действием экстракта аврана через сутки воздействия в опухолевой линии Jurkat в эксперименте с anti-caspase-3-FITC (BD) получено 7,2% положительных клеток (Рисунок 52).

Слабый сигнал, по-видимому, связан с чувствительностью клеточной линии к действию данного экстракта, на что указывает быстрый переход

клеток Jurkat с апоптозом в зону позднего апоптоза и некроза, следовательно, каспазо-зависимый ранний апоптоз слабо детектируется через сутки.

Однако, несмотря на слабый сигнал, можно судить о том, что под действием экстракта аврана в опухолевой линии Jurkat индуцируется каспазо-зависимый апоптоз.

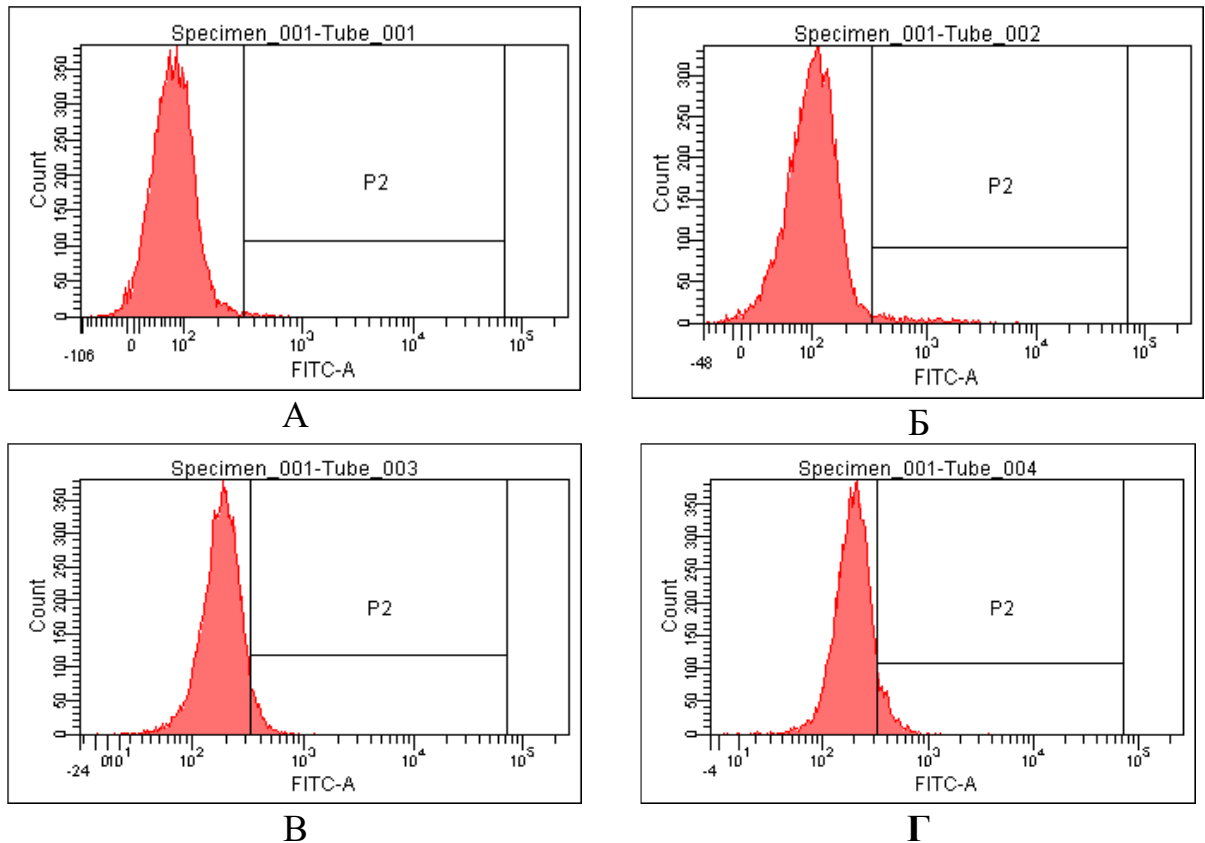


Рисунок 52. А – контроль – клетки без воздействия - 0,5%; Б – контроль + anti-caspase-3-FITC (BD) - 2,3%; В – контроль – клетки с экстрактом аврана (проверка флуоресценции экстракта) - 4,6%; Г – клетки + экстракт аврана + anti-caspase-3-FITC (BD) - 7,2%.

## **ГЛАВА 5. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВО ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ, ОПУХОЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ПЕРЕВИТЫМ РАКОМ ПОЧКИ РА ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ И ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ ЭКСТРАКТА АВРАНА**

### **5.1. Изменение динамики роста рака почки РА и дельты массы животных**

Во всех опытных группах через 72 ч после трансплантации опухоли крысам вводили раствор ежедневно в течение двух недель. При внутримышечном введении экстракта аврана лекарственного в дозе 110 мг/кг/сутки в течение 10 дней, начиная с 5 дня после начала введения отмечали значимое замедление ( $Z>2$ ) темпов роста перевиваемого рака почки РА в экспериментальных группах во все дни измерений. Следует отметить, что в этой группе только на 10-й день после перевивки наблюдали начало роста опухоли, в отличие от группы сравнения, где он начался с 4 дня. С 9-го по 11-й день наблюдали самый медленный темп прибавки объема опухоли на фоне внутримышечного введения экстракта аврана среди всех групп (Рисунок 53).

На момент окончания эксперимента объем опухоли в группе с внутримышечным введением экстракта составил  $6,7 \pm 0,53$  см<sup>3</sup> и был на 40% меньше ( $Z>2$ ), чем в группе сравнения ( $11 \pm 0,92$  см<sup>3</sup>).

При пероральном введении экстракта аврана наблюдали замедление темпов роста опухоли ( $Z>2$ ) начиная с 5-го дня и до конца эксперимента. Только на 11-й день различия в показателях роста опухоли с группой сравнения стали статистически недостоверны.

На момент окончания эксперимента объем опухоли в группе с пероральным введением экстракта аврана составил  $8,55 \pm 0,26$  см<sup>3</sup> и был достоверно на 23% меньше ( $Z>2$ ), чем в группе сравнения ( $11 \pm 0,92$  см<sup>3</sup>).

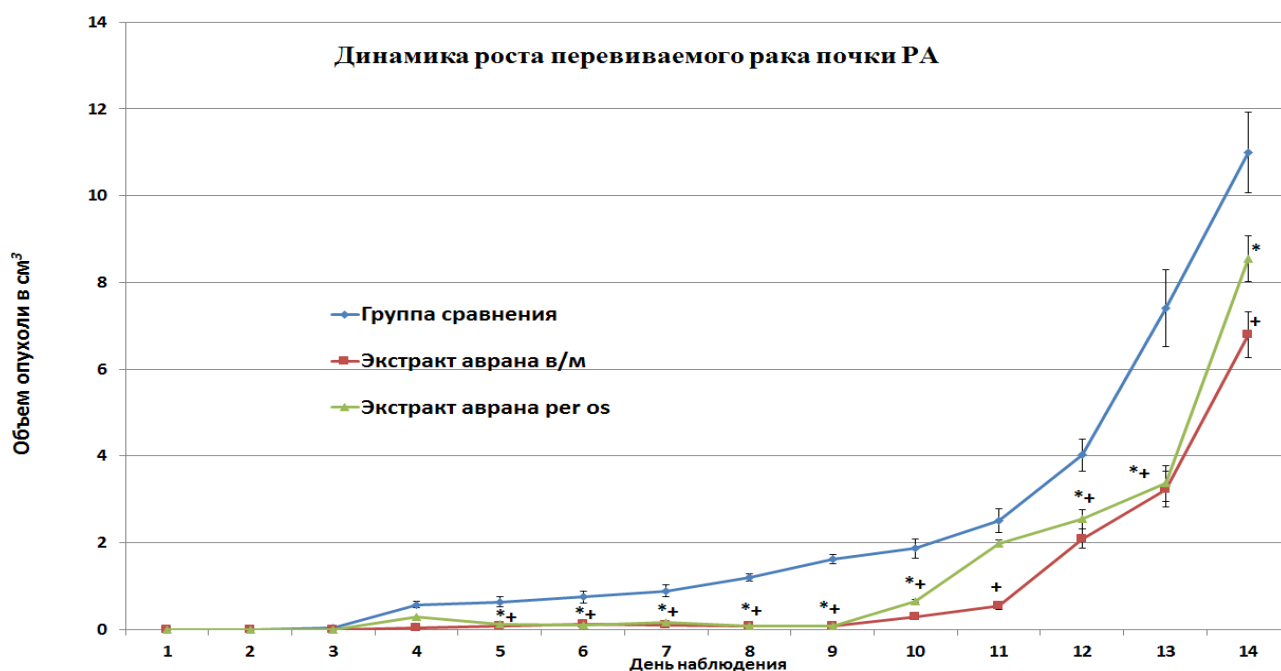


Рисунок 53. Динамика роста объема рака почки РА, привитого крысам в группе сравнения и группах с пероральным и внутримышечным введением водного раствора экстракта аврана лекарственного.

Примечание: \* - значимые различия при анализе значений медиан группы с пероральным введением с группой сравнения и + значимые различия группы с внутримышечным введением и группы сравнения при  $p < 0,05$  определяли с использованием критерия Манна-Уитни.

Индекс торможения по массе опухоли составил 71% при пероральном и 73% – при внутримышечных путях введения экстракта (Таблица 19).

Таблица 19 – Средняя масса опухоли крыс на конец эксперимента по воздействию экстракта аврана

| Группа                                   | Показатель | Масса опухоли<br>$M \pm \delta$ (г) | ИТРО ( %) |
|------------------------------------------|------------|-------------------------------------|-----------|
| Группа сравнения                         |            | 11,52±2,34                          | -         |
| Внутримышечное введение экстракта аврана |            | 3,1±1,16*                           | 73        |
| Пероральное введение экстракта аврана    |            | 3,29±1,23*                          | 71        |

Примечание: \* - при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  достоверность различий более 95% при анализе значений экспериментальной группы и группы сравнения определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

При статистической обработке данных по массе животных не было выявлено статистических отличий, хотя наблюдалась общая тенденция к увеличению массы животных за период эксперимента (Рисунок 54).

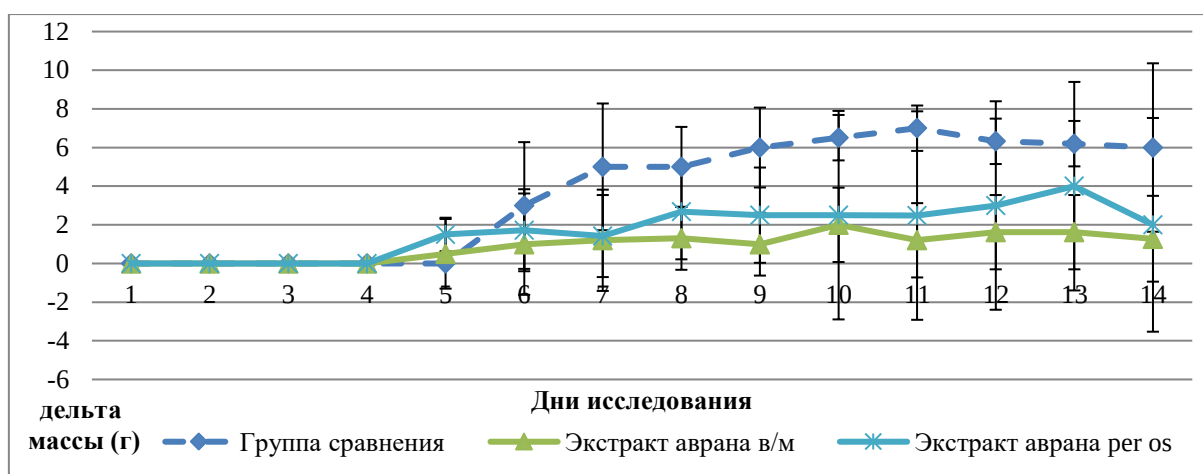


Рисунок 54. Динамика дельты массы крыс с раком почки РА привитым крысам, в группе сравнения и группах с пероральным и внутримышечным введением водного раствора экстракта аврана.

*Примечание: различия не выявлены определяли с помощью критерия Манна-Уитни при анализе значений медиан экспериментальных групп и группы сравнения при  $p < 0,05$  и  $z > 2$*

## 5.2. Патоморфоз перевитого рака почки РА

В группе сравнения рак почки был представлен комплексами полиморфных клеток, располагающихся в виде отдельных островков, разделенных прослойками рыхлой отечной соединительной ткани. Опухолевые клетки отличались выраженным полиморфизмом, проявляющимся различными размерами клеток и их формой: полигональной, овальной, округлой и веретеновидной.

Ядра клеток опухоли, их форма и размеры варьировали также, как и размеры и форма самих клеток рака почки. Стоит отметить, что большинство ядер были крупными и занимали значительную часть клетки. Хроматин располагался в виде нежной сетки. Определялось до нескольких фигур митозов в поле зрения. Обращала на себя внимание резко выраженная базофилия цитоплазмы опухолевых клеток (Рисунок 55).

В строме опухоли, ее капсуле и вокруг нее располагалось много новообразованных кровеносных сосудов капиллярного типа. Капсула, окружающая опухоль, была представлена широкой зоной молодой соединительной ткани, в которой располагалось много лимфоидных клеток.

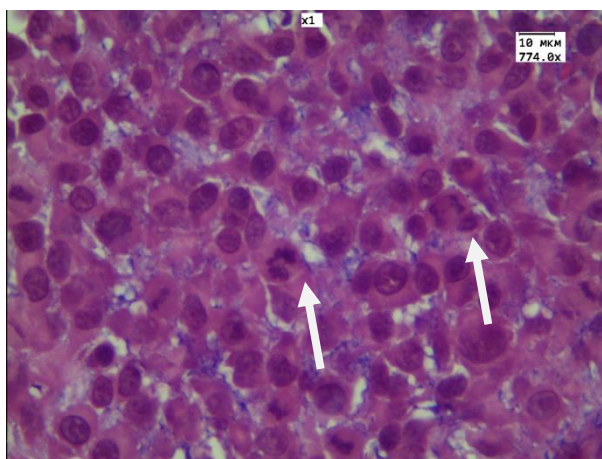


Рисунок 55. Гистологическое строение рака почки в группе сравнения. Стрелками указаны фигуры митозов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774.

При внутримышечном введении экстракта аврана при гистологическом исследовании в ткани опухоли выявлялись обширные зоны некроза и формировались полости.

Изменялись опухолевые клетки: в них развивались дистрофические изменения, они уменьшались в размерах и приобретали более округлую форму. Клетки теряли контакты между собой и лежали отдельно. Появлялись признаки апоптоза в виде апоптозных телец (Рисунок 56).

В единичных полях зрения обнаруживались гигантские клетки, что свидетельствовало о выраженном патоморфозе (Рисунок 59).

При проведении морфометрии наблюдали статистически значимое снижение среднего числа клеток опухоли в поле зрения в 2 раза при внутримышечном введении и 1,6 раза при пероральном введении, а также увеличение количества клеток в состоянии некроза и некробиоза при обоих путях введения экстракта (Таблица 20).

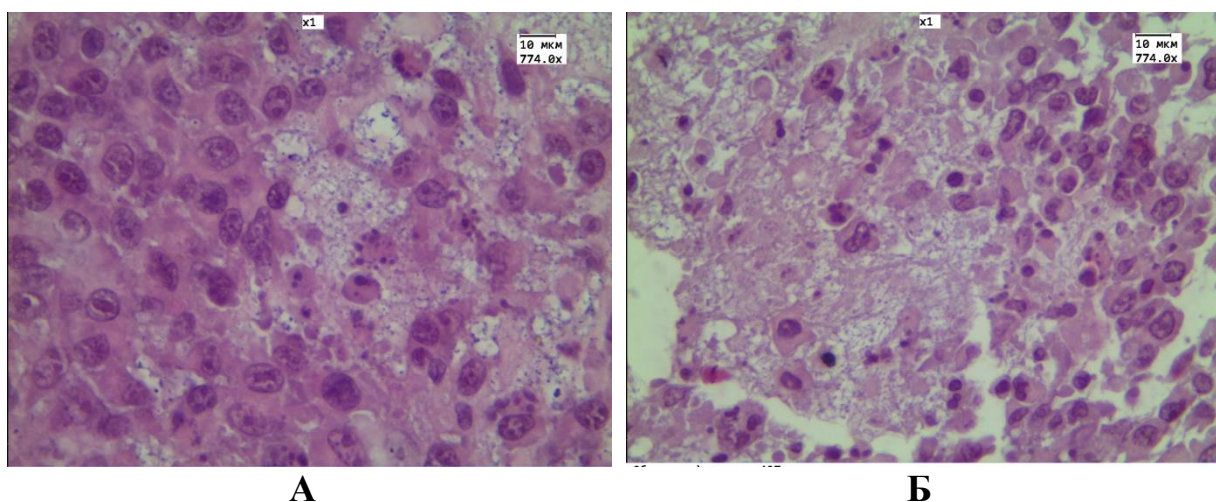


Рисунок 56. Гистологическое строение рака почки, дистрофические и некротические изменения ткани опухоли, апоптотические тельца.

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774: А – при пероральном введении экстракта аврана; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана.

Таблица 20 – Морфометрические показатели клеток перевитой опухоли почки РА в группе сравнения без воздействия и после внутримышечного и перорального введения экстракта аврана в дозе 110 мг/кг/сутки

| Показатель<br>( $M \pm \delta$ )<br>Группа | Число кл. в<br>поле зрения<br>(ув.768) | Диаметр<br>ядра          | Диаметр<br>клетки        | ЯЦИ                  | Число<br>некрот.<br>кл. в п/зр |
|--------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| Группа сравнения                           | 106,47<br>$\pm 2,36$                   | 0,0104<br>$\pm 0,0003$   | 0,0164<br>$\pm 0,001$    | 0,630<br>$\pm 0,024$ | 0,3<br>$\pm 0,004$             |
| Экстракт аврана<br>в/м                     | 52,3<br>$\pm 4,8^*$                    | 0,0062<br>$\pm 0,0003^*$ | 0,0103<br>$\pm 0,0005^*$ | 0,61<br>$\pm 0,03$   | 40,2<br>$\pm 5,4^*$            |
| Экстракт аврана<br>per os                  | 63,00<br>$\pm 2,43^*$                  | 0,0088<br>$\pm 0,0009^*$ | 0,025<br>$\pm 0,012$     | 0,600<br>$\pm 0,079$ | 36,4<br>$\pm 6,2^*$            |

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  достоверность различий более 95% при сравнении значений опытной группы и группы сравнения определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

Было выявлено уменьшение размеров диаметра ядра при внутримышечном введении в 1,8 раза и при пероральном введении в 1,2 раза, а также статистически значимое уменьшение среднего диаметра клетки только при внутримышечном введении в 1,5 раза в отличие от группы сравнения. При этом ядерно-цитоплазматический индекс при обоих путях введения экстракта не менялся относительно группы сравнения.

При окраске метиловым зеленым - пиронином по Браше отмечали высокий уровень РНК в ядрах опухолевых клеток в группе сравнения (красный цвет) и снижение экспрессии ядерной РНК или вообще ее отсутствие в клетках опухоли как в группе с пероральным, так и в группе с внутримышечным введением экстракта. Возможно, это свидетельствует об уменьшении ее транскрипционной активности или разрушении (Рисунок 57). Ярко окрашенные ядра сохранялись только под капсулой опухоли.

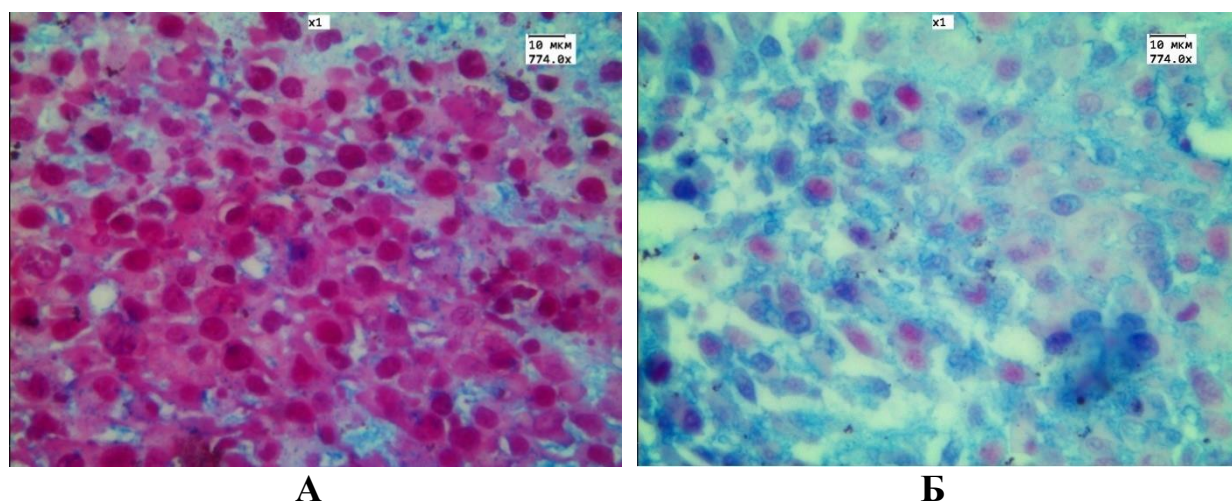


Рисунок 57. Рак почки. Окраска ДНК и РНК метиловым зеленым - пиронином по Браше. Ув. 774. Группы: А – сравнения – ярко красное окрашивание; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – резкое снижение интенсивности окраски в группе.

При гистохимической окраске опухоли лектином зародышей пшеницы WGA в группе сравнения экспрессия отсутствовала. При внутримышечном и пероральном путях введения экстракта аврана лектин WGA давал хоть и очаговую, но положительную реакцию (Рисунок 58), то есть на поверхности клеток опухоли присутствовали N-ацетил-D-глюкозамин и N-ацетил-нейраминная кислота. Нельзя исключить, что экспрессия сиаловой кислоты создавала отрицательный заряд на поверхности мембран клеток и приводила к их отталкиванию, что, возможно, объясняло разрозненность клеток опухоли при воздействии экстракта аврана.

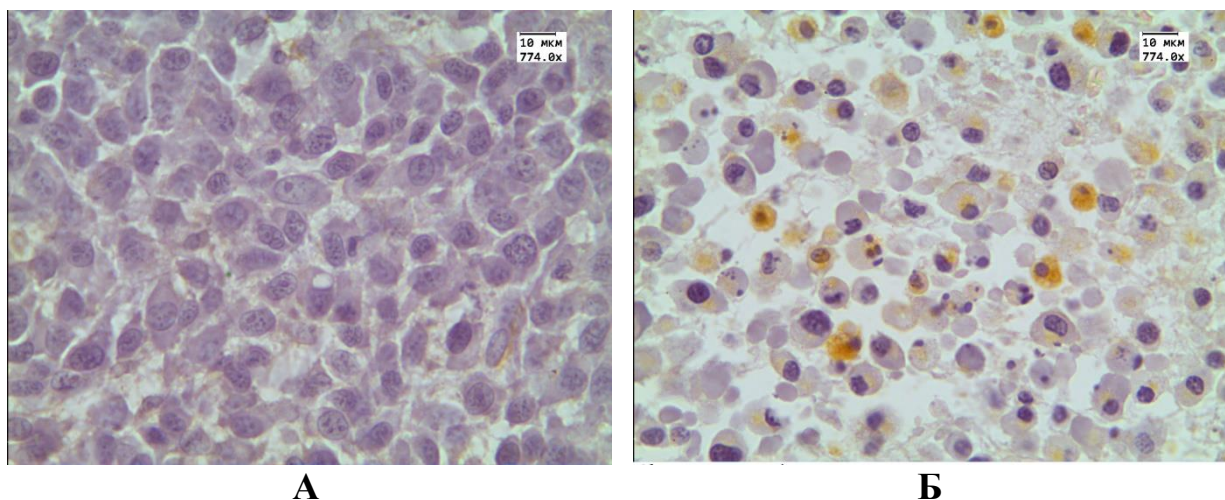


Рисунок 58. Рак почки. Гистохимическая окраска лектином зародышей пшеницы WGA. Ув. 774. Группы: А – сравнения – экспрессия отсутствует; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – положительная реакция с WGA (коричневое окрашивание).

При иммуногистохимическом исследовании ткани рака почки с маркером Ki67 в группе сравнения индекс пролиферации составил 48%, причем у большей части прореагировавших ядер клеток экспрессия была выраженной. В экспериментальных группах при обоих путях введения экстракта аврана экспрессия не выявилась (индекс пролиферации равен 0) (Таблица 21, Рисунок 59).

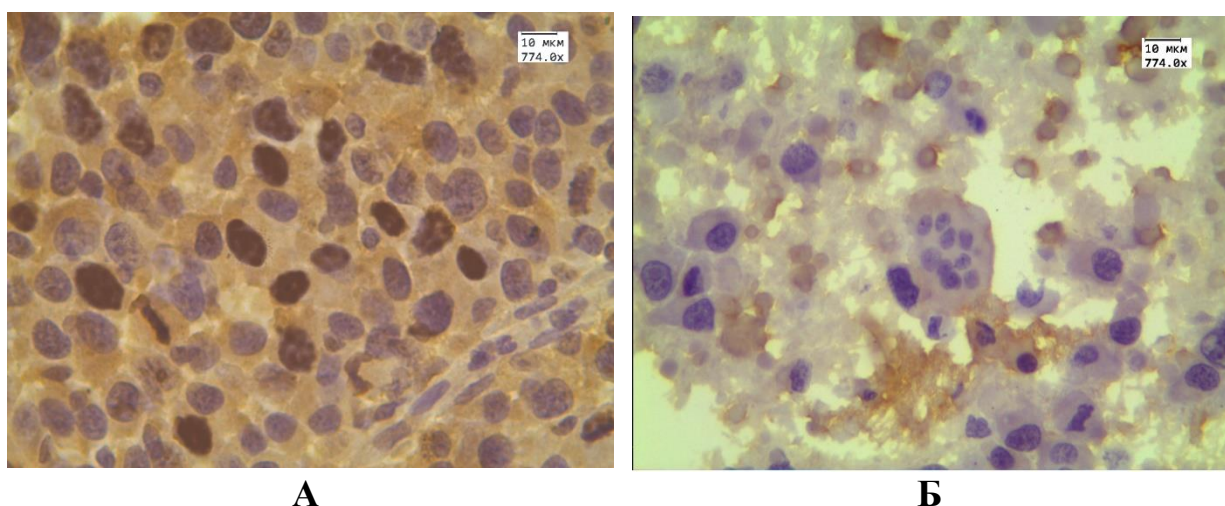


Рисунок 59. Рак почки. Иммуногистохимическая реакция с антителом Ki67 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженная экспрессия; Б – экспериментальная группа с внутримышечным путем введения экстракта аврана – уменьшение экспрессии маркера пролиферации.

При иммуногистохимической окраске с маркером EGFR как в группе сравнения, так и в экспериментальных группах, независимо от пути введения препарата, экспрессия отсутствовала (Рисунок 60).

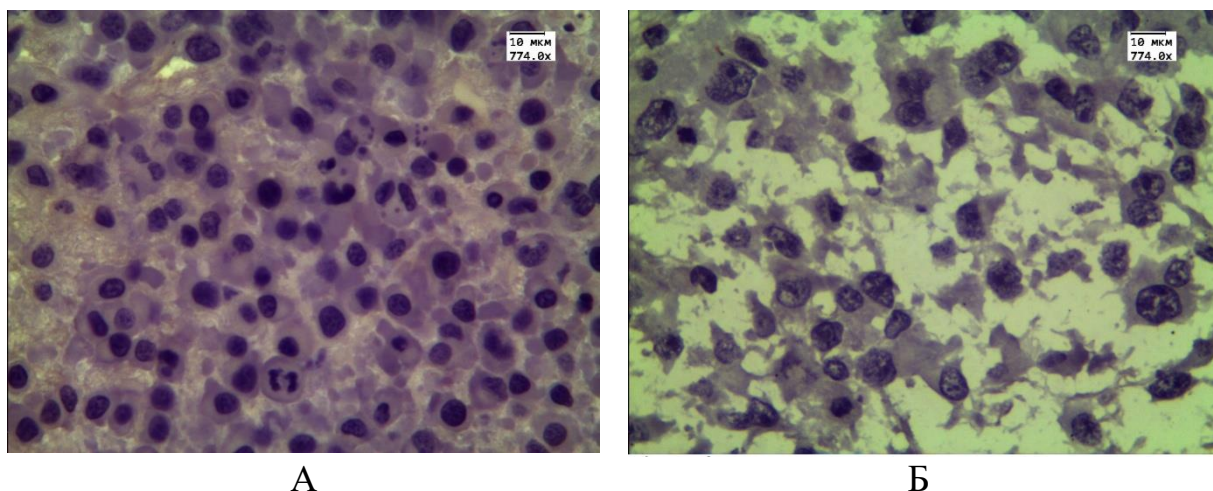


Рисунок 60. Рак почки. Иммуногистохимическая реакция с антителом EGFR и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Отсутствие экспрессии. А – группа сравнения; Б – экспериментальная группа с пероральным путем введения экстракта аврана.

При иммуногистохимической окраске ткани рака почки РА с маркером ангиогенеза VEGF в группе сравнения наблюдали слабую цитоплазматическую экспрессию. В экспериментальных группах как с внутримышечным, так и с пероральным введением экстракта аврана, экспрессия маркера ангиогенеза VEGF на конец эксперимента отсутствовала (Рисунок 61).

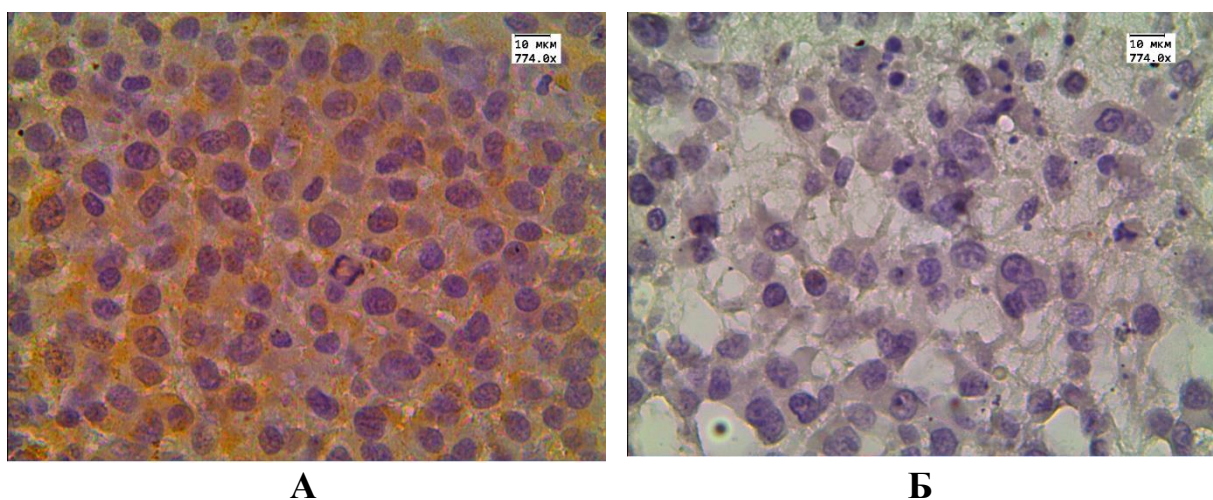


Рисунок 61. Рак почки. Иммуногистохимическая реакция с антителом VEGF и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженная экспрессия; Б – экспериментальная группа с пероральным путем введения экстракта – отсутствие экспрессии.

При окраске на маркер апоптоза p53 выявили отсутствие экспрессии в группе сравнения. После введения экстракта аврана в экспериментальных группах в опухолевой ткани отмечали появление умеренной, как цитоплазматической, так и ядерной экспрессии маркера апоптоза p53. Данная реакция была наиболее выражена в зонах разрушения опухоли. Маркер экспрессировался в апоптотических тельцах и в клетках без ядер. При внутримышечном введении экстракта процент клеток с положительной экспрессией достигал 60,5%, а при пероральном пути введения – 37,5% (Таблица 21, Рисунок 62).

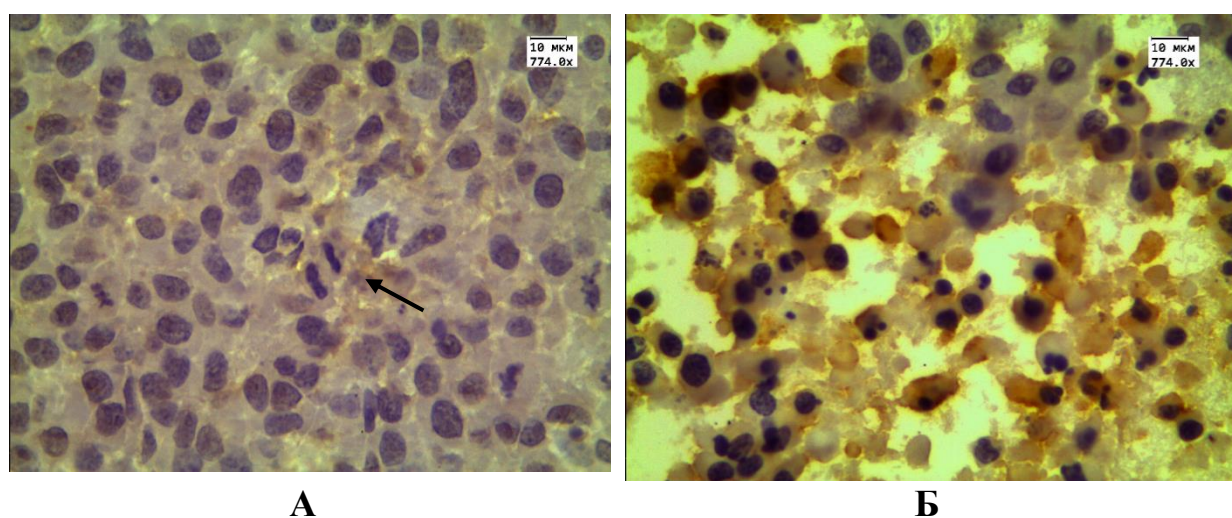


Рисунок 62. Рак почки. Иммуногистохимическая реакция с антителом p53. Ув. 774. Группы: А – сравнения – стрелкой указана фигура митоза; Б – экспериментальная с внутримышечным введением экстракта – выраженная экспрессия.

При иммуногистохимическом окрашивании цитоплазматическим маркером активации апоптоза Bax в клетках рака почки РА группы сравнения наблюдали отрицательную реакцию, так же, как и в группе с пероральным путем введения экстракта аврана. При внутримышечном пути введения отмечали умеренную экспрессию маркера в  $58,2 \pm 12,8\%$  клеток (Таблица 21, Рисунок 63). Кроме того, экспрессия данного маркера при внутримышечном пути введения отмечается в клетках с конденсированным хроматином в ядре, в безъядерных клетках и апоптотических тельцах, что может быть подтверждением того, что клетки погибают в большей степени через апоптоз.

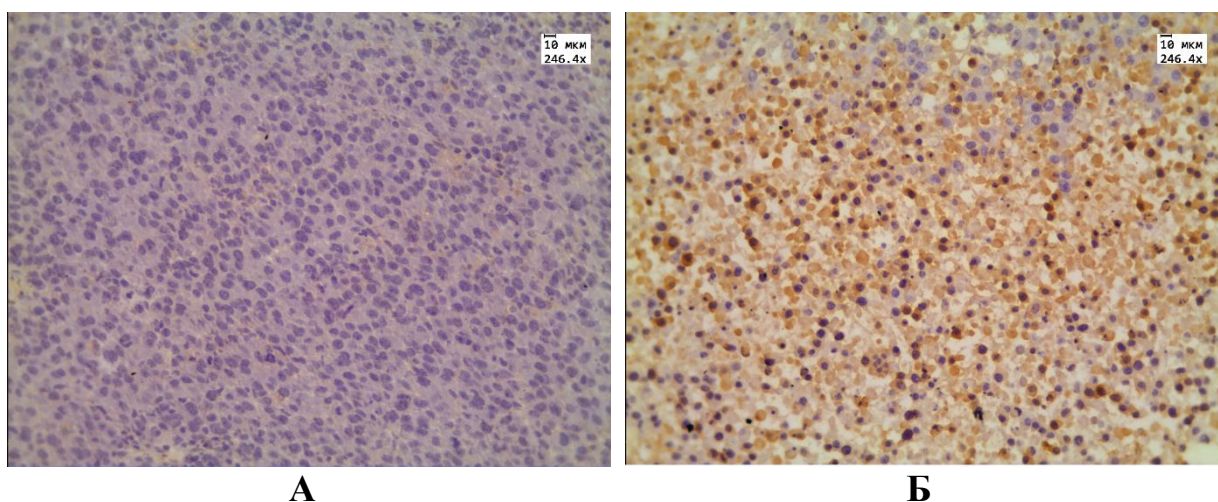


Рисунок 63. Рак почки. Иммуногистохимическая реакция с антителом Вах и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – экспериментальная группа с внутримышечным введением экстракта – выраженная экспрессия маркера.

Однако при оценке экспрессии иммуногистохимического маркера, блокирующего апоптоз Bcl-2, наблюдали отсутствие экспрессии как в группе сравнения, так и после воздействия экстрактом, что говорит о том, что для рака почки РА не характерна экспрессия данного белка, и под действием экстракта не происходит его активация.

При иммуногистохимическом окрашивании на маркер клеточной смерти CD95 (Fas/APO-1) в клетках рака почки РА группы сравнения отмечали отрицательную реакцию. Введение экстракта аврана вызывало выраженную цитоплазматическую экспрессию данного рецептора в клетках рака почки РА в 83,1% при внутримышечном введении и в 24,6% при пероральном пути введения (Рисунок 64).

При окраске ткани рака почки РА на маркер Fas-ligand в группе сравнения отмечали отрицательную реакцию. При введении экстракта аврана наблюдали мембранную и цитоплазматическую экспрессию Fas-ligand, при внутримышечном пути слабую – до 38,4% клеток, при пероральном пути введения до – 49% клеток (Рисунок 65).

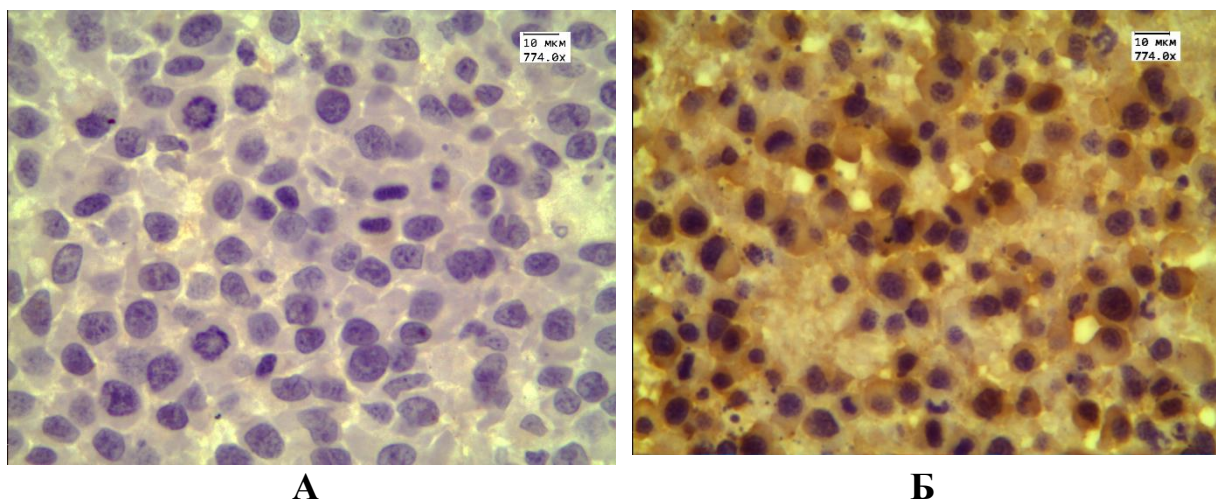


Рисунок 64. Рак почки. Иммуногистохимическая реакция с антителом CD95 (Fas/APO-1) и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения; Б – экспериментальная группа с внутримышечным введением экстракта – выраженная экспрессия маркера.

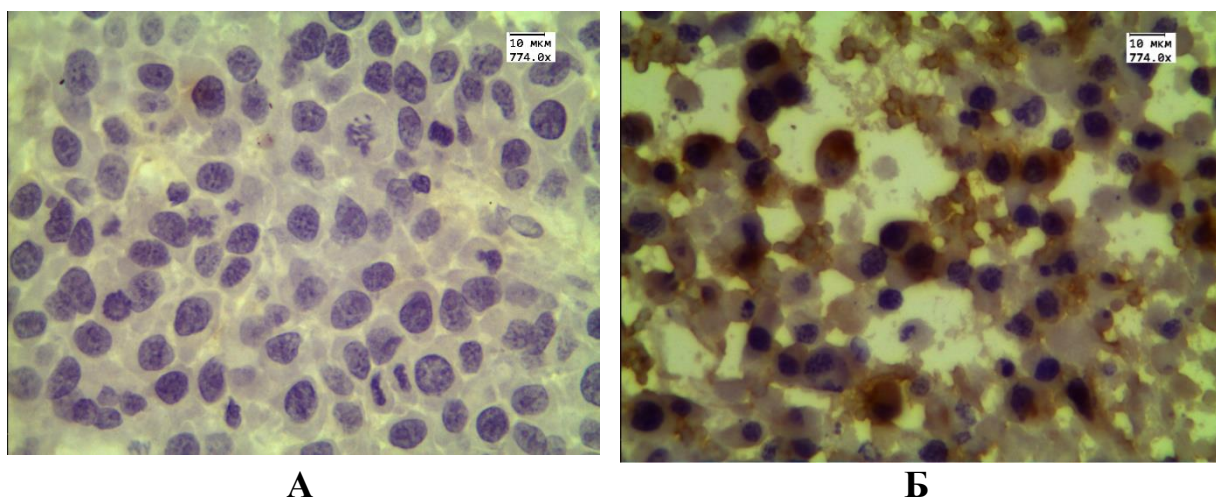


Рисунок 65. Рак почки. Иммуногистохимическая реакция с антителом Fas-ligand и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения; Б – экспериментальная группа с пероральным введением экстракта аврана – выраженная экспрессия маркера.

При иммуногистохимическом окрашивании на маркер аутофагии LC3B в клетках рака почки РА группы сравнения отмечали зональную слабую положительную экспрессию в 7,8% клеток. При пероральном пути введения наблюдали умеренную очаговую экспрессию маркера LC3B и увеличение числа экспрессировавших клеток до 12,3%, преимущественно в зонах с признаками повреждения. Следует отметить, что экспрессия наблюдалась в безъядерных клетках. (Рисунок 66).

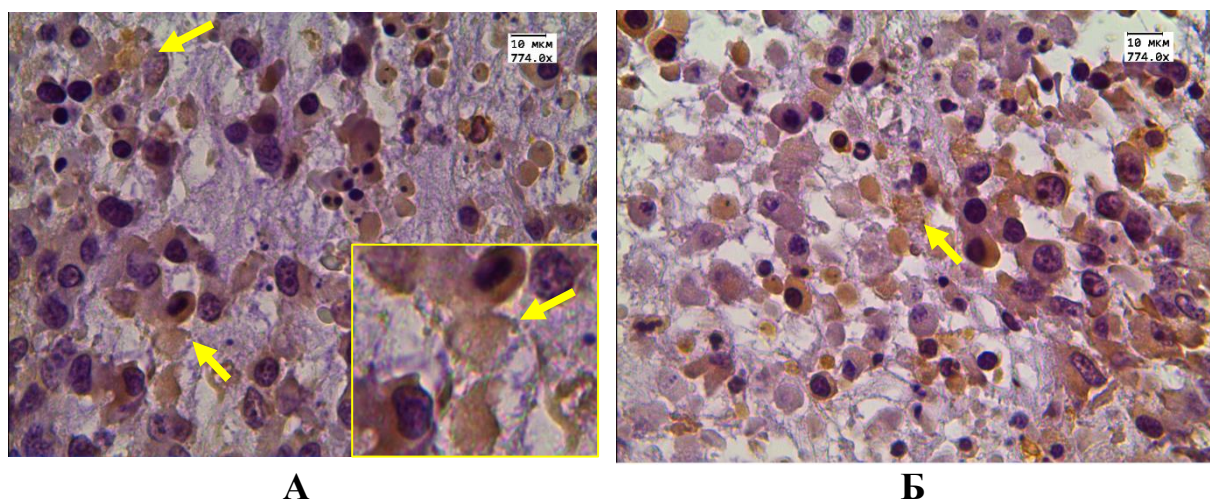


Рисунок 66. Рак почки. Иммуногистохимическая реакция с антителом LC3B и докрасиванием ядер гематоксилином. Стрелками указаны погибшие клетки с положительной экспрессией в виде зернистости. Ув. 774. А – группа сравнения; Б – группа с пероральным путем введения экстракта аврана.

Таблица 21 – Иммуногистохимические маркеры рака почки РА в группе сравнения и экспериментальных группах под действием экстракта аврана

| Маркер<br>(% + экспресс. клеток)                 | Группы                                | Сравнения                       | В/м введение<br>экстракта аврана   | Перор. введение<br>экстракта аврана |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
|                                                  | Медиана;(квартиль 25 - 75); [min-max] |                                 |                                    |                                     |
| <b>Ki67</b><br>(пролиферация)                    |                                       | 48<br>(43-54)<br>[52-55] ++/+++ | 0<br>*                             | 1*<br>(0-1)<br>[0-1] +              |
| <b>EGFR</b>                                      |                                       | 0                               | 0                                  | 0                                   |
| <b>ангио генеза - VEGF</b>                       |                                       | 70<br>(43-85)<br>[41-87] +/++   | 0*                                 | 0*                                  |
| <b>аутофагии - LC3B</b>                          |                                       | 7,8<br>(6-10)<br>[4-11] ++      | 1,2*<br>(0-2)<br>[0-2] +           | 12,3*<br>(8-15)<br>[7-17] ++        |
| <b>Маркеры активации и блокирования апоптоза</b> |                                       |                                 |                                    |                                     |
| <b>p53</b>                                       |                                       | 0                               | 60,5*<br>(48-62)<br>[45-68] ++/+++ | 37,5*<br>(30-42)<br>[29-45] ++/+++  |
| <b>Bcl-2</b>                                     |                                       | 0                               | 0                                  | 0                                   |
| <b>Bax</b>                                       |                                       | 0                               | 58,2*<br>(41-63)<br>[38-65] ++     | 0±0                                 |
| <b>CD95 (Fas/APO-1)</b>                          |                                       | 0                               | 83,1*<br>(68-95)<br>[65-99] +++    | 24,6 *<br>(11-34)<br>[8-41] +++     |
| <b>Fas-ligand</b>                                |                                       | 0                               | 38,4*<br>(32-42)<br>[29-45] +      | 49,1*<br>(21-65)<br>[18-68] +++     |

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  достоверность различий при сравнении значений опытной группы и группы сравнения определяли с помощью критерия Манна-Уитни. +, ++, +++ - степень выраженности экспрессии (слабая, умеренная и выраженная).

Следует отметить, что при этом экспрессия проявлялась в виде многочисленной мелкой зернистости, что говорит о запуске аутофагии. По мнению К. Dokladny, М. Nathaniel (2013), клетки, в которых запущена аутофагия, окрашиваются неравномерно, так как LC3 собирается на поверхности аутофагосом, поэтому клетка выглядит пятнистой. При внутримышечном введении экстракта аврана наблюдали единичную экспрессию ( $1,2 \pm 0,8\%$ ) данного маркера, что, по всей видимости, обусловлено блокированием аутофагии за счет более высоких концентраций аврана в организме животного, которая достигается за счет большей биодоступности при внутримышечном введении.

### 5.3. Макро- и микроскопические изменения внутренних органов при введении экстракта аврана

При проведении анализа нами было установлено, что индекс органов К (отношение массы органа к массе животного, умноженное на 100) для сердца, легких и почек не изменяется как при пероральном, так и внутримышечном способах введения экстракта аврана лекарственного (Таблица 22).

Таблица 22 – Индекс органов К (отношение массы органа к массе животного)

| Группа<br>Индекс<br>К для органов ( $M \pm \delta$ ) | Группа<br>сравнения | Экстракт<br>аврана<br>внутримышечно   | Экстракта аврана<br>перорально        |
|------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Сердце                                               | $0,005 \pm 0,0002$  | $0,005 \pm 0,0002$                    | $0,005 \pm 0,0003$                    |
| Легкие                                               | $0,008 \pm 0,0009$  | $0,01 \pm 0,0014$                     | $0,009 \pm 0,0012$                    |
| Печень                                               | $0,052 \pm 0,002$   | <b><math>0,079 \pm 0,006^*</math></b> | <b><math>0,066 \pm 0,002^*</math></b> |
| Почки                                                | $0,0056 \pm 0,0006$ | $0,006 \pm 0,0003$                    | $0,005 \pm 0,0002$                    |
| Селезенка                                            | $0,004 \pm 0,0004$  | <b><math>0,008 \pm 0,002^*</math></b> | <b><math>0,01 \pm 0,0001^*</math></b> |

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  достоверность различий при сравнении значений опытной группы и группы сравнения определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча более 95%.

Однако мы наблюдали увеличение коэффициента К на 26% ( $T > 1.96$ ) для печени при пероральном введении экстракта аврана и на 51% – при внутримышечном ( $T > 1.96$ ) относительно группы сравнения (Таблица 22).

При оценке коэффициента К для селезенки отмечали его увеличение при пероральном пути введения в 2,5 раза ( $T > 1.96$ ) и в 2 раза – при внутримышечном ( $T > 1.96$ ) относительно группы сравнения, что, по всей видимости, связано со стимуляцией органов иммуногенеза (Таблица 22).

Для выявления возможных ответных реакций на введение экстракта аврана были изучены органы и ткани в местах непосредственного и первоначального контакта с экстрактом: органы желудочно-кишечного тракта при пероральном введении и мягкие ткани бедра – при внутримышечном введении.

При пероральном пути введения экстракта аврана морфологических изменений в пищеводе, желудке и кишечнике так же, как и в группе сравнения, выявлено не было (Рисунок 67). Обращало на себя внимание увеличение мезентеральных лимфоузлов в 4 раза ( $T > 1.96$ ). При гистологическом исследовании в них наблюдалось появление четко отграниченных лимфоидных фолликулов со светлыми центрами размером до 0,04 мм<sup>2</sup> (Рисунок 68).

При внутримышечном пути введения экстракта аврана изменения в виде межуточного отека мышечной ткани развивались в месте введения. Также отмечали гиперплазию ягодичных лимфатических узлов.

В печени у животных группы сравнения наблюдали умеренное полнокровие кровеносных сосудов, малокровие и умеренное расширение синусоидов, умеренно выраженную зональную вакуольную дистрофию.

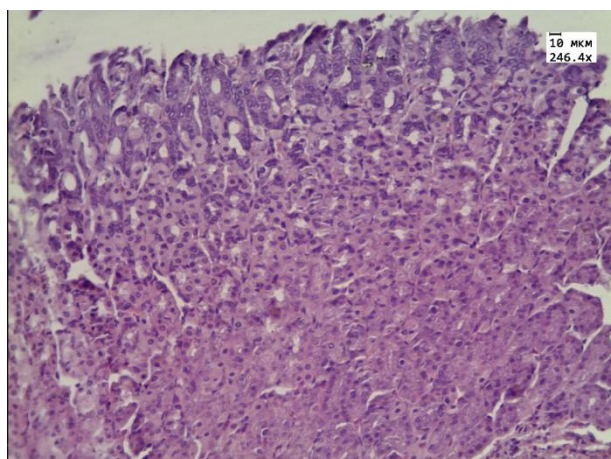
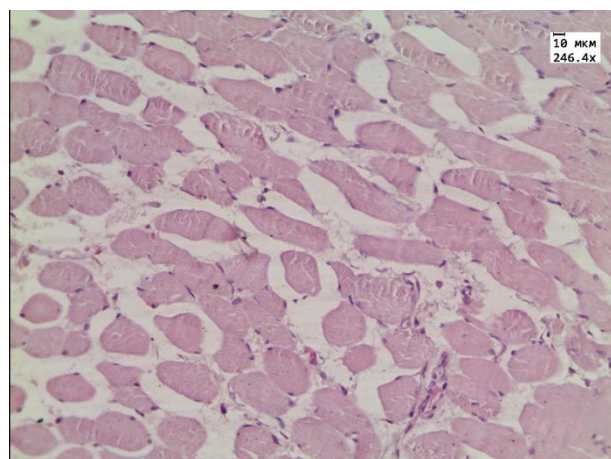
**А****Б**

Рисунок 67. А – Слизистая желудка при пероральном пути введения; Б – отек мышцы бедра при внутримышечном введении экстракта аврана. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4.

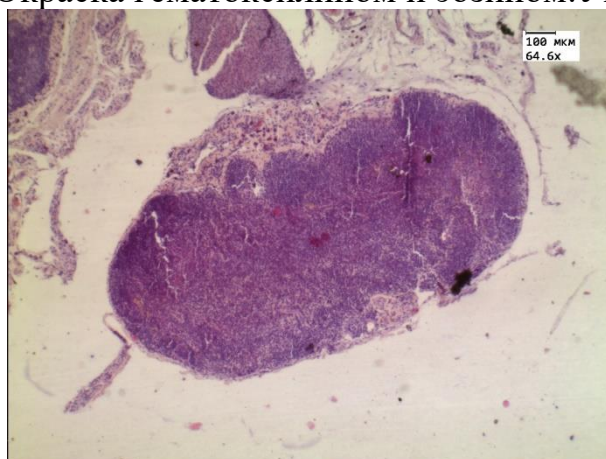
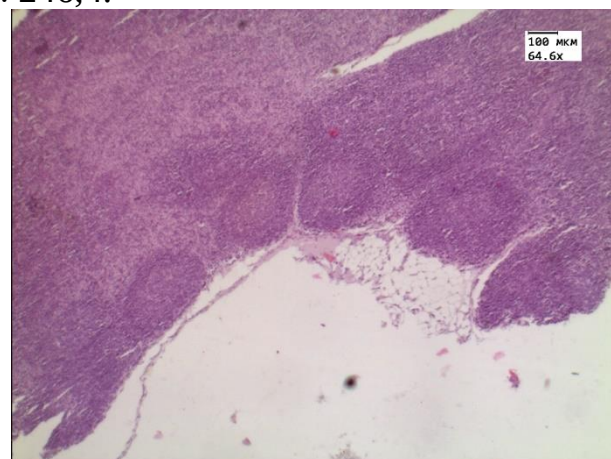
**А****Б**

Рисунок 68. Мезентериальные лимфоузлы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 64. А – группа сравнения; Б – гиперплазия лимфоидной ткани при пероральном пути введения экстракта аврана.

На фоне введения экстракта аврана отмечали изменение гистологической картины, синусоиды были умеренно полнокровны, местами вакуольная дистрофия была выраженной, но тоже имела зональный характер. Наблюдали некроз единичных гепатоцитов и появление двуядерных гепатоцитов до 2-3 в поле зрения. При этом ядра были равномерно базофильно окрашены. При гистологическом обзорном описании разницы между группами с разными путями введения экстракта не обнаружили, хотя обращало на себя внимание более выраженное полнокровие сосудов при пероральном введении.

При подсчете количества клеток печени в поле зрения нами было установлено, что при введении экстракта аврана происходит снижение среднего количества как гепатоцитов (на 31% ( $T>1.96$ ), так и количества всех клеток (на 33% ( $T>1.96$ ), в отличие от группы сравнения. При этом различия между группами с внутримышечным и пероральным путями введения не наблюдалось. (Рисунок 69, Таблица 23).

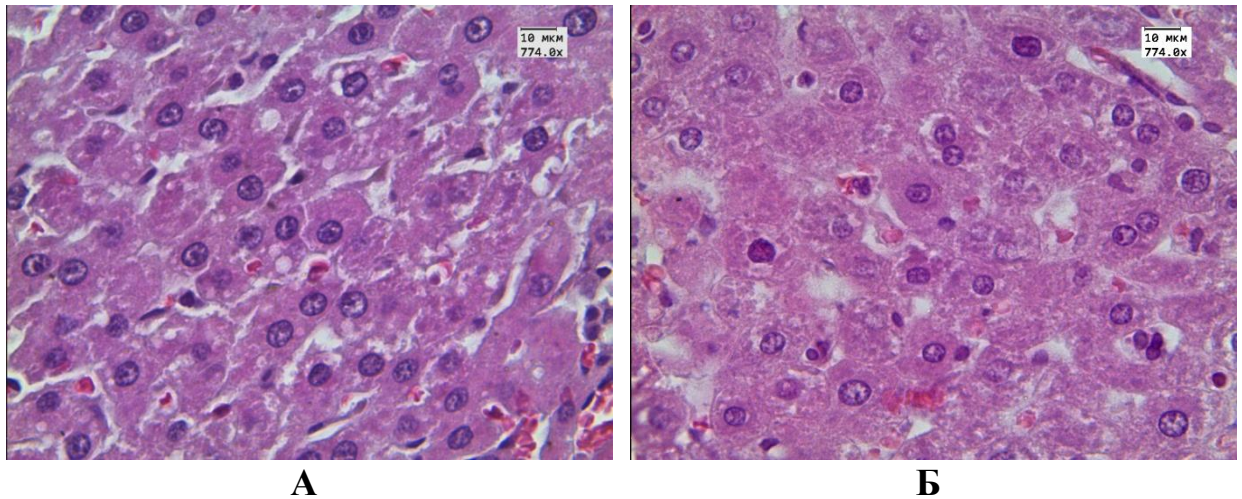
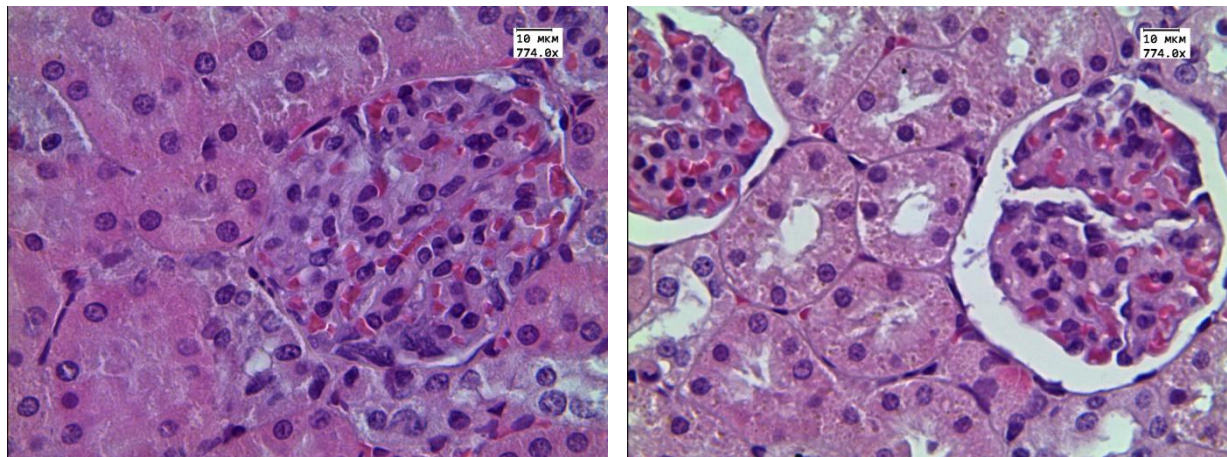


Рисунок 69. Микроскопическое строение печени. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – вакуольная и зернистая дистрофия гепатоцитов; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – зернистая дистрофия гепатоцитов.

Поджелудочная железа животных как в группе сравнения, так и в экспериментальных группах сохранила нормальное строение желез, встречались островки Лангерганса до  $0,0015 \text{ мм}^2$ , в ряде случаев наблюдали периваскулярный диапедез эритроцитов и выраженное полнокровие сосудов. При введении экстракта аврана отмечали нормальное строение железы, но появление умеренного отека.

В почках животных из группы сравнения регистрировали выраженное полнокровие клубочков и исчезновение просвета между капсулой Шумлянско-Боумана и сосудистым клубочком. Появлялись участки с умеренной дистрофией эпителия извитых канальцев. При введении экстракта аврана клубочки были полнокровны. Размеры клубочков становились меньше, чем в группе сравнения, на 29,5% ( $T>1,96$ ) при внутримышечном введении и

на 23,5% ( $T>1,96$ ) – при пероральном введении. Высота эпителия извитых канальцев достоверно не менялась, хотя в ряде случаев отмечали некрозы в клетках эпителия извитых канальцев почки. Просветы извитых канальцев расширены (Таблица 23, Рисунок 70).



А

Б

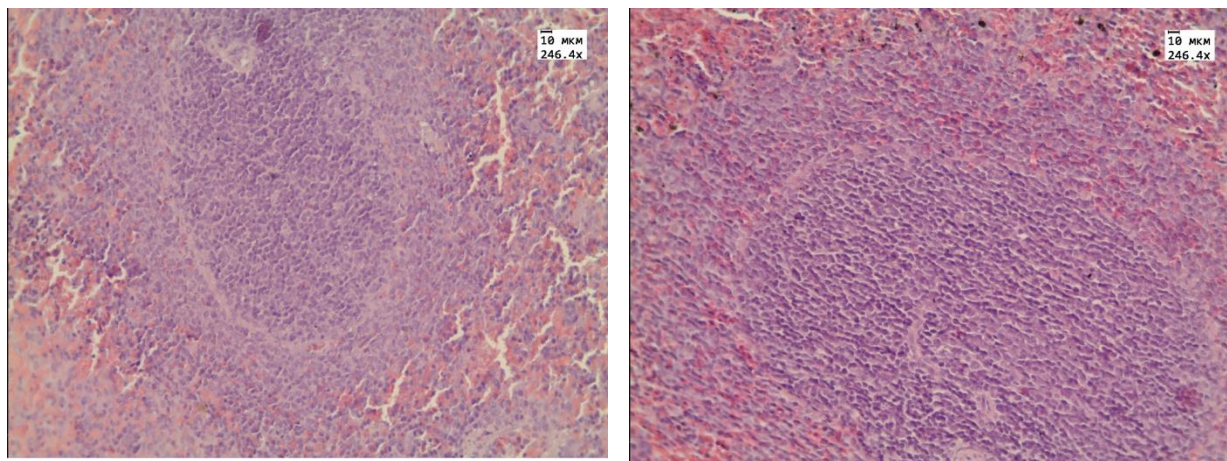
Рисунок 70. Почки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – отсутствие просвета между сосудистым клубочком и капсулой Шумлянско-Боумана; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – зернистость цитоплазмы эпителия извитых канальцев.

В группе сравнения в селезенке отмечали равное соотношение между белой и красной пульпой, хотя границы местами были размыты, также наблюдали отсутствие ярко выраженных светлых центров в фолликулах, площадь фолликулов составила  $0,18 \pm 0,032 \text{ мм}^2$ .

В группе крыс с введением экстракта аврана в селезенке белая пульпа начинала преобладать над красной. Развивалось выраженное полнокрое. При внутримышечном и пероральном путях введения отмечали хоть и незначительное, но достоверное увеличение площади фолликулов на 2,7% и 1,1%, соответственно ( $T>1,96$ ) (Рисунок 71, Таблица 23).

В легких крыс из группы сравнения просветы альвеол были свободны, межальвеолярные перегородки утолщены, сосуды малокровны, перибронхиальные лимфоузлы имели размер до  $0,164 \text{ мм}^2$ . В группе с введением экстракта аврана также отмечали нормальное строение легких, однако было более выражено полнокрое межальвеолярных перегородок. В

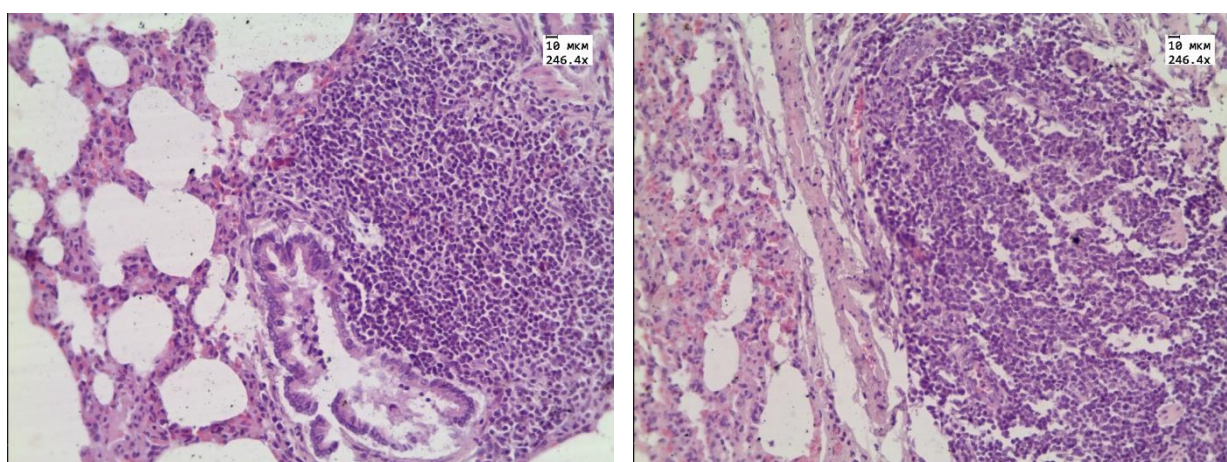
крупных сосудах наблюдались полнокровие и феномен сепарации крови. При морфометрии перибронхиальных лимфоузлов наблюдали их увеличение на 27,5% ( $T > 1.96$ ) при внутримышечном и на 38,5% ( $T > 1.96$ ) – при пероральном путях введения (Рисунок 72, Таблица 23).



А

Б

Рисунок 71. Селезенка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – при пероральном введении экстракта аврана – гиперплазия фолликулов.



А

Б

Рисунок 72. Лимфоидные инфильтраты в легких. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана.

В миокарде крыс группы сравнения отмечали отек стромы, выраженную дистрофию и некроз отдельных кардиомиоцитов. В группе крыс с введением экстракта аврана подобных изменений не выявлялось (Рисунок 73).

В головном мозге у животных группы сравнения наблюдали умеренный периваскулярный отек вокруг сосудов микроциркуляторного русла и их малокровие. Как при внутримышечном, так и пероральном введении экстракта аврана наблюдали слабо выраженный периваскулярный и перицеллюлярный отек вещества мозга, полнокровие сосудов микроциркуляторного русла (Рисунок 74).

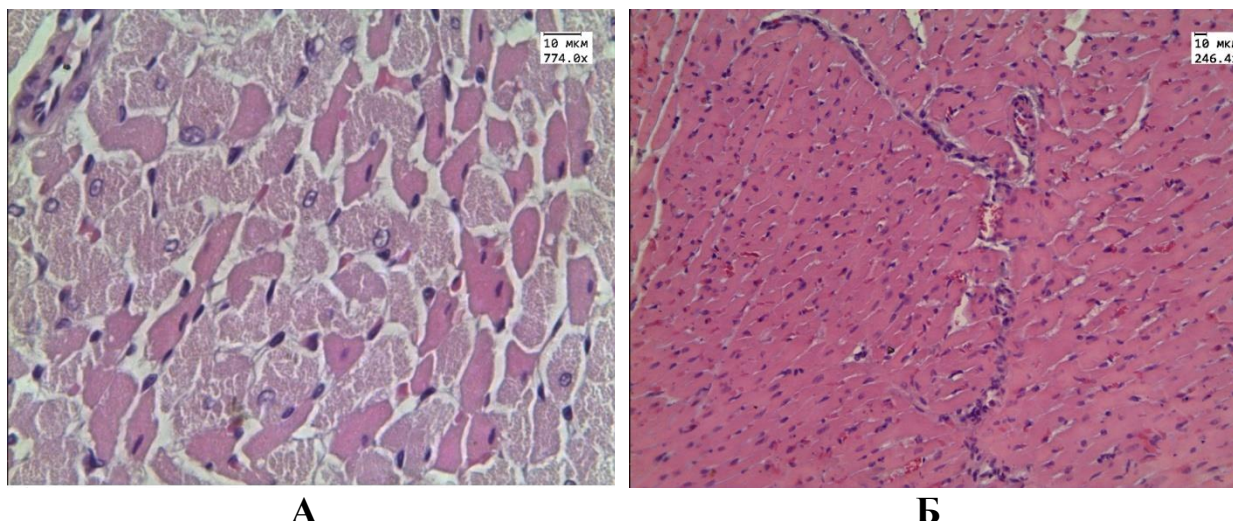


Рисунок 73. Миокард. Окраска гематоксилином и эозином. Группы: А – сравнения – выраженная дистрофия и некроз отдельных кардиомиоцитов. Ув. 774; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана – умеренное полнокровие. Ув. 246,4.

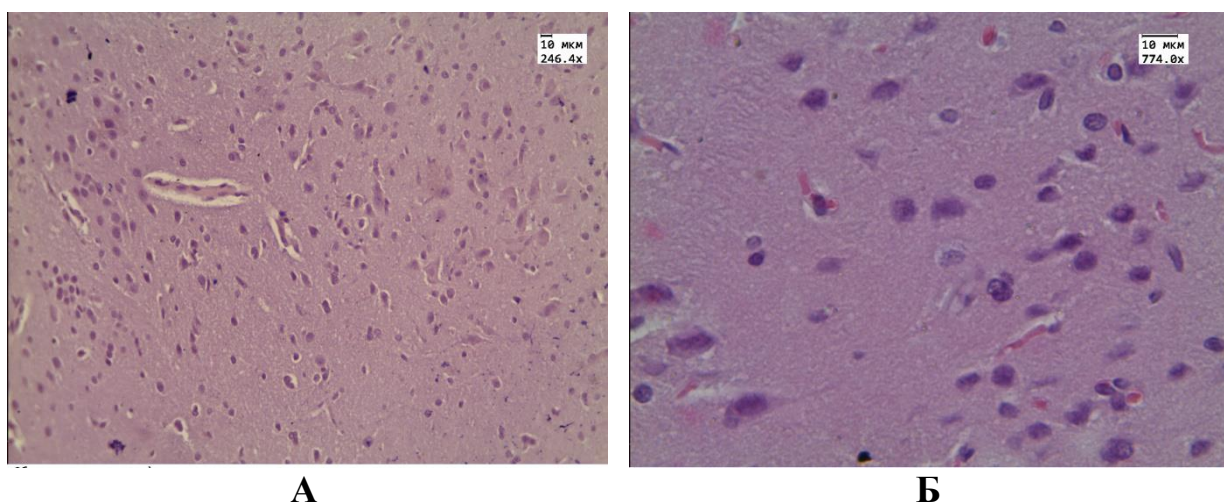


Рисунок 74. Отек головного мозга. Окраска гематоксилином и эозином. Группы: А – сравнения. Ув. 246; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана. Ув. 774.

В семенниках животных как группы сравнения, так и экспериментальных групп наблюдали нормальное строение с наличием сперматогенного эпителия на разных стадиях созревания (Рисунок 75).

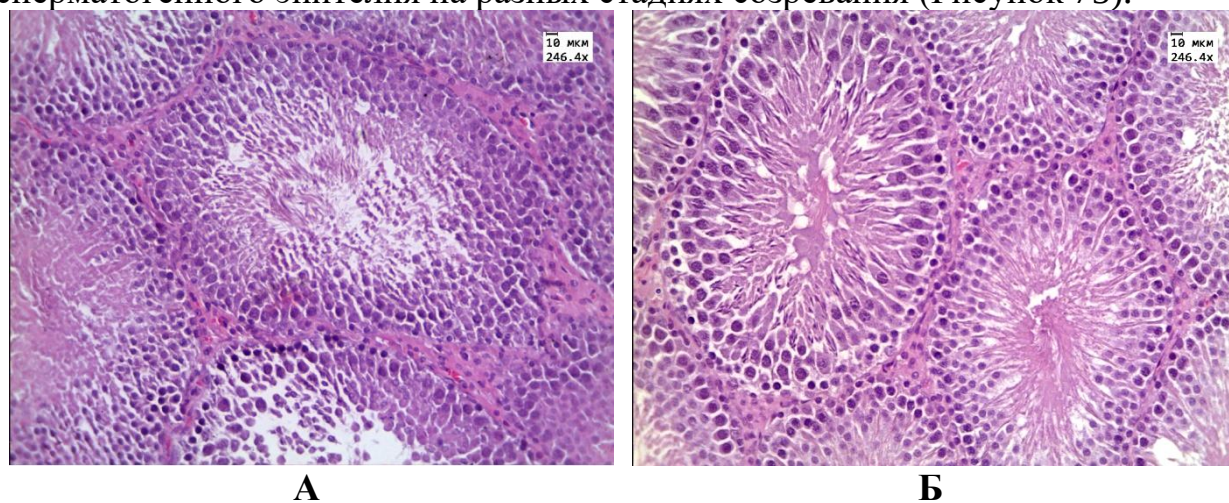


Рисунок 75. Нормальное строение семенников. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана.

Таблица 23 – Морфометрические показатели во внутренних органах у животных с перевиваемым раком почки РА

| Показатель                      | Группы                               |                              |                    |
|---------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--------------------|
|                                 | Группа сравнения,<br>без воздействия | С введением экстракта аврана |                    |
|                                 |                                      | Внутримышечно                | Перорально         |
| Селезенка                       |                                      |                              |                    |
| S фолликулов мм <sup>2</sup>    | 0,17±0,0032                          | 0,19±0,009*                  | 0, 18±0,015*       |
| Печень                          |                                      |                              |                    |
| Гепатоциты (ср.<br>кол. в п/зр) | 47,3±<br>2,2                         | 32,6±<br>1,7*                | 32,1±<br>1,2*      |
| Купфера<br>(ср. кол. в п/зр)    | 12,5±<br>5,3                         | 5,3±<br>0,6                  | 9,6±<br>1,3        |
| Лимфоциты<br>(ср. кол. в п/зр)  | 1,1±<br>0,3                          | 3±<br>0,5                    | 2,1±<br>0,4        |
| Общее кол-во кл.<br>в п/зр      | 61,3±<br>2,1                         | 41±<br>1,9*                  | 44±<br>1,4*        |
| Легкие                          |                                      |                              |                    |
| S перибронх.<br>фолликула       | 0,164±<br>0,028                      | 0,209±<br>0,011*             | 0,227±<br>0,009*   |
| Почки                           |                                      |                              |                    |
| S клубочка                      | 0,0051±<br>0,0001                    | 0,0036±<br>0,0001*           | 0,0039±<br>0,0002* |
| Высота эпит.<br>извит. канальца | 0,012±<br>0,0005                     | 0,013±<br>0,0006             | 0,014±<br>0,0003   |
| Мезентериальные лимфоузлы       |                                      |                              |                    |
| S (мм <sup>2</sup> )            | 1,1±0,1                              | 1,5±0,3                      | 4,08±0,056*        |

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$  достоверность различий при сравнении значений опытной группы и группы сравнения определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча

\*\*\*

Оценка динамики роста перевиваемого рака почки РА показала, что более выраженное замедление темпов роста опухоли и уменьшение ее размеров и массы происходят при внутримышечном введении экстракта аврана. Уменьшение объема опухоли на конец эксперимента по сравнению с размерами опухоли у животных без воздействия экстракта составило 40%, ИТРО по массе – 73%.

В то же время при пероральном введении экстракта аврана отмечали замедление темпов роста опухоли в меньшей степени, чем при внутримышечном введении. На конец эксперимента объем опухоли был меньше на 23% по сравнению с группой крыс без воздействия, ИТРО по массе составил 71%.

Патоморфоз опухолевой ткани проявлялся в виде выраженных некробиотических и атрофических изменений в клетках рака почки: уменьшения размеров ядра и клетки в 1,5 раза; снижения пролиферативной активности (индекс пролиферации Ki67 при обоих путях введения – 0, а в группе без воздействия – 48%), отсутствия митозов и уменьшения экспрессии ядерной РНК, что свидетельствовало о блокировке синтетических процессов на уровне ядра. Клетки опухоли теряли связи между собой, возможно, из-за появления на их мембранах отрицательного заряда, возникшего за счет появления на их мембранах отрицательного заряда, возникшего за счет сialовых кислот (положительная окраска лектином зародыша пшеницы WGA).

Таким образом, при воздействии экстракта аврана в раке почки РА блокируется экспрессия маркера пролиферации Ki67 и маркера ангиогенеза VEGF, то есть клетки опухоли находятся в G0 фазе. Это подтверждается и отсутствием митозов, которые встречаются в группе сравнения до 2-х в поле зрения. Увеличение экспрессии маркера EGFR не меняется после введения экстракта. Однако введение экстракта приводит к активации всех изученных путей апоптоза (p53, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand). Все описанные

изменения были более выражены при внутримышечном пути введения в среднем в 1,5 -2 раза.

Экспрессия маркера аутофагии LC3B увеличивается при пероральном пути введения экстракта аврана. При внутримышечном введении экстракта происходит снижение выраженности экспрессии и количества клеток в состоянии аутофагии, что свидетельствует о блокировании протекторной аутофагии. Данный факт, возможно, связан с количеством экстракта, который доходит до опухоли: при пероральном пути введения часть экстракта разрушается в желудочно-кишечном тракте, а оставшаяся концентрация не вызывает активацию апоптоза и, как следствие, развивается защитная реакция в виде аутофагии.

Изучение морфологического строения других органов для установления влияния на них как самого опухолевого роста, так и лекарственного патоморфоза, показало, что экстракт аврана не вызывал значительных изменений во внутренних органах. В печени развивались выраженные дистрофические изменения, однако на 14 сутки в отличие от группы сравнения при введении экстракта начинались процессы регенерации, о чем свидетельствовало появление двуядерных гепатоцитов.

После введения экстракта аврана наблюдали реакцию со стороны лимфоидного аппарата: увеличивались размеры селезенки (за счет увеличения размеров фолликулов), мезентериальных лимфоузлов, перибронхиальных лимфоидных инфильтратов в легких, что свидетельствовало о возможном иммуностимулирующем эффекте экстракта, за счет чего мог реализоваться и противоопухолевый эффект.

Таким образом, введение экстракта аврана лекарственного вызывает выраженный патоморфоз рака почки РА и не приводит к развитию необратимых морфологических изменений во внутренних органах. Наиболее эффективным является внутримышечный способ введения, что подтверждается наибольшим уменьшением объема опухоли и наиболее выраженными признаками развивающегося в ней патоморфоза.

## ГЛАВА 6. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВО ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ, ОПУХОЛИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ПЕРЕВИТОЙ САРКОМОЙ 45 ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ И ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ ЭКСТРАКТА АВРАНА

### 6.1. Изменение динамики роста перевиваемой саркомы 45

При внутримышечном введении в течение двух недель экстракта аврана в дозировке 110 мг/кг/сутки отмечали ( $Z>2$ ) замедление темпов роста перевиваемой саркомы с 4 дня от начала эксперимента в отличие от группы сравнения. На момент окончания эксперимента объем опухоли в группе с внутримышечным введением аврана лекарственного ( $5,30 \pm 1,94 \text{ см}^3$ ) был на 71,6% меньше ( $Z>2$ ), чем в контроле ( $18,01 \pm 3,39 \text{ см}^3$ ).

При пероральном введении в течение двух недель экстракта аврана в дозировке 110 мг/кг/сутки наблюдали ( $Z>2$ ) замедление темпов роста опухоли в отличие от группы сравнения только с 5 дня от начала эксперимента. На момент окончания эксперимента объем опухоли в исследуемой группе был на 61,7% меньше объема опухоли группы сравнения ( $7,07 \pm 0,30$  и  $18,01 \pm 3,39$  соответственно) (Рисунок 76).

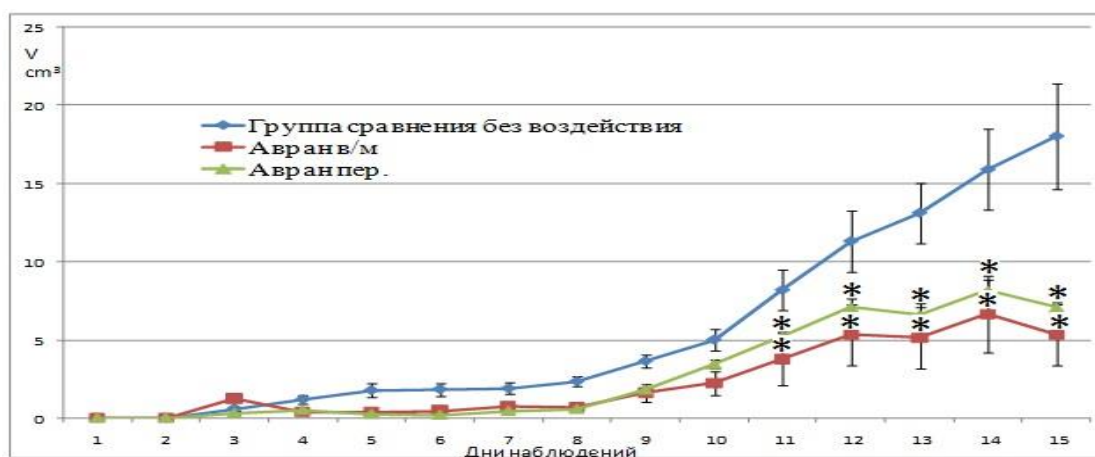


Рисунок 76. Динамика роста объема перевиваемой саркомы 45 в группе сравнения и в группах с пероральным и внутримышечным введением водного раствора экстракта аврана лекарственного.

*Примечание:* \* - значимые различия при анализе значений медиан экспериментальных групп и группы сравнения при  $p < 0.05$  и  $z > 2$  определяли с помощью критерия Манна-Уитни.

Индекс торможения роста опухоли по массе опухоли составил 60,7% при пероральном введении и 70,6% – при внутримышечных путях введения экстракта аврана лекарственного (Таблица 24). Максимально индекс торможения при внутримышечном введении составил 84,2%. В двух случаях привитая опухоль макроскопически не определилась на конец эксперимента.

Таблица 24 – Средняя масса опухоли на конец эксперимента и индекс торможения роста опухоли по ее массе

| Группы                                       | Масса опухоли г (M±δ) | ИТРО (%) |
|----------------------------------------------|-----------------------|----------|
| Сравнения                                    | 18,8±6,43             | -        |
| При внутримышечном введении экстракта аврана | 6,6±2,8*              | 70,6     |
| При пероральном введении экстракта аврана    | 6,4±5*                | 65,7     |

Примечание: \* Примечание: при \* -  $p < 0,05$ , достоверность отличий между значениями экспериментальной и группой сравнения определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча

При анализе динамики дельты истинной массы тела животных в группе сравнения отмечали тенденцию к развитию опухолевой кахексии – в ходе эксперимента животные похудели на 18% (Рисунок 77).

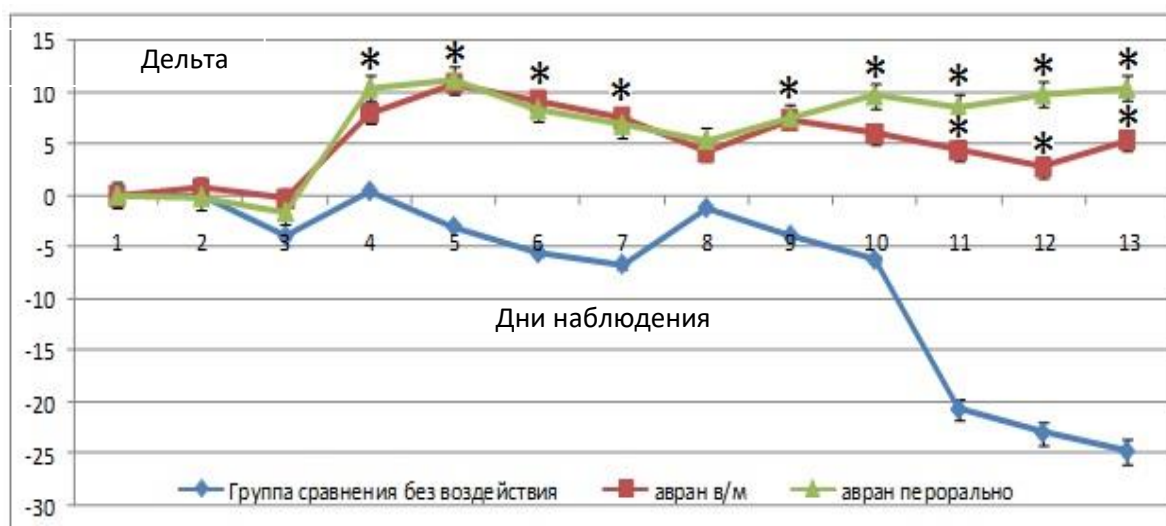


Рисунок 77. Динамика дельты массы тела животных с перевитой саркомой 45.

Примечание: \* - значимые различия определили с помощью критерия Манна-Уитни при анализе значений медиан экспериментальных групп и группы сравнения при  $p < 0.05$  и  $z > 2$ .

При введении экстракта аврана как перорально, так и внутримышечно наблюдали стабильные показатели массы тела. В ходе эксперимента

колебания динамики массы животных были незначительными. Истинная масса тела животных с опухолью в группе с пероральным путем введения экстракта аврана увеличилась на 5% относительно массы на момент начала эксперимента (Рисунок 77); истинная масса тела животных с опухолью в группе с внутримышечным путем введения экстракта аврана увеличилась на 8% относительно массы на момент начала эксперимента (Рисунок 77).

## 6.2. Патоморфоз перевитой саркомы 45

В группе животных без воздействия экстракта опухоль представляла собой веретенноклеточный вариант саркомы и состояла из плотно расположенных пучков веретеновидных вытянутых клеток разных размеров и форм, распространяющихся в разных направлениях.

Ядра гиперхромные, овально-округлые, веретенообразные, хроматин в виде зернистых скоплений. Ядрышки крупные, гиперхромные, чаще по одному. Митозов насчитывали до 3-х в поле зрения. Для цитоплазмы клеток саркомы 45 характерна повышенная базофилия. Опухоль была окружена периферической капсулой с полнокровными сосудами. В центре опухоли в единичных случаях наблюдали очаги дистрофически измененных клеток, микронекрозы опухоли, обусловленные её быстрым ростом (Рисунок 78).

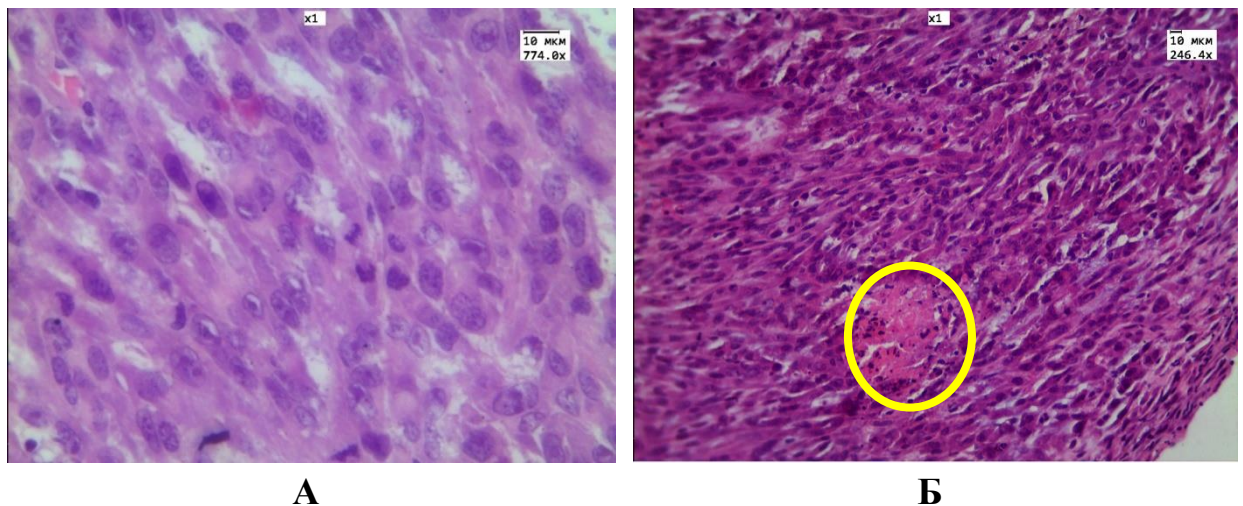


Рисунок 78. Морфологическое строение саркомы 45 в группе сравнения, окраска гематоксилином и эозином: А – Ув. 774; Б – выделен очаг микронекроза. Ув. 246,4.

При обоих способах введения экстракта отмечали выраженный патоморфоз опухоли на 14 день после введения: обширные зоны некроза, выраженная степень дистрофии в живых клетках (Рисунок 79), участки фиброза и дезорганизации соединительной ткани. Появлялась четкая граница между некрозом и сохранной тканью опухоли, площадь некроза превышала одно поле зрения при увеличении 64.

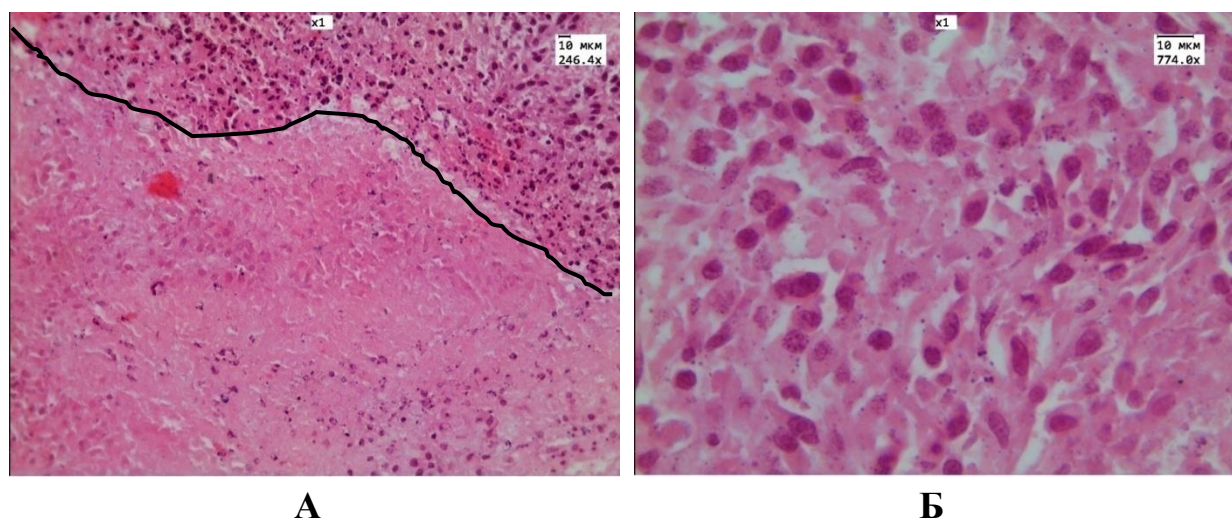


Рисунок 79. Морфологическое строение саркомы 45 при введении экстракта аврана. Окраска гематоксилином и эозином: А – обширные, четко отграниченные поля некроза. Ув. 246,4. Б – дистрофически измененные клетки, отдельные опухолевые клетки в состоянии некроза. Ув. 774.

При проведении морфометрии наблюдали значимое снижение среднего числа клеток в поле зрения (при увеличении 774) в 1,7 раза как при внутримышечном, так и при пероральном путях введения, и увеличение клеток в состоянии некроза и некробиоза также при обоих путях введения экстракта (Таблица 25). При обоих способах введения выявили уменьшение размеров диаметра ядра и среднего диаметра клетки в 1,5 - 1,6 раза в отличие от группы сравнения, что свидетельствовало об атрофических изменениях в клетках под действием экстракта. При этом значение показателя ЯЦИ также уменьшалось по сравнению с группой сравнения в 1,3 раза при внутримышечном пути введения и в 1,2 раза – при пероральном пути введения экстракта аврана.

Таблица 25 – Морфометрические показатели клеток опухоли саркомы 45 на конец эксперимента

| Показатель<br>Группа         | Число<br>кл. в<br>поле<br>зрения<br>(ув.768) | Диаметр<br>ядра                             | Диаметр<br>клетки                        | ЯЦИ                                     | Число<br>некрот.<br>кл. в п/зр |
|------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|
|                              | Медиана;(квартиль 25 - 75); [min-max]        |                                             |                                          |                                         |                                |
| Группа<br>сравнения          | 97,5<br>(86-109)<br>[83-111]                 | 0,012<br>(0,010-0,013)<br>[0,010-0,014]     | 0,021<br>(0,018-0,024)<br>[0,017-0,025]  | 0,69<br>(0,061-0,072)<br>[0,058-0,074]  | 1,5<br>(0-2)<br>[0-4]          |
| Экстракт<br>аврана<br>в/м    | 55,3*<br>(48-61)<br>[44-63]                  | 0,0078*<br>(0,007-0,0082)<br>[0,007-0,0084] | 0,014*<br>(0,011-0,014)<br>[0,010-0,016] | 0,57*<br>(0,045-0,063)<br>[0,045-0,066] | 37,4*<br>(30-38)<br>[29-39]    |
| Экстракт<br>аврана<br>per os | 57,1*<br>(47-62)<br>[45-64]                  | 0,0087*<br>(0,007-0,009)<br>[0,006-0,01]    | 0,014*<br>(0,011-0,013)<br>[0,010-0,015] | 0,58*<br>(0,048-0,064)<br>[0,046-0,071] | 38,9*<br>(33-40)<br>[31-41]    |

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  достоверность различий определяли с помощью критерия Манна-Уитни между экспериментальной группой и группой сравнения.

При окраске саркомы 45 красителями ОКГ в группе сравнения в ткани опухоли между клетками выявляли тонкие прослойки соединительной ткани. При введении экстракта аврана как при внутримышечном, так и пероральном путях введения наблюдали появление участков склерозирования самой ткани опухоли без развития предшествующего некроза, т.е. развивался склероз стромы самой опухоли (Рисунок 80).

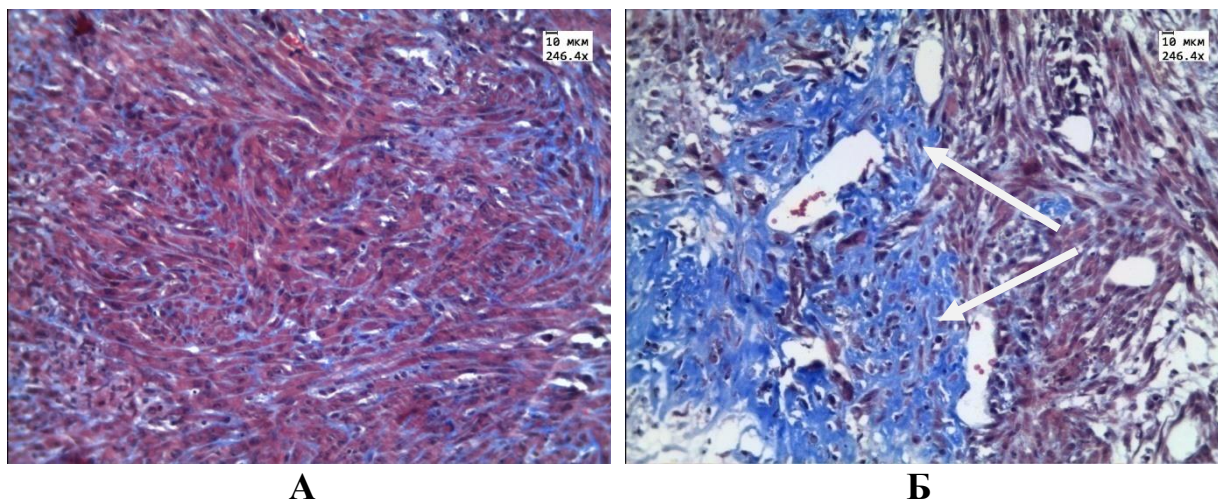


Рисунок 80. Гистологическое строение саркомы 45. Окраска ОКГ. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения – гистиоидный тип опухоли; Б – при пероральном введении экстракта аврана – склероз стромы опухоли.

При окраске саркомы 45 метиловым зеленым - пиронином по Браше отмечали высокий уровень РНК в ядрах клеток саркомы 45 группы сравнения (красный цвет) и явное снижение экспрессии ядерной РНК или ее отсутствие в клетках опухоли как в группе перорального, так и внутримышечного путей введения экстракта, что, скорее всего, свидетельствовало об уменьшении ее транскрипционной активности или разрушении РНК (Рисунок 81). Яркое окрашивание ядер сохранялось только в немногочисленных клетках под капсулой опухоли.

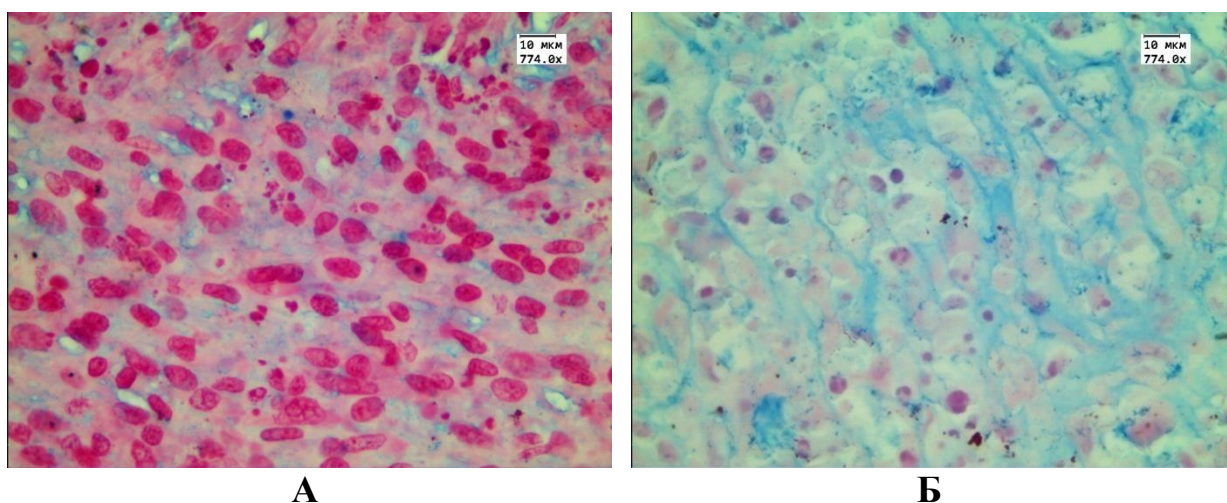


Рисунок 81. Саркома 45. Окраска ДНК и РНК метиловым зеленым - пиронином по Браше. Ув. 774. Группы: А – сравнения – красное окрашивание ядра; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – резкое снижение интенсивности окраски на ДНК.

При гистохимической окраске саркомы 45 лектином зародышей пшеницы WGA в группе сравнения была отрицательная экспрессия. При внутримышечном и пероральном введении экстракта аврана лектин WGA давал положительную реакцию (Рисунок 82) (связывается с N-ацетил-D-глюкозамином и N-ацетил-нейраминовой кислотой). Как мы уже указывали выше, экспрессия сиаловой кислоты создавала отрицательный заряд на поверхности мембран клеток и приводила к их отталкиванию. Морфологически это проявлялось появлением больших пространств между клетками.

При иммуногистохимическом исследовании саркомы 45 в экспериментальной группе при обоих путях введения экстракта аврана маркер пролиферации Ki67 давал очень слабую экспрессию – индекс пролиферации при внутримышечном пути введения составил 1% и при пероральном пути – 9%, хотя в группе сравнения без воздействия экстрактов индекс пролиферации составил 56%, причем больше половины клеток в поле зрения давали выраженную экспрессию (Таблица 26, Рисунок 83).

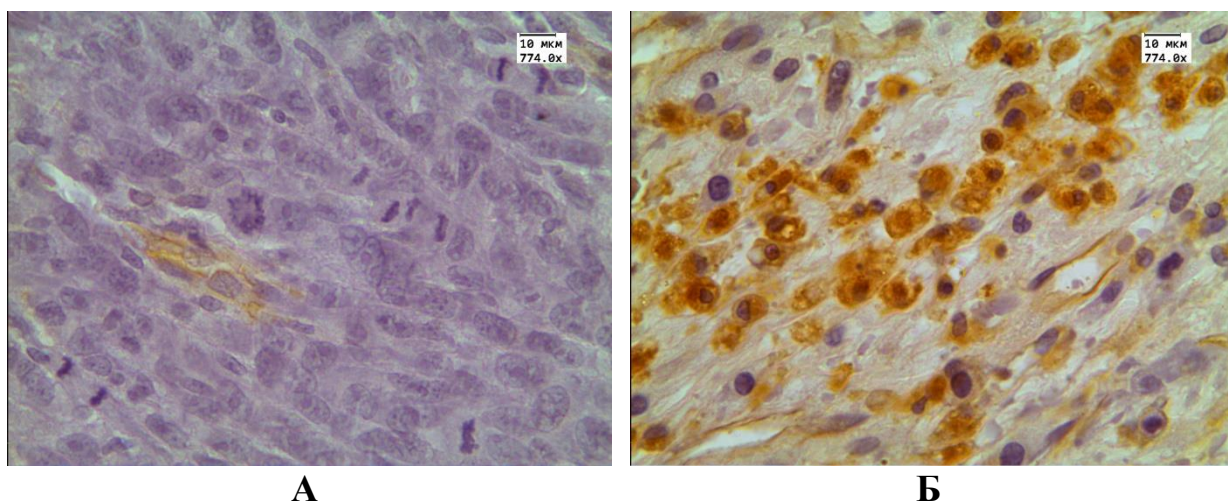
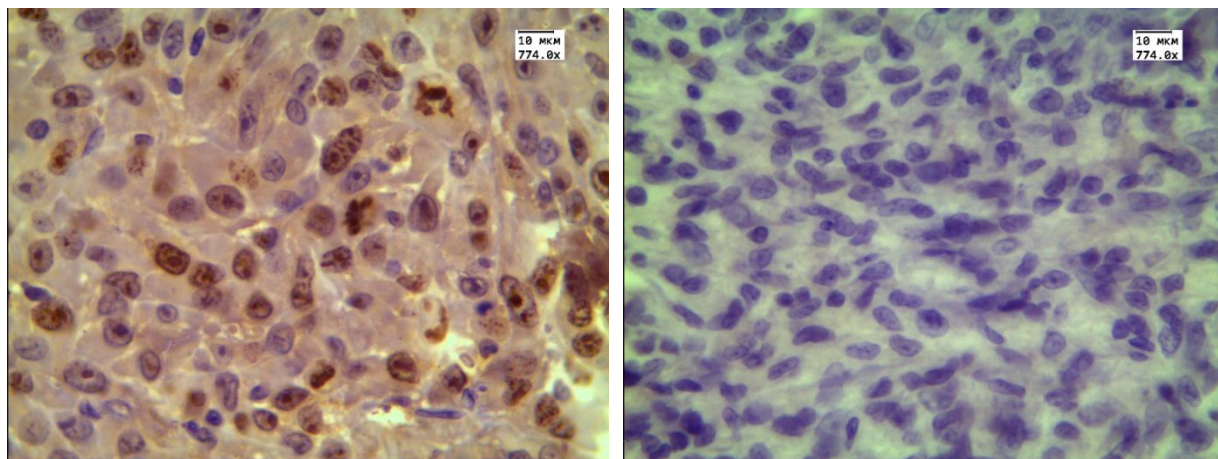


Рисунок 82. Саркома 45. Гистохимическая окраска лектином зародышей пшеницы WGA. Ув. 774. Группы: А – сравнения – отсутствие экспрессии, большое количество митозов; Б – при пероральном введении экстракта аврана – положительная реакция с WGA (коричневое окрашивание).

При иммуногистохимической окраске с маркером EGFR в группе сравнения отмечали умеренную, но распространенную цитоплазматическую экспрессию рецептора эпидермального фактора роста. Известно, что данный маркер является характерным для клеток эпителиального происхождения, но в последнее время в литературе стали появляться данные о возможности экспрессии данного маркера в мезенхимальных опухолях. Более того, появились рекомендации по использованию противоопухолевых препаратов, блокирующих рецептор EGFR при лечении некоторых форм сарком (Горбунова В.А., 2012). Под действием экстракта аврана как при внутримышечном, так и пероральном путях его введения экспрессия была

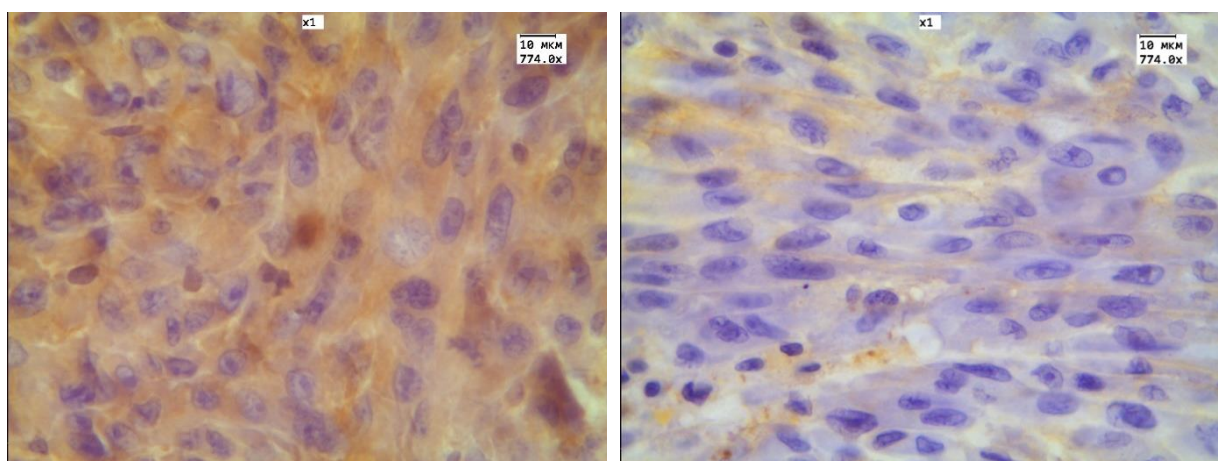
единичная и очень слабая (Рисунок 84), что говорит о блокировании этого рецептора и, следовательно, о снижении злокачественного потенциала, так как данный рецептор может стимулировать ангиогенез и блокировать развитие апоптоза (Тюляндин С.А., Носов Д.А., 2012).



А

Б

Рисунок 83. Саркома 45. Иммуногистохимическая реакция с антителом Ki67 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженная экспрессия; Б – при внутримышечном пути введения экстракта аврана – отсутствие экспрессии.



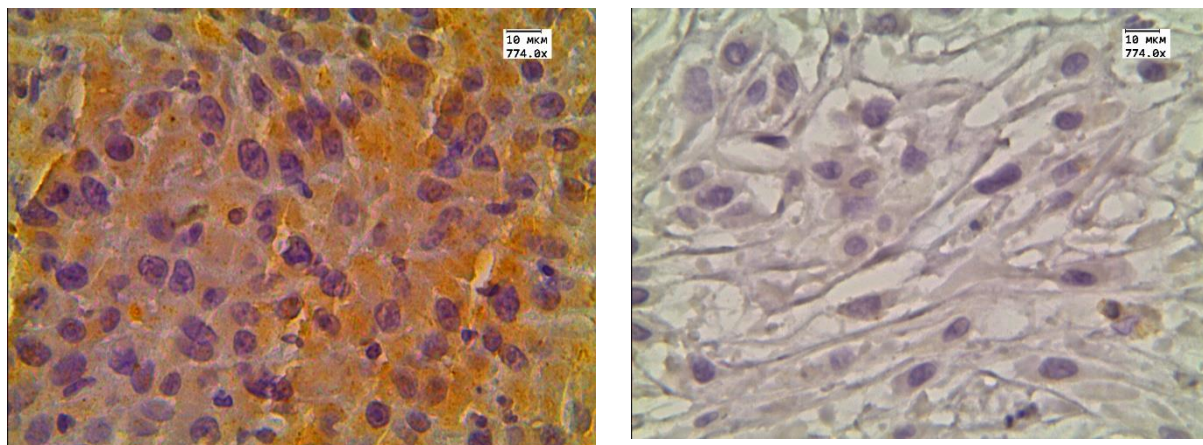
А

Б

Рисунок 84. Саркома 45. Иммуногистохимическая реакция с антителом EGFR и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженная экспрессия; Б – при внутримышечном пути введения экстракта аврана – резкое снижение экспрессии маркера.

При оценке экспрессии иммуногистохимического маркера ангиогенеза VEGF в ткани саркомы 45 группы сравнения наблюдали умеренную цитоплазматическую экспрессию маркера. При внутримышечном введении

экстракта аврана экспрессия данного маркера в опухоли отсутствовала на конец эксперимента, однако при пероральном пути введения экстракта в зоне повреждения опухоли отмечали очаговую и слабую экспрессию маркера ангиогенеза VEGF (Рисунок 85).



**А**

**Б**

Рисунок 85. Саркома 45. Иммуногистохимическая реакция с антителом VEGF и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженная экспрессия; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – отсутствие экспрессии маркера.

При окраске на маркер апоптоза p53 выявили отсутствие экспрессии в группе сравнения, а после введения экстракта аврана отмечали появление в клетках опухоли, умеренной как цитоплазматической, так и ядерной экспрессии маркера апоптоза p53. Данная реакция была наиболее выражена в клетках с более конденсированным хроматином. При внутримышечном введении экстракта наблюдали выраженную экспрессию в 69%, а при пероральном пути введения слабую экспрессию в 39% клетках (Таблица 26, Рисунок 86).

При иммуногистохимическом окрашивании на цитоплазматический маркер активации апоптоза Вах в клетках саркомы 45 в группе сравнения наблюдали отрицательную реакцию (Рисунок 87), так же, как и при пероральном пути введения экстракта аврана.

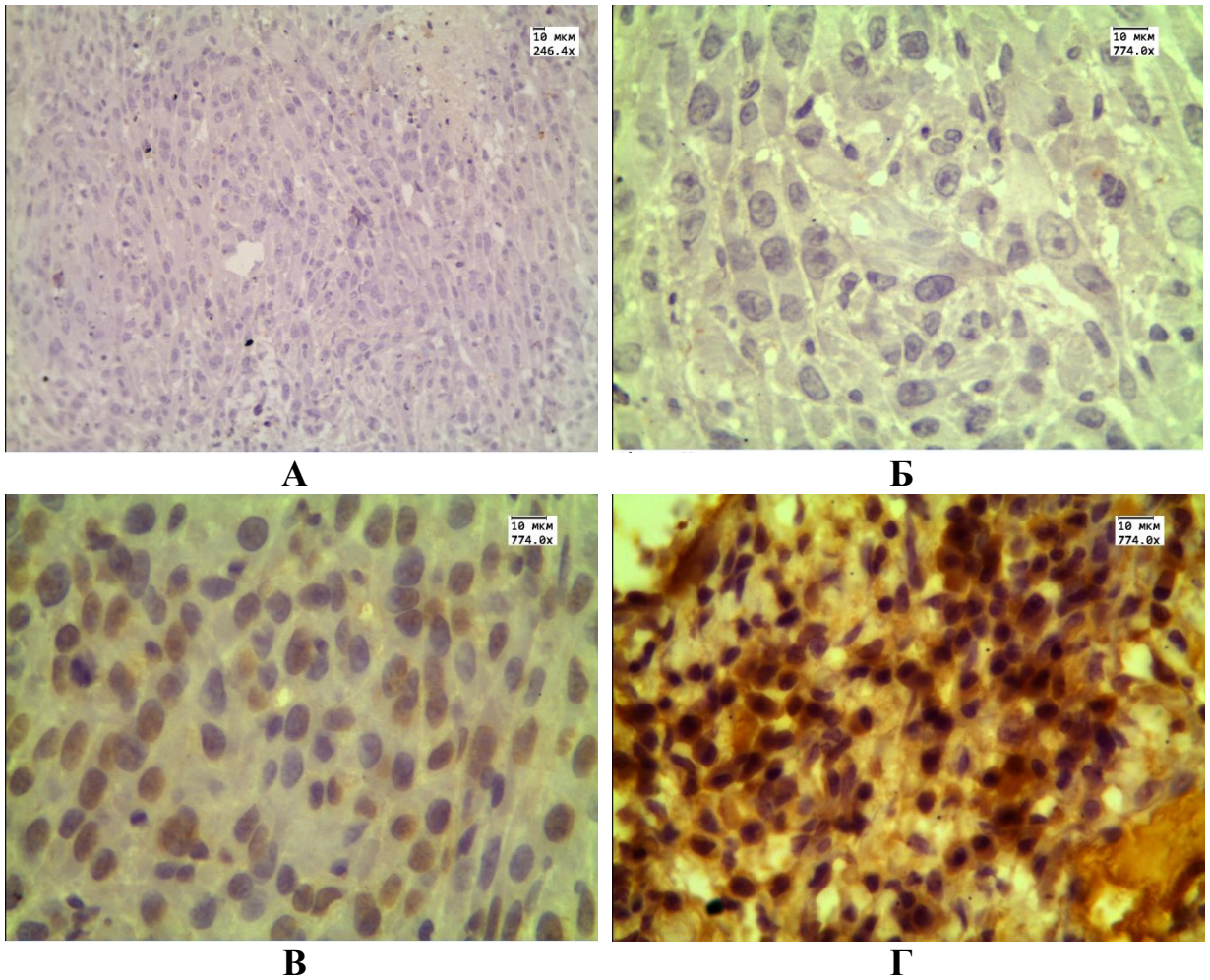


Рисунок 86. Саркома 45. Иммуногистохимическая реакция с антителом р53 и докрашиванием ядер гематоксилином: А – ув. 246; Б, В, Г – ув. 774. Группы: А, Б – сравнения – отрицательная экспрессия; В – при пероральном введении экстракта аврана – положительная экспрессия; Г – при внутримышечном введении экстракта аврана – положительная экспрессия.

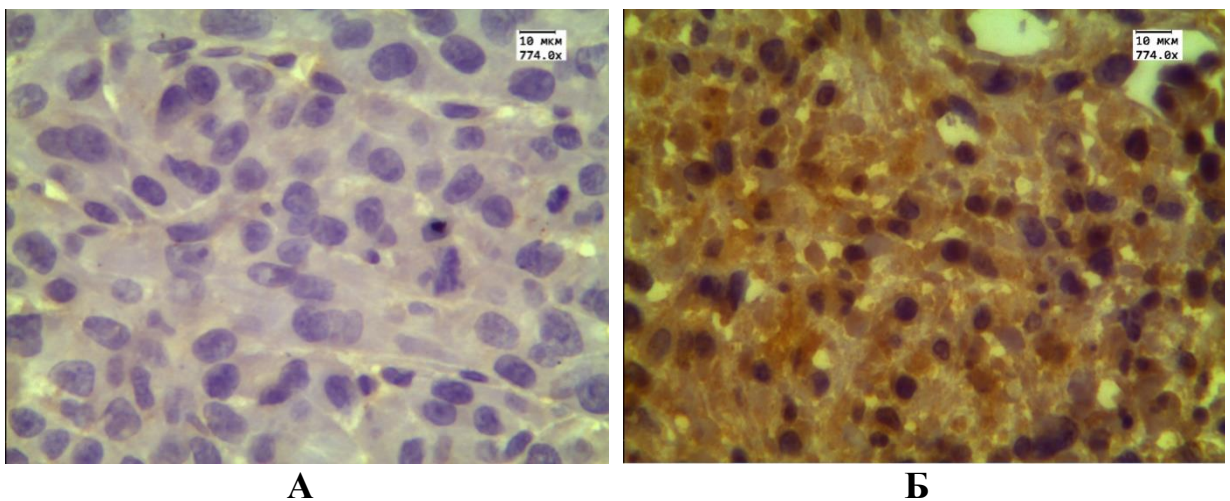


Рисунок 87. Саркома 45. Иммуногистохимическая реакция с антителом Вах и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – отсутствие экспрессии; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – положительная экспрессия маркера.

При внутримышечном пути введения отмечали слабую и умеренную экспрессию маркера активации апоптоза более чем в 90% клеток. Кроме того, экспрессия данного маркера при внутримышечном пути введения наблюдалась в уже погибших клетках, что может быть подтверждением того, что они погибали путем апоптоза (Таблица 26, Рисунок 87).

Однако при иммуногистохимическом окрашивании на маркер Bcl-2, отвечающего за блокирование апоптоза, наблюдали отрицательную экспрессию как в группе сравнения, так и после воздействия экстрактом. Возможно, для саркомы 45 не характерна экспрессия данного гена, и под действием экстракта не происходит его активация.

При иммуногистохимическом окрашивании на маркеры апоптоза CD95 (Fas/APO-1) и Fas-ligand в клетках саркомы 45 в группе сравнения отмечали отрицательную реакцию. В экспериментальных группах как с внутримышечным, так и пероральным введением экстракта аврана наблюдали выраженную цитоплазматическую экспрессию данных маркеров (Рисунки 88, 89). То есть при взаимодействии рецептора Fas/APO-1 с Fas-ligand после связывания с металлопротеиназой Fas-лиганд превращается в растворимую форму и может активировать апоптоз в клетках (Zhang X., 2005).

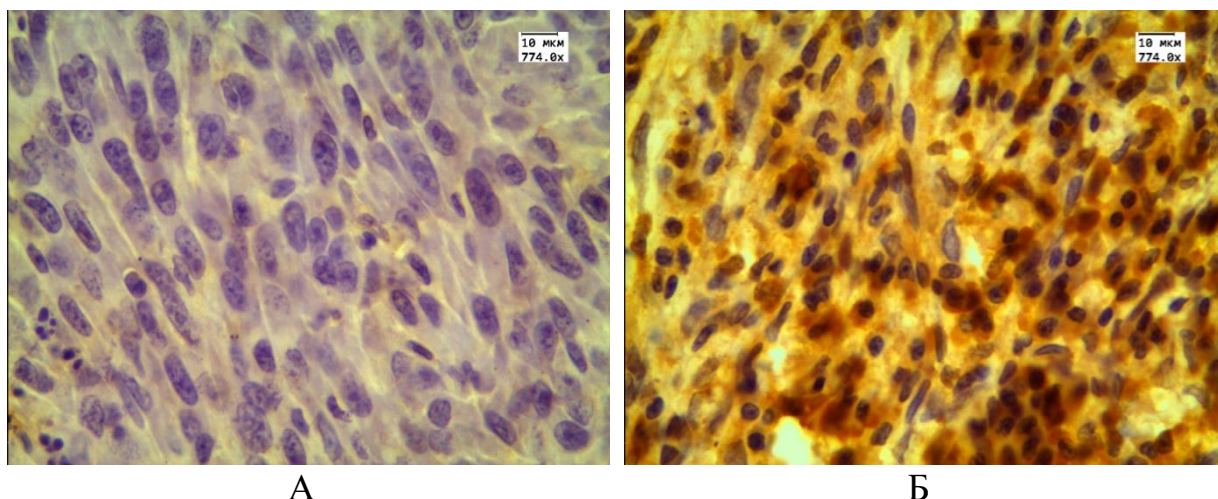


Рисунок 88. Саркома 45. Иммуногистохимическая реакция с антителом CD95 (Fas/APO-1) и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – отрицательная экспрессия маркера; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – выраженная экспрессия.

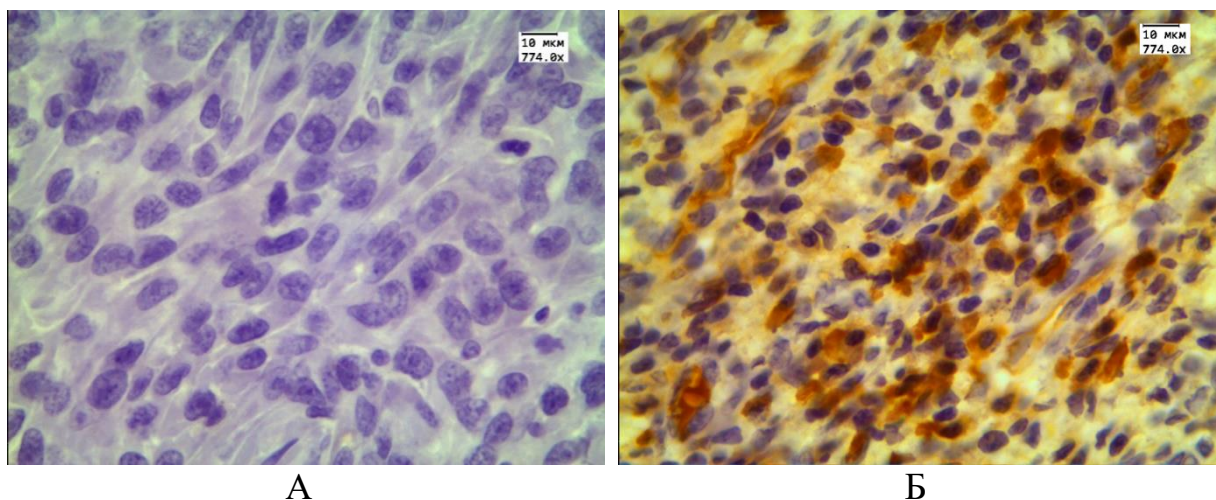


Рисунок 89. Саркома 45. Иммуногистохимическая реакция с антителом Fas-ligand и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – отрицательная экспрессия; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – выраженная экспрессия.

При иммуногистохимическом окрашивании маркером аутофагии LC3В в клетках саркомы 45 группы сравнения не отмечали положительной экспрессии, так же, как и при внутримышечном введении экстракта аврана. Только при пероральном введении наблюдали появление слабой очаговой экспрессии маркера (Рисунок 90). По-видимому, данный факт говорит о развитии протекторной аутофагии в отдельных клетках саркомы как защитной реакции на повреждающее воздействие.

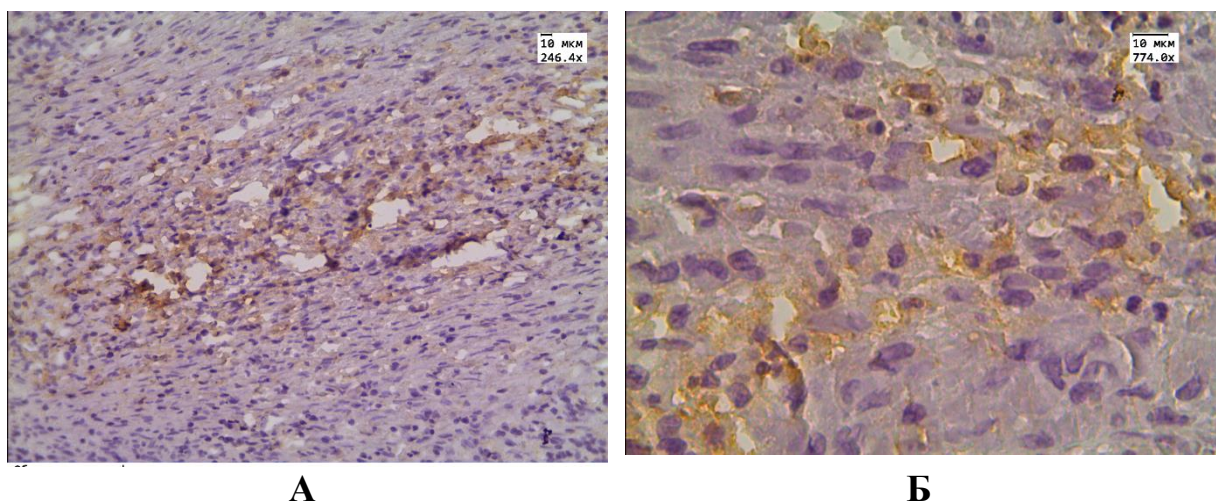


Рисунок 90. Саркома 45. Положительная реакция при иммуногистохимической реакции с антителом LC3В и докрасиванием ядер гематоксилином в экспериментальной группе с пероральным путем введения экстракта аврана. А – ув. 246; Б – ув. 774.

Обусловлено это пероральным путем введения и недостаточной концентрацией экстракта, поступающего к клеткам опухоли, по сравнению с внутримышечным путем введения, обеспечивающим более высокие концентрации экстракта и блокировку протекторной аутофагии.

Таблица 26 – Экспрессия иммуногистохимических маркеров в группе сравнения и экспериментальных группах под действием экстракта аврана

| Маркер<br>(% + экспресс. клеток)                                               | Группы                                 | Сравнения | В/м введение<br>экстракта<br>аврана   | Пероральное<br>введение<br>экстракта<br>аврана |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------|---------------------------------------|------------------------------------------------|
|                                                                                | Медиана; (квартиль 25 - 75); [min-max] |           |                                       |                                                |
| <b>Индекс пролиферации (Ki67)</b>                                              | 56<br>(47-62)<br>[44-63]+++            |           | <b>1±0,4*</b><br>(0-2)<br>[0-3]+      | <b>9±0,1*</b><br>(5-15)<br>[3-16]+             |
| <b>Маркер EGFR</b>                                                             | 92<br>(75-96)<br>[70-97]++             |           | <b>0*</b>                             | <b>0*</b>                                      |
| <b>Маркер ангиогенеза VEGF</b>                                                 | 85<br>(72-89)<br>[65-92]++             |           | <b>0*</b>                             | <b>5</b><br>(3-6)<br>[2-11]+                   |
| <b>Маркер аутофагии LC3B</b>                                                   | 0                                      |           | 0                                     | <b>11</b><br>(8-15)<br>[6-19]+                 |
| <b>Маркеры активации и блокирования апоптоза</b>                               |                                        |           |                                       |                                                |
| <b>Маркер p53</b>                                                              | 0                                      |           | <b>67*</b><br>(51-81)<br>[49-86]+++   | <b>36*</b><br>(32-43)<br>[31-46]+              |
| <b>Bcl-2</b>                                                                   | 0                                      |           | <b>0</b>                              | 0                                              |
| <b>Бах – проапоптотический белок митохондриального пути активации апоптоза</b> | 0                                      |           | <b>44,7*</b><br>(40-51)<br>[39-53]++  | <b>41,6*</b><br>(37-50)<br>[30-52]++           |
| <b>CD95 (Fas/APO-1)</b>                                                        | 0                                      |           | <b>40,3*</b><br>(31-42)<br>[30-45]+++ | <b>38,7*</b><br>(31-48)<br>[29-49]+++          |
| <b>Fas-ligand</b>                                                              | 0                                      |           | <b>67*</b><br>(51-81)<br>[49-86]+++   | <b>36*</b><br>(32-43)<br>[31-46]+              |

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  достоверные различия определяли с помощью критерия Манна-Уитни при сравнении значений опытной группы и группы сравнения.

+, ++, +++ - степень выраженности экспрессии (слабая, умеренная и выраженная).

### 6.3. Макро- и микроскопические изменения внутренних органов при введении экстракта аврана

При проведении анализа нами было установлено, что индекс органов К для сердца, легких и почек достоверно не изменяется как при пероральном, так и внутримышечном способах введения экстракта аврана (Таблица 27).

Однако мы наблюдали уменьшение коэффициента К ( $m_{\text{органа}}/m_{\text{животного}} \cdot 100$ ) для печени при пероральном введении экстракта аврана на 9% ( $T > 1.96$ ), а при внутримышечном – на 7% ( $T > 1.96$ ) по сравнению с группой сравнения (Таблица 27).

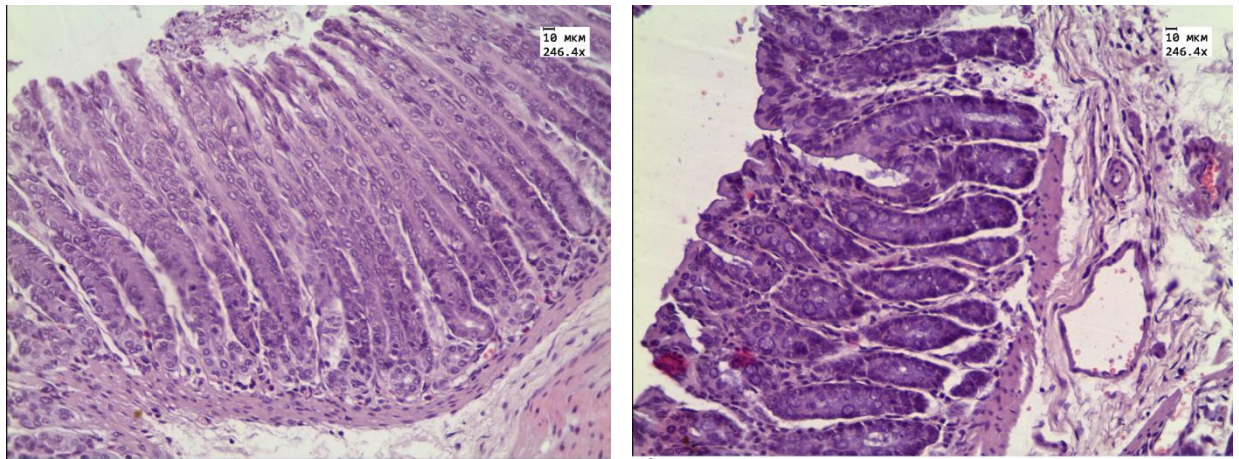
При оценке коэффициента К для селезенки отмечали его увеличение в отличие от группы сравнения при пероральном пути введения на 46% ( $T > 1.96$ ), и на 42% при внутримышечном пути введения ( $T > 1.96$ ), что, вероятно, можно расценить как иммуностимулирующий эффект (Таблица 27).

Таблица 27 – Коэффициент К для различных органов у животных с саркомой 45

| Группы<br>Индекс К | Сравнения | В/м введение<br>экстракта аврана | Пероральное введение<br>экстракта аврана |
|--------------------|-----------|----------------------------------|------------------------------------------|
| Сердце             | 0,45±0,03 | 0,50±0,03                        | 0,45±0,01                                |
| Легкие             | 0,93±0,06 | 0,95±0,08                        | 0,88±0,38                                |
| Печень             | 6,31±0,14 | <b>5,88±0,34 *</b>               | 5,76±0,31                                |
| Почки              | 0,45±0,02 | 0,49±0,02                        | 0,48±0,02                                |
| Селезенка          | 0,45±0,07 | <b>0,64±0,05 *</b>               | <b>0,66±0,1 *</b>                        |

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  и  $T > 1.96$  достоверность различий определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча при сравнении значений опытной группы и группы сравнения.

При пероральном пути введения в пищеводе, желудке и кишечнике морфологических изменений в отличие от группы сравнения не было выявлено, отмечали нормальное строение слизистого и подслизистого слоев (Рисунок 91). При внутримышечном пути введения экстракта аврана в месте инъекции (в мышце бедра) определяли отек, участки диапедезных кровоизлияний, у ряда животных определяли инфильтрацию лейкоцитами.



А

Б

Рисунок 91. Нормальное микроскопическое строение слизистой желудка (А) и толстого кишечника (Б) при пероральном пути введения экстракта аврана лекарственного. Окраска гематоксилином и эозином.

Ув. 246,4.

В поджелудочной железе животных группы сравнения наблюдали нормальное строение желез, встречались островки Лангерганса площадью до  $0,017 \text{ мм}^2$ , умеренное полнокровие кровеносных сосудов. При введении экстракта аврана не отмечали появления патологических изменений в ткани поджелудочной железы.

В печени животных группы сравнения наблюдали выраженное полнокровие крупных кровеносных сосудов, особенно венозных, также полнокровие синусоидов, выраженную тотальную дистрофию вплоть до некроза гепатоцитов, количество двуядерных гепатоцитов не превышало одного в поле зрения. На фоне введения экстракта аврана отмечали умеренное полнокровие крупных сосудов и синусоидов. Дистрофия гепатоцитов была выражена, но в меньшей степени, чем в группе сравнения, встречались двуядерные гепатоциты – 1-2 в поле зрения. При этом ядра были равномерно базофильно окрашены. При гистологическом обзорном описании разницы между путями введения не обнаружили, хотя обращали на себя внимание более выраженные дистрофические изменения при внутримышечном пути введения.

При анализе среднего количества клеток в поле зрения нами было зафиксировано, что при внутримышечном пути введения экстракта аврана увеличивалось среднее количество гепатоцитов в поле зрения на 49% ( $T > 1.96$ ), а среднее количество всех клеток в поле зрения – на 39% ( $T > 1.96$ ) в отличие от группы сравнения. При пероральном введении экстракта также наблюдали увеличение как среднего количества гепатоцитов на 73% ( $T > 1.96$ ), так и среднего количества всех клеток печени в поле зрения на 56% ( $T > 1.96$ ) относительно группы сравнения (Рисунок 92, Таблица 28).

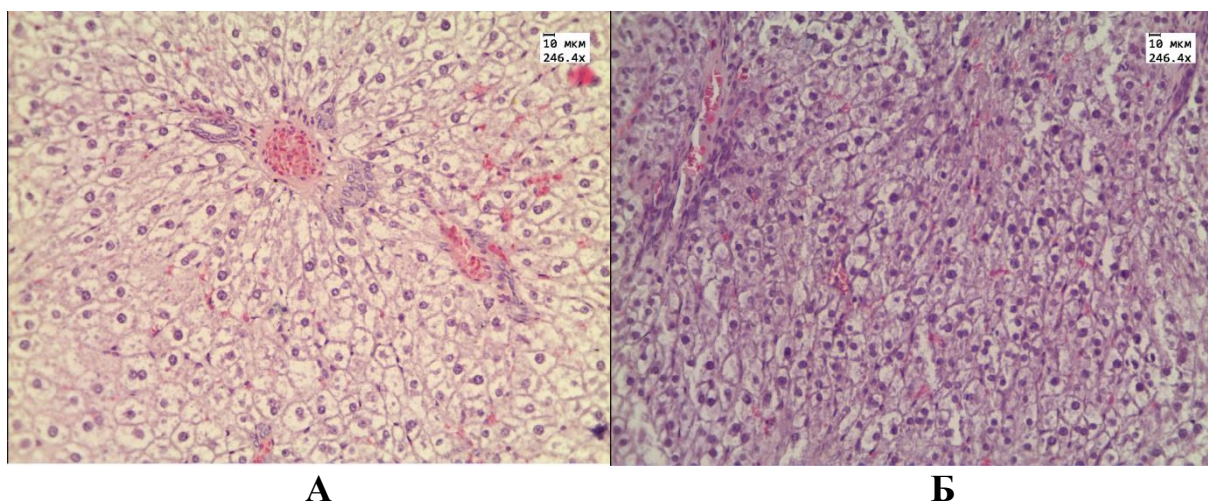


Рисунок 92. Микроскопическое строение печени. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженные дистрофические изменения гепатоцитов; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана – умеренные дистрофические изменения гепатоцитов.

В почках животных группы сравнения с перевитой саркомой 45 наблюдали умеренное полнокровие клубочков и отсутствие просвета между капсулой Шумлянско-Боумена и сосудистым клубочком. Эпителий извитых канальцев был в состоянии дистрофии, просвет практически не определялся, эпителий дистальных канальцев был без изменений. При введении экстракта аврана клубочки были полнокровными, но по площади меньше, чем в группе сравнения, на 13% ( $T > 1.96$ ) при внутримышечном введении, а при пероральном пути введения не отличались значимо от группы сравнения. Обращал на себя внимание некроз единичных клеток эпителия извитых

канальцев почки. При обоих путях введения эпителий дистальных канальцев был без изменений (Рисунок 93).

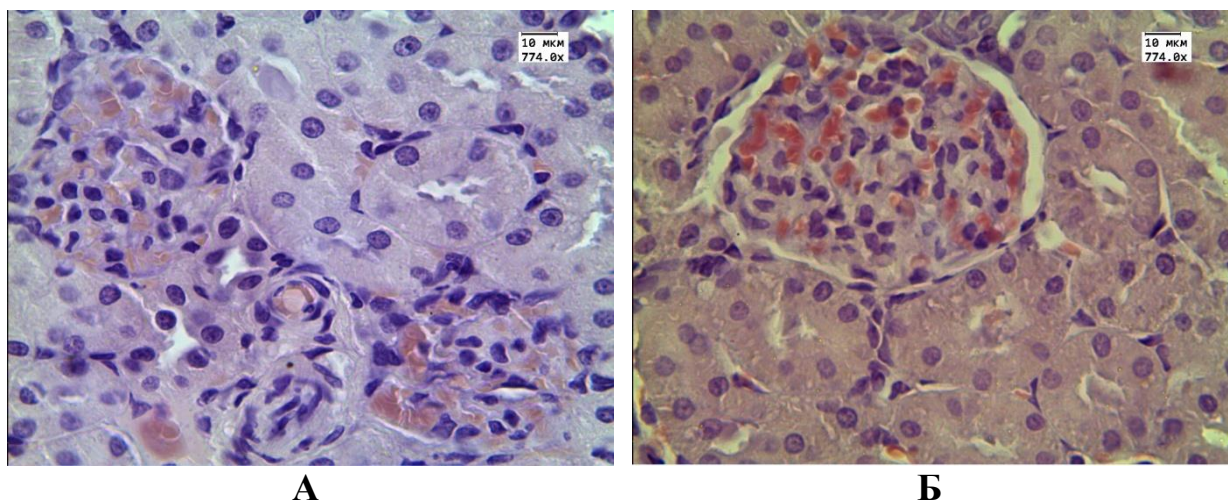


Рисунок 93. Микроскопическое строение почек. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – набухание эпителия извитых канальцев; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана – зернистость цитоплазмы эпителия извитых канальцев.

В группе животных с перевитой саркомой 45, но без воздействия в селезенке отмечали преобладание белой пульпы над красной, границы фолликулов были четкие, также наблюдали отсутствие ярко выраженных светлых центров и мантийной зоны, площадь фолликулов составила  $0,085 \pm 0,01 \text{ мм}^2$ , было выражено полнокровие красной пульпы. При введении экстракта аврана выявили преобладание белой пульпы над красной, полнокровие и более четкие границы фолликулов, чем в группе сравнения. При внутримышечном и пероральном путях введения также отмечали достоверное увеличение площади фолликулов в 2,3 раза и 2,1 раза соответственно ( $T > 1.96$ ), светлые центры в них были хорошо выражены, их площадь составила  $0,034 \text{ мм}^2$  при внутримышечном и  $0,01 \text{ мм}^2$  при пероральном путях введения (Таблица 28, Рисунок 94).

В головном мозге животных группы сравнения с перевиваемой саркомой 45 наблюдали умеренное полнокровие сосудов, участки очаговых кровоизлияний. При внутримышечном введении экстракта аврана отмечали слабо выраженный перещеллюлярный отек вещества головного мозга, при

пероральном введении выявили только умеренное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла (Рисунок 95).

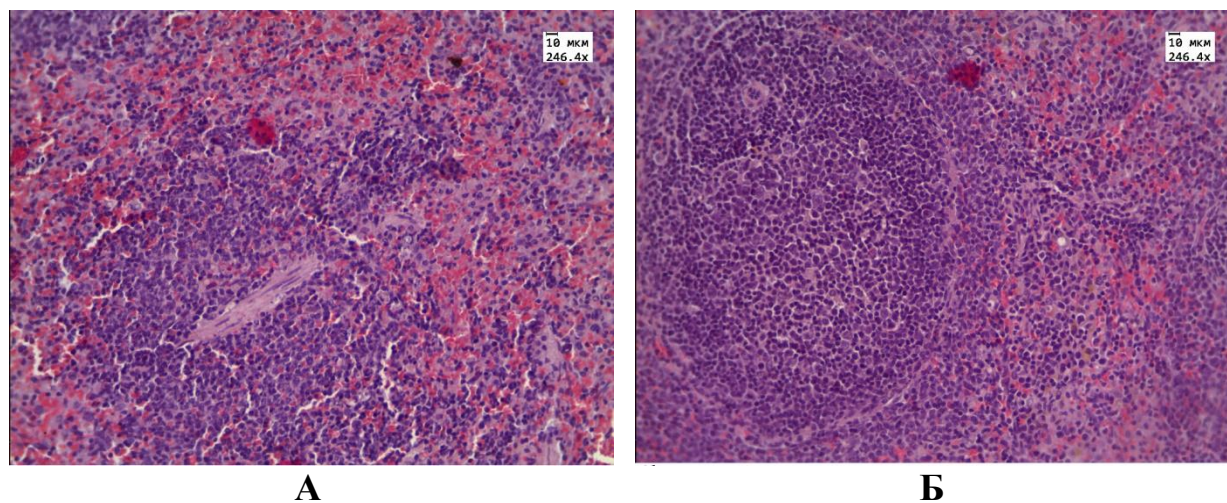


Рисунок 94. Микроскопическое строение селезенки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения – размытые границы между пульпой; Б – при пероральном введении экстракта аврана – гиперплазия фолликулов.

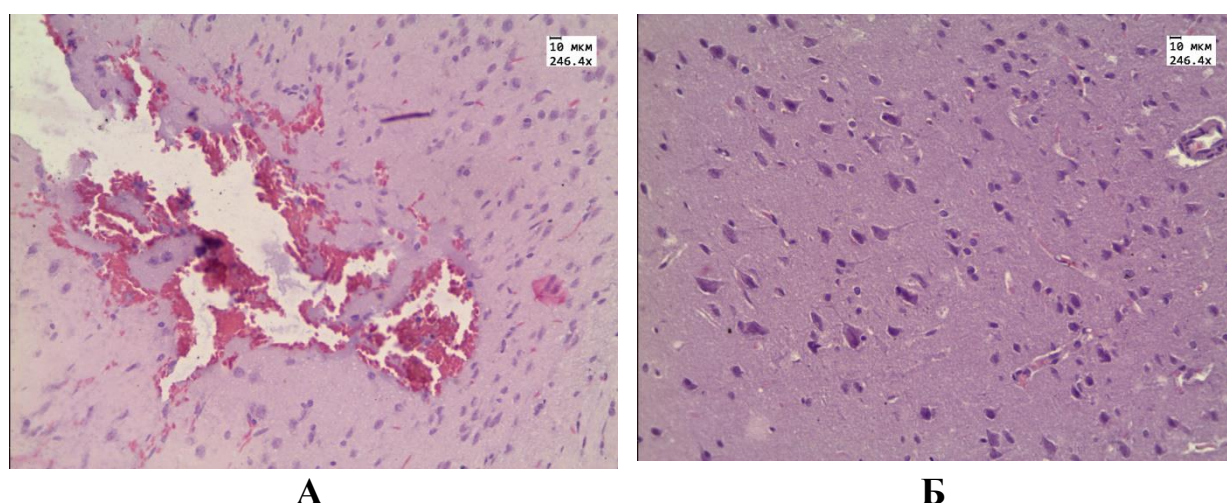
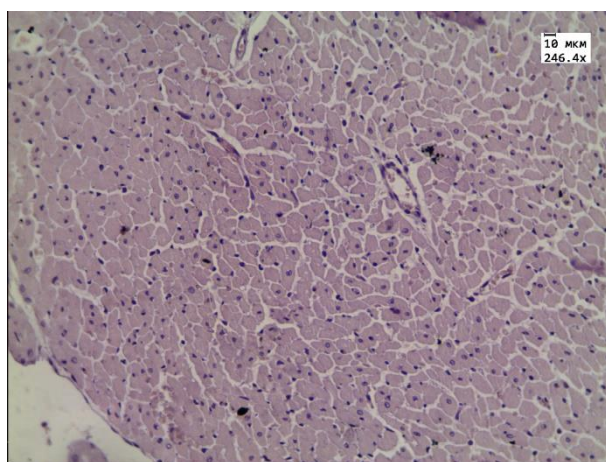


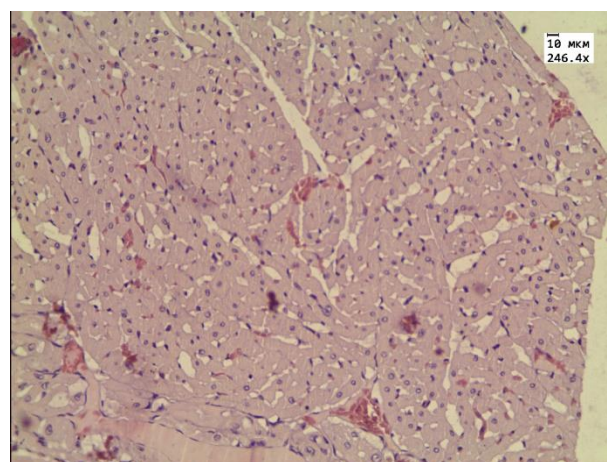
Рисунок 95. Микроскопическое строение головного мозга крыс. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения – кровоизлияние; Б – при пероральном введении экстракта аврана лекарственного – нормальное строение.

В миокарде группы сравнения с перевитой саркомой 45 развивался умеренный отек стромы, дистрофию и некроз единичных кардиомиоцитов. После введения экстракта аврана, как внутримышечно, так и перорально, отмечали умеренное полнокровие кровеносных сосудов и отек стромы миокарда (Рисунок 96).

В легких группы сравнения просвет альвеол был свободный, хотя межальвеолярные перегородки были утолщены и полнокровны, перибронхиальные лимфоузлы до  $0,043 \pm 0,006 \text{ мм}^2$ . При введении экстракта аврана не отмечали значимых патоморфологических изменений в легких. При морфометрии перибронхиальных лимфоузлов наблюдали их увеличение в группе животных с внутримышечным путем введения экстракта на 102% ( $T > 1.96$ ) и на 60% ( $T > 1.96$ ) – при пероральном пути введения (Таблица 28, Рисунок 97).

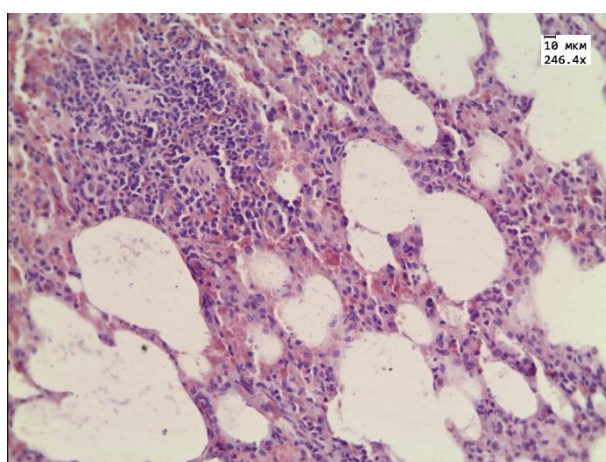


**А**

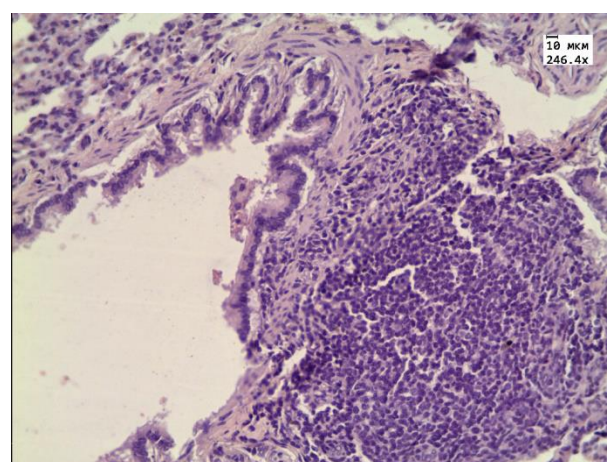


**Б**

Рисунок 96. Отек стромы миокарда. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана.



**А**



**Б**

Рисунок 97. Микроскопическое строение легких. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения – утолщение межальвеолярных перегородок; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана – гиперплазия лимфоидной ткани.

В семенниках животных группы сравнения отмечали нормальное строение, сперматогенный эпителий на разных стадиях созревания. На фоне введения экстракта аврана отмечали появление крупных клеток в просвете канальцев.

Таблица 28 – Морфометрические показатели во внутренних органах у животных с перевитой саркомой

| Показатель                      | Группы                                  |                              |                  |
|---------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|------------------|
|                                 | Группа<br>сравнения, без<br>воздействия | С введением экстракта аврана |                  |
|                                 |                                         | Внутримышечно                | Перорально       |
| Селезенка                       |                                         |                              |                  |
| S фолликуловмм <sup>2</sup>     | 0,085±0,01                              | 0,199±0,021*                 | 0,184±0,014*     |
| Печень                          |                                         |                              |                  |
| Гепатоциты (ср.<br>кол. в п/зр) | 27±<br>1,2                              | 38,8±<br>1,4*                | 45,1±<br>1,2*    |
| Купфера (ср. кол.<br>в п/зр)    | 7±<br>0,4                               | 8,5±<br>0,5*                 | 8,5±<br>0,7*     |
| Лимфоциты (ср.<br>кол. в п/зр)  | 0,5±<br>0,1                             | 0,7±<br>0,1*                 | 0,7±<br>0,1*     |
| Общее кол-во кл.<br>в п/зр      | 34,5±<br>1,1                            | 48±<br>1,2*                  | 54±<br>1,6*      |
| Легкие                          |                                         |                              |                  |
| S перибронх.<br>фолликула       | 0,043±<br>0,006                         | 0,087±<br>0,004*             | 0,069±<br>0,011* |
| Почки                           |                                         |                              |                  |
| S клубочка                      | 0,0043±0,0001                           | 0,0037±0,0001*               | 0,0044±0,0001    |
| Высота эпит.<br>извит. канальца | 0,014±<br>0,0003                        | 0,013±<br>0,0004             | 0,014±<br>0,0003 |

Примечание: \* – при  $p < 0.5$  и  $T > 1.96$  достоверность различий определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча при сравнении значений опытной группы и группы сравнения.

\*\*\*

Экстракт аврана лекарственного на протяжении всего эксперимента снижал темпы роста перевитой саркомы 45. Индекс торможения опухоли по массе в среднем составил 70,6%, причем при внутримышечном пути введения процесс торможения роста опухоли был более выражен, чем при пероральном пути введения. Экстракт вызывал выраженные изменения в клетках саркомы 45 в виде дистрофии и некроза, уменьшения общего количества клеток, размеров ядра и самой клетки, при этом клетки приобретали более округлую

форму, теряли между собой контакты, что свидетельствовало как об атрофических изменениях в опухоли, так и, по мнению ряда авторов (Guo K., Kang N.X., 2009), гибели этих клеток путем апоптоза. Клетки теряли связи между собой, возможно, из-за появления на их мембранах отрицательного заряда, который придавали сialовые кислоты. Окраска ОКГ подтвердила начинающийся фиброз опухоли под действием экстракта. При этом обращал на себя внимание тот факт, что развивался фиброз стромы опухоли.

Кроме того, наблюдалось резкое снижение количества митозов и уменьшение экспрессии ядерной РНК, что свидетельствовало о блокировке синтетических процессов на уровне ядра клетки. Подтверждением этому служило также значительное снижение экспрессии маркера пролиферации Ki67 в ткани опухоли после введения экстракта аврана.

После введения экстракта аврана животным в клетках опухоли отмечали появление признаков апоптоза, что подтверждалось морфологическими изменениями (округление формы клеток, уменьшение размеров ядра, клетки и конденсация хроматина), появлением апоптотных телец. Данные признаки согласовывались и с положительной экспрессией маркера p53, что подтверждало активацию программированной гибели в клетках. Все описанные изменения были более выражены при внутримышечном пути введения экстракта в среднем в 1,5-2 раза.

Для саркомы 45 в группе сравнения на 14 день после перевивки была характерна высокая экспрессия маркеров пролиферации Ki67, EGFR, умеренная экспрессия маркера ангиогенеза VEGF и отсутствие экспрессии маркеров активации апоптоза p53, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и маркера блокирования апоптоза Bcl-2, а также маркера аутофагии LC3B. После введения животным экстракта аврана экспрессия изученных маркеров качественно менялась: происходила блокировка экспрессии Ki67, EGFR, VEGF и, наоборот, активация маркеров программированной гибели клеток: апоптоза (p53, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand) и аутофагии (LC3B). Следует отметить, что при внутримышечном введении экстракта аврана экспрессия маркеров апоптоза была выше и отсутствовала экспрессия маркера аутофагии. Обращало на себя внимание, что экспрессия маркеров активации

апоптоза наблюдалась даже в безъядерных погибших клетках. Это позволяет предположить, что обширные поля безъядерных клеток, появляющиеся в опухоли под действием экстракта, формируются путем их гибели не через механизм некроза, а через апоптоз. Это согласуется с низким содержанием продуктов ПОЛ у животных с опухолями на фоне введения экстракта и отсутствием признаков интоксикации у животных, которые должны были бы появиться, если бы в опухоли развивались массивные очаги некроза.

Следовательно, экстракт аврана в дозировке 110 мг/кг является индуктором апоптоза в клетках саркомы 45, причем активация апоптоза осуществляется через рецептор-зависимый сигнальный путь и митохондриальный сигнальный путь. Полученные данные по активности апоптотических белков согласуются друг с другом и подтверждают это обстоятельство.

Кроме того, на примере саркомы 45 было установлено, что экстракт аврана оказывал стойкий антикахексический эффект. Внутримышечное введение было эффективнее перорального и задерживало рост саркомы 45, но менее эффективно способствовало набору массы животных. Возможно, это было обусловлено некротическими изменениями в опухоли, что приводило к более выраженному токсическому эффекту.

В месте введения при пероральном пути введения (желудок, кишечник) не было выявлено патологических изменений. При внутримышечном введении в мышце бедра обнаруживались мелкие диапедезные кровоизлияния, отек и набухание мышечной ткани, в единичных случаях инфильтрация лейкоцитами.

Во внутренних органах, в первую очередь в печени, почках, а также миокарде и головном мозге из-за роста опухоли, ее самопроизвольного распада, развивались изменения, представленные некрозом, дистрофией, нарушением кровообращения, обусловленные интоксикацией. После введения экстракта аврана степень выраженности дистрофических процессов уменьшалась.

В органах иммуногенеза отмечали реакцию в виде увеличения фолликулов селезенки и появления в них четко оформленных светлых

центров, увеличения массы селезенки, увеличения перибронхиальных лимфатических узлов, что свидетельствовало о возможной стимуляции или активации иммунной системы, за счет чего может реализоваться и противоопухолевый эффект. В других органах у животных с перевитой саркомой 45, в том числе и с высокой пролиферативной активностью (семенники), не выявлено токсического эффекта на фоне введения экстракта.

Таким образом, экстракт аврана лекарственного обладал противоопухолевым действием в отношении саркомы 45, антикахексическим эффектом, стимулировал иммунную систему, не вызывал необратимых изменений в органах. Наиболее эффективным являлся внутримышечный способ введения, что подтверждалось наибольшим уменьшением объема опухоли, увеличением массы животных и выраженными признаками патоморфоза.

## **ГЛАВА 7. ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОПУХОЛИ, ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ПЕРЕВИТЫМ РАКОМ ПЕЧЕНИ РС-1 ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ И ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ ЭКСТРАКТА АВРАНА**

### **7.1. Изменение динамики роста перевитого рака печени РС-1 и дельты массы животных**

При проведении эксперимента на животных с раком печени дизайн эксперимента отличался от предыдущих исследований. В данном эксперименте морфологическое описание опухоли и динамика изменений в органах оценивались не только на конец введения экстракта аврана (в данном случае через 3 недели после перевивки), но и через неделю после окончания введения экстракта.

В группе крыс, получавших внутримышечно экстракт аврана в дозе 110 мг/кг/сутки, замедление темпов роста опухоли начиналось с 7 дня после начала введения экстракта. Через 14 дней после начала введения экстракта опухоль стала меньше ( $Z > 2$ ) на 74% ( $0,49 \pm 0,31 \text{ см}^3$ ), чем в группе сравнения ( $2,63 \pm 1,35 \text{ см}^3$ ). Далее темпы роста опухоли при внутримышечном введении экстракта аврана еще больше замедлялись, и через три недели опухоль стала меньше ( $Z > 2$ ) на 84% ( $0,96 \pm 0,52 \text{ см}^3$ ), в отличие от группы сравнения ( $5,96 \pm 2 \text{ см}^3$ ). Через три недели от начала эксперимента экстракт вводить перестали, и к концу эксперимента разница между группой сравнения и группой, получавшей экстракт аврана, уменьшилась. На момент окончания эксперимента ИТРО составил 73% при внутримышечном введении, а объем опухоли –  $3,8 \pm 2,13 \text{ см}^3$ , в то время как в группе сравнения объем опухоли был  $14,48 \pm 2,1 \text{ см}^3$  (Рисунок 98). У двух животных из десяти на фоне внутримышечного введения экстракта аврана опухоль так и не развилась на протяжении всего эксперимента.

В группе крыс, получавших экстракт аврана перорально в дозе 110 мг/кг/сутки, было установлено статистически значимое замедление темпа роста опухоли, начиная с 24 дня после начала введения экстракта. Начиная с

26 дня при пероральном введении экстракта, опухоль становилась меньше на 61% ( $Z > 2$ ) ( $4,9 \pm 2 \text{ см}^3$ ), чем в группе сравнения ( $12,59 \pm 2,3 \text{ см}^3$ ). На момент окончания эксперимента ИТРО при пероральном введении составил 65%, а объем опухоли  $7,7 \pm 1,5 \text{ см}^3$  (Таблица 29).

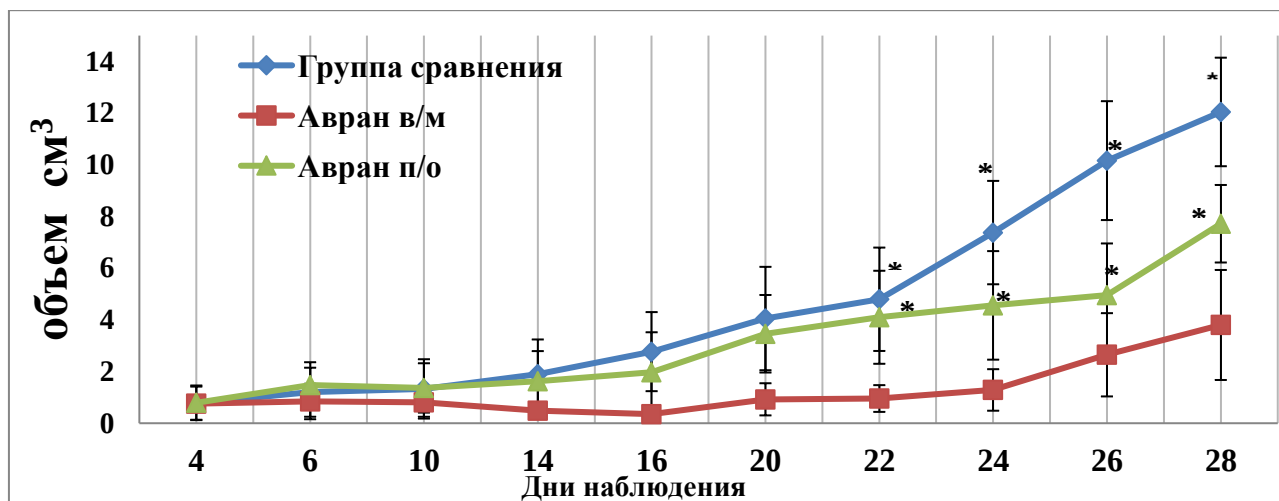


Рисунок 98. Динамика роста объема перевитого рака печени РС-1в группе сравнения и в группах с пероральным и внутримышечным введением экстракта аврана.

Примечание: \* - значимые различия определяли с помощью критерия Манна-Уитни при анализе значений медиан экспериментальных групп и группы сравнения при  $p < 0.05$  и  $z > 2$ .

Таблица 29 – Средняя масса опухоли и индекс торможения роста опухоли на конец эксперимента

| Группа \ Показатель                      | Средняя масса опухоли на конец эксперимента г ( $M \pm \delta$ ) | ИТРО по V на 22 день | ИТРО по V на 28 день |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Группа сравнения                         | $11,69 \pm 0,63$                                                 | -                    | -                    |
| Внутримышечное введение экстракта аврана | $3,9 \pm 2,1^*$                                                  | 84 %                 | 67 %                 |
| Пероральное введение экстракта аврана    | $4,1 \pm 1,5^*$                                                  | 31 %                 | 65 %                 |

Примечание: \*  $T > 1.96$  достоверность различий определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча более 95% при анализе значений экспериментальных групп и группы сравнения.

При оценке динамики дельты истинной массы тела животных в группе сравнения животных с раком печени РС-1 отмечали тенденцию к развитию опухолевой кахексии, начиная с третьей недели эксперимента. К концу эксперимента животные без воздействия потеряли в среднем 7% массы тела.

Как при пероральном, так и внутримышечном введении экстракта аврана наблюдали стабильные показатели массы тела, животные начали набирать массу к концу первой недели, далее колебания динамики массы животных были незначительными.

Получены следующие данные: истинная масса тела животных с опухолью в группе с пероральным путем введения экстракта аврана увеличилась на 3,1% относительно массы на момент начала эксперимента (Рисунок 99); истинная масса тела животных с опухолью в группе с внутримышечным путем введения экстракта аврана увеличилась на 7,8% относительно массы на момент начала эксперимента (Рисунок 99).

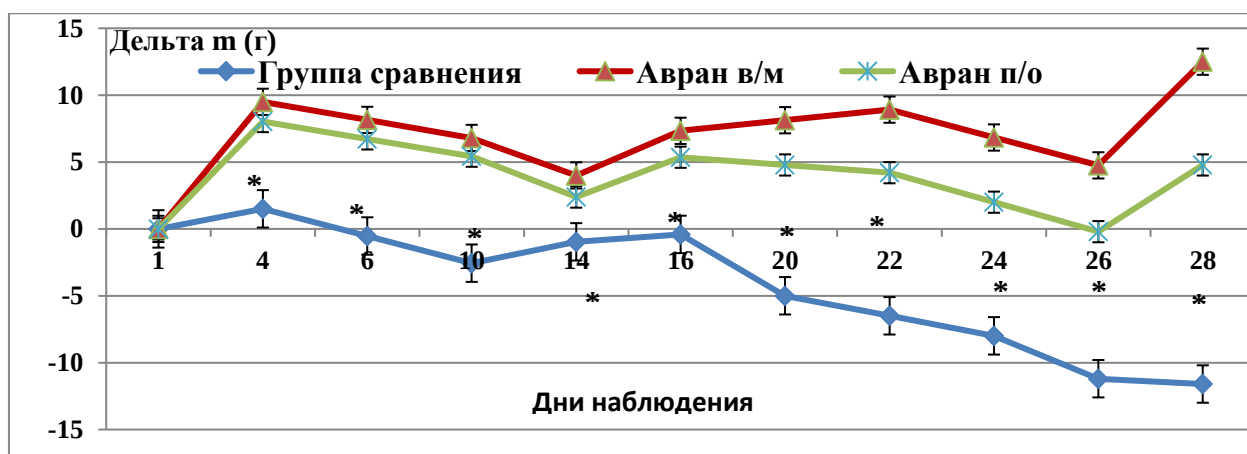


Рисунок 99. Динамика дельты массы тела животных с перевитым раком печени РС-1.

Примечание: \* - значимые различия определяли с помощью критерия Манна-Уитни при анализе значений медиан экспериментальных групп и группы сравнения при  $p < 0.05$  и  $z > 2$ .

## 7.2. Патоморфоз перевитого рака печени РС-1

Перевитый рак печени, растущий из желчных протоков печени крыс, в группе сравнения микроскопически был представлен ячеистыми структурами различной величины, разделенными тонкими прослойками соединительной ткани, состоявшей из коллагеновых волокон и клеточных элементов. Опухолевые клетки овально-округлой формы имели эксцентрично расположенные ядра. Значительная часть цитоплазмы была занята крупными вакуолями, содержащими слизь. В одном и том же поле зрения можно было обнаружить вакуоли различной величины. Клетки с небольшими

эксцентричными вакуолями ядра чаще имели округлую или бобовидную форму. В клетках с крупными вакуолями ядро в цитоплазме было оттеснено к периферии, и такие клетки напоминали по своему строению перстневидные клетки слизистого рака. Выявлены единичные митозы. В небольших очагах некроза, наряду с фрагментами разрушенных клеток, обнаруживали скопления слизистых масс, которые также располагались в межклеточных пространствах (Рисунок 100). Принципиальных отличий в морфологии рака печени РС-1 через 3 и 4 недели после перевивки не обнаружено, обращало на себя внимание только меньшее количество некрозов через 21 день после перевивки.

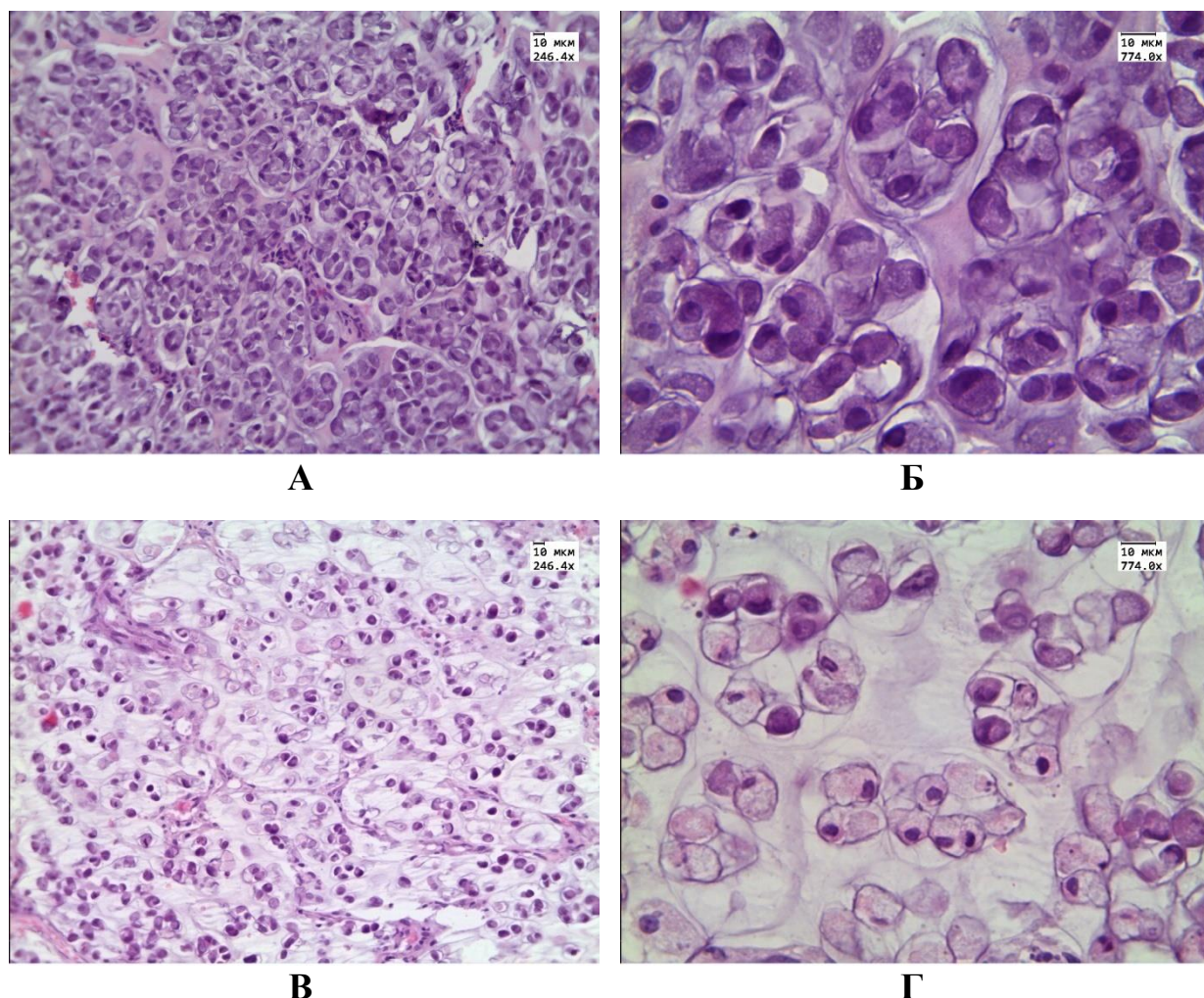


Рисунок 100. Рак печени РС-1. Окраска гематоксилином и эозином. Группы: сравнения – сохранные опухолевые клетки (А – ув. 246,4; Б – ув. 774.); при внутримышечном введении экстракта аврана – дистрофия и некроз опухолевых клеток (В – ув. 246,4; Г – ув. 774.)

В группе крыс, получавших экстракт аврана, как через 3, так и через 4 недели после перевивки опухоль в целом сохраняла строение, описанное в группе сравнения. Однако, в отличие от группы сравнения, в опухоли крыс из группы, получавшей экстракт, наблюдали уменьшение количества слизистого компонента и развитие атрофических и дистрофических изменений опухолевых клеток, о чем свидетельствовало появление «клеток-теней»; в ткани опухоли появились обширные зоны некроза с четкими границами (Рисунок 100 В и Г). Отмечали увеличение и утолщение соединительнотканых перегородок. Наблюдали полное отсутствие митозов. В нескольких случаях встречали апоптотические тельца. Следует отметить, что в группе крыс, получавших экстракт аврана, наиболее выраженный патоморфоз опухоли наблюдали в ее центральных отделах.

При проведении морфометрии определяли снижение среднего числа клеток в поле зрения в 2,2 раза при внутримышечном и в 1,8 раза при пероральном введении аврана, а также увеличение среднего количества клеток в состоянии некроза и некробиоза в поле зрения при обоих путях введения экстракта. Статистически достоверных различий между животными в группах с 3-х и 4-х недельным наблюдением не было (Таблица 30).

Размер диаметра ядра уменьшался при обоих путях введения на 33%, в отличие от группы сравнения. Наблюдали уменьшение среднего диаметра клетки на 21% при внутримышечном и на 14% – при пероральном путях введения экстракта по сравнению с группой сравнения. Данные результаты свидетельствовали об атрофических изменениях в клетках под действием экстракта. При этом ЯЦИ также уменьшался в отличие от группы сравнения до  $0,61 \pm 0,12$  при внутримышечном и до  $0,55 \pm 0,14$  – при пероральном путях введения экстракта аврана. Морфометрические изменения не отличались как через 3, так и через 4 недели с начала эксперимента.

При проведении ШИК-реакции (PAS-реакции) (окраске на мукополисахариды) в группе крыс, получавших экстракт аврана, отмечали значительное снижение интенсивности окраски в отличие от группы

сравнения, что свидетельствовало о повреждении поверхностных мембран клеток и уменьшении количества слизи (Рисунок 101).

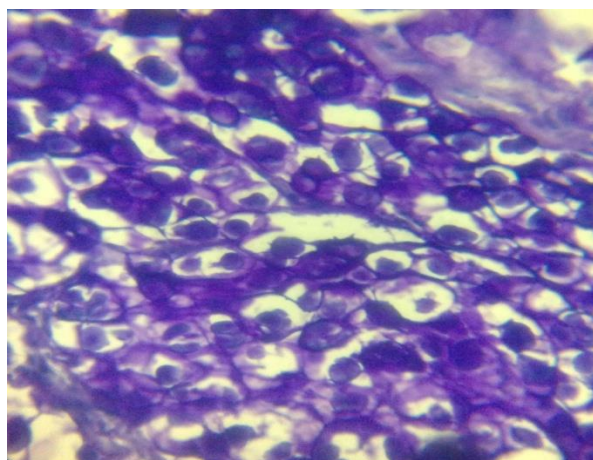
Таблица 30 – Морфометрические показатели клеток опухоли рака печени РС-1 через 3 недели после начала и на момент окончания эксперимента

| Показатель<br>Группа                           | Число кл. в<br>поле зрения<br>(ув.768) | Диаметр<br>ядра               | Диаметр<br>клетки             | ЯЦИ                       | Число<br>некрот.<br>кл. в п/зр |
|------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Группа сравнения                               | 67,7±3,2/<br>65,2±5,9                  | 0,009±0,001/<br>0,009±0,002   | 0,014±0,002/<br>0,014±0,001   | 0,66±0,15/<br>0,66±0,18   | 0,8±0,4/<br>1±0,5              |
| Внутримышечное<br>введение экстракта<br>аврана | 27,6±2*/<br>29,2±4*                    | 0,006±0,001*/<br>0,006±0,001* | 0,010±0,001*/<br>0,011±0,001* | 0,63±0,18*/<br>0,61±0,12* | 38,7±5*/<br>34,2±3,4*          |
| Пероральное<br>введение экстракта<br>аврана    | 33±3,8*/<br>36±4,2*                    | 0,006±0,001*/<br>0,006±0,001* | 0,011±0,003*/<br>0,012±0,002* | 0,57±0,22*/<br>0,55±0,14* | 30,1±9,2*/<br>28,7±7,5*        |

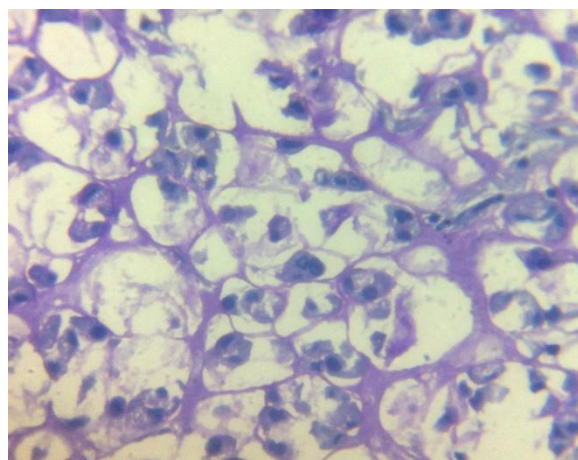
*Примечание: в числителе указаны значения морфометрических показателей клеток опухоли рака печени РС-1 через 3 недели после начала, а в знаменатели на момент окончания эксперимента.*

*\* – достоверность различий определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча более 95% при сравнении значений опытной группы и группы сравнения при  $p < 0,05$  и  $T > 1,96$ .*

При окраске метиловым зеленым - пиронином по Браше отмечали окрашивание РНК практически во всех ядрах клеток рака печени группы сравнения (красный цвет) и снижение количества клеток, экспрессирующих ядерную РНК, или вообще ее отсутствие в клетках опухоли как в группе перорального, так и внутримышечного введения экстракта (Рисунок 102).



**А**



**Б**

Рисунок 101. Рак печени. Окраска: ШИК-реакция. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженное окрашивание мембран и слизи; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана – резкое снижение экспрессии окраски.

Скорее всего, это свидетельствовало об уменьшении транскрипционной активности в клетках опухоли или разрушении РНК под действием экстракта, хотя под капсулой опухоли сохранялось ярко-красное окрашивание ядра.

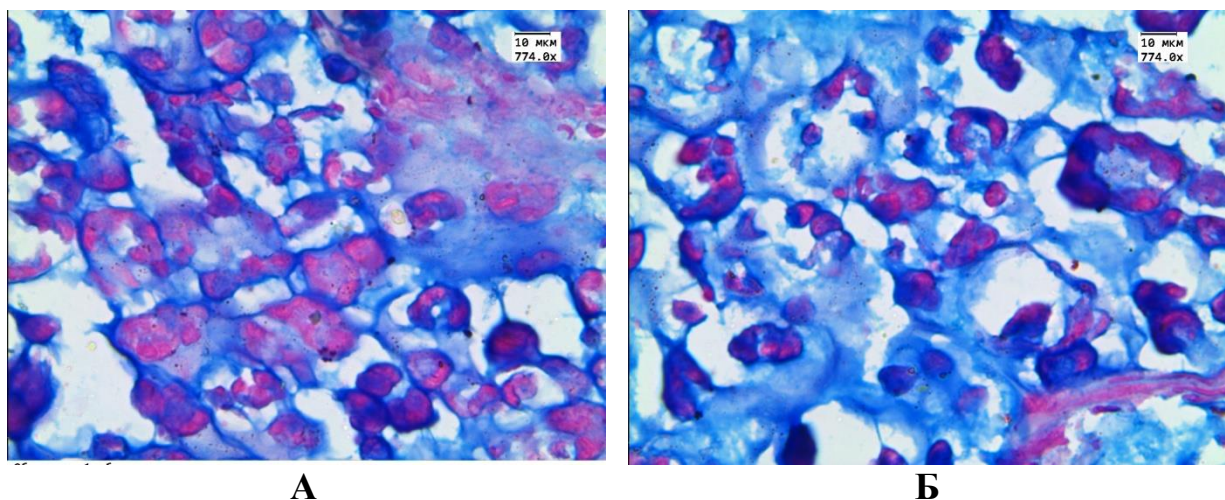


Рисунок 102. Рак печени. Окраска ДНК и РНК метиловым зеленым-пиронином по Браше. Ув. 774. Группы: А – сравнения – красное окрашивание ядра; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – резкое снижение экспрессии окраски на ДНК.

При гистохимической окраске с лектином зародышей пшеницы WGA в клетках рака печени группы сравнения отмечали выраженную экспрессию. При внутримышечном и пероральном введении экстракта аврана лектин WGA давал очень слабую или отрицательную реакцию в клетках опухоли (Рисунок 103).

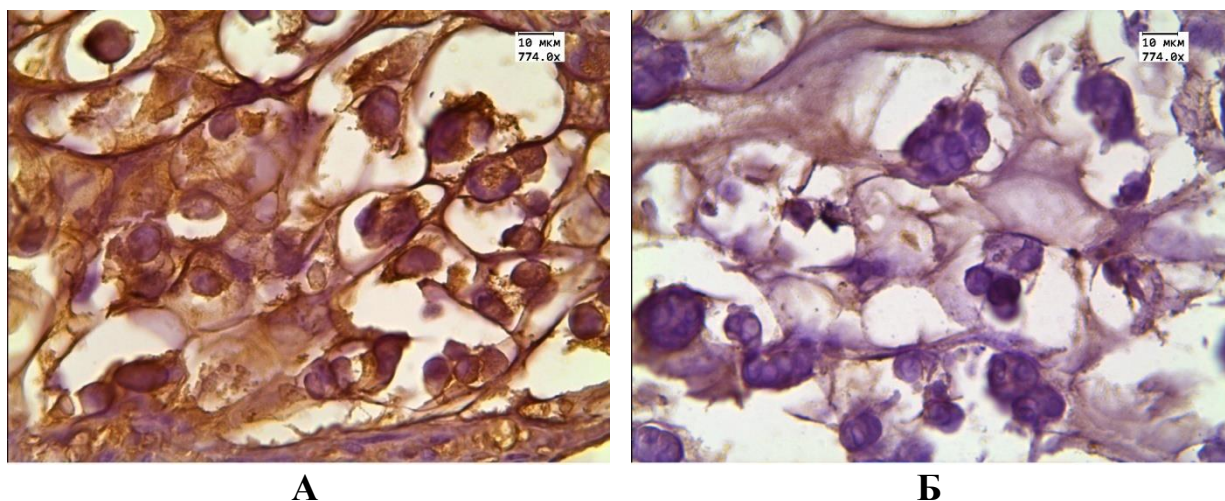


Рисунок 103. Рак печени. Гистохимическая окраска лектином зародышей пшеницы WGA. Ув. 774. Группы: А – сравнения – положительная реакция с WGA (коричневое окрашивание) Б – при пероральном введении экстракта аврана – слабая экспрессия.

С учетом высокой экспрессии лектина WGA в клетках рака печени группы сравнения, снижение экспрессии после воздействия экстрактом может свидетельствовать о повреждении клеточных мембран в данной опухоли.

### *Иммуногистохимическое исследование*

При иммуногистохимическом исследовании рака печени РС-1 в группе сравнения индекс пролиферации Ki67 составил 100%, при этом в большей части прореагировавших ядер клеток наблюдали выраженную экспрессию. В экспериментальных группах при обоих путях введения экстракта аврана экспрессия маркера пролиферации Ki67 отсутствовала, и индекс пролиферации был равен 0 даже в группе животных, которые прожили еще одну неделю без введения экстракта (Таблица 31, Рисунок 104).

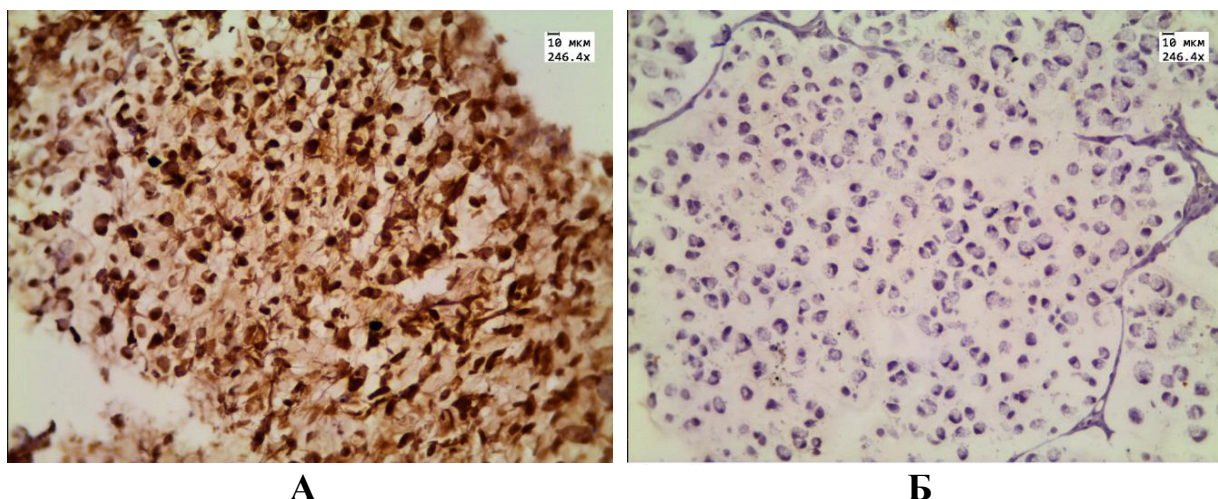


Рисунок 104. Рак печени. Иммуногистохимическая реакция с антителом Ki67 и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув. 246,6. Группы: А – сравнения – выраженная экспрессия; Б – при пероральном введении экстракта аврана – отсутствие экспрессии.

При иммуногистохимической окраске на маркер EGFR рака печени РС-1 в группе сравнения отмечали выраженную экспрессию в 94%, что свидетельствует о высоком злокачественном потенциале данной опухоли. В экспериментальных группах при внутримышечном и пероральном путях введения экстракта аврана отмечали снижение процента клеток с положительной экспрессией маркера EGFR. Данное обстоятельство говорит о возможности экстракта аврана блокировать этот ген, если он был активен в

клетке. Положительная экспрессия сохранялась только в элементах стромы рака печени (Рисунок 105).

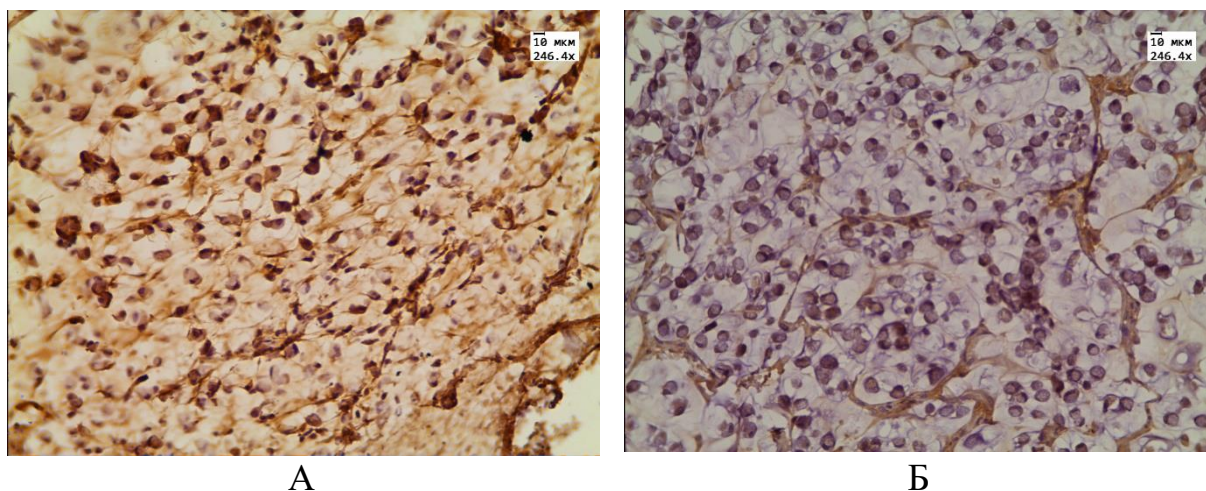


Рисунок 105. Рак печени. Иммуногистохимическая реакция с EGFR и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженная экспрессия; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – отсутствие экспрессии.

При иммуногистохимической оценке в группе сравнения отмечали умеренную экспрессию маркера ангиогенеза VEGF в соединительнотканых перегородках, разделяющих опухоль на доли. В экспериментальных группах как с внутримышечным, так и с пероральным путями введения экстракта аврана изменилась только выраженность экспрессии – с умеренной на слабую (Рисунок 106, Таблица 31).

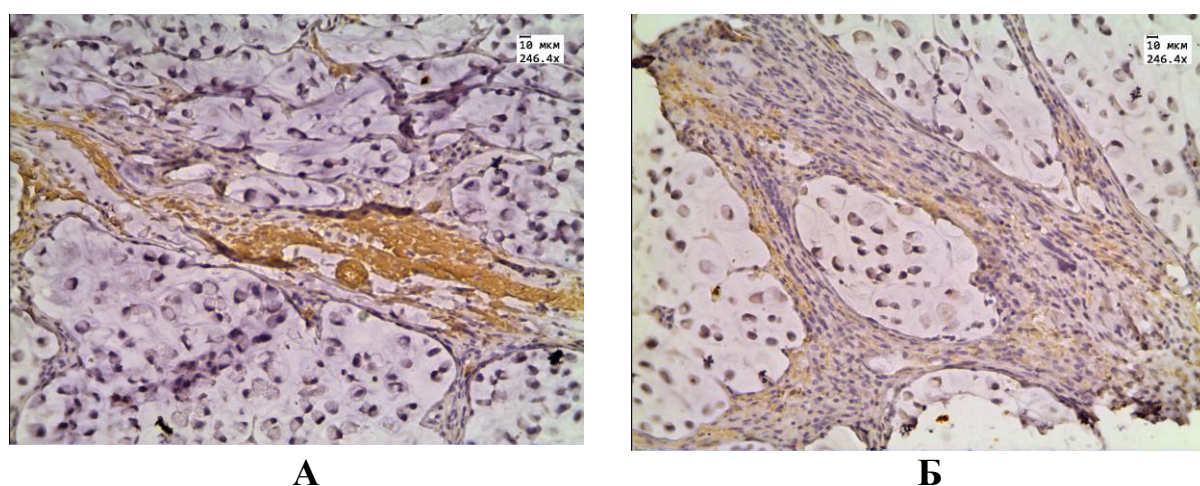
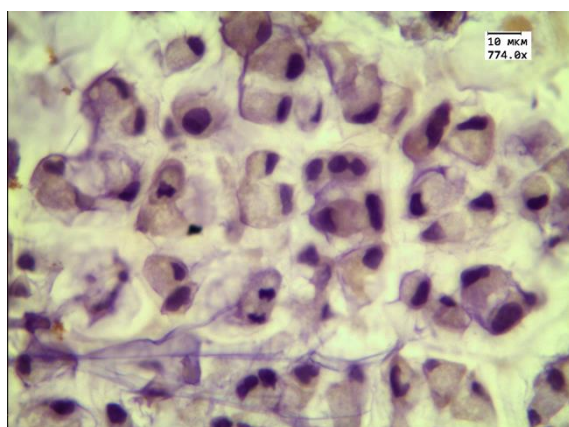


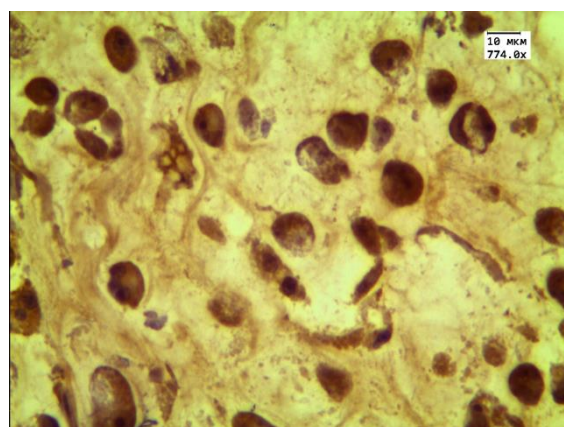
Рисунок 106. Рак печени. Иммуногистохимическая реакция с антителом VEGF и докрашиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – умеренная экспрессия в соединительнотканых перегородках; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – слабая экспрессия в соединительнотканых перегородках.

При окраске ткани рака печени РС-1 маркером апоптоза р53 в группе сравнения экспрессия отсутствовала. В экспериментальных группах после введения экстракта аврана отмечали появление умеренной как цитоплазматической, так и ядерной экспрессии маркера апоптоза р53. Данная реакция была наиболее выражена в зонах значительного повреждения опухоли и в клетках с более конденсированным хроматином. При внутримышечном введении экстракта процент прореагировавших клеток достигал 92,3%, а при пероральном введении – 85,4%, экспрессия была выраженной при обоих путях введения, как через 3 недели, так и через 4 недели после начала эксперимента (Таблица 31, Рисунок 107).

При иммуногистохимическом окрашивании на цитоплазматический маркер активации апоптоза Вах в клетках рака печени РА-1 группы сравнения наблюдали отрицательную реакцию. В экспериментальных группах независимо от пути введения экстракта аврана через 3 недели от начала эксперимента наблюдали умеренную экспрессию, а через неделю после отмены введения отмечали слабую экспрессию этого маркера в единичных клетках (Рисунок 108). Возможно, это связано с тем, что через неделю после отмены введения экстракта компоненты, которые его активировали при раке почки РА и саркомы 45, уже выводятся из организма.



А



Б

Рисунок 107. Рак печени. Иммуногистохимическая реакция с антителом р53 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – отсутствие экспрессии; Б – при внутримышечном введении экстракта аврана – выраженная экспрессия.

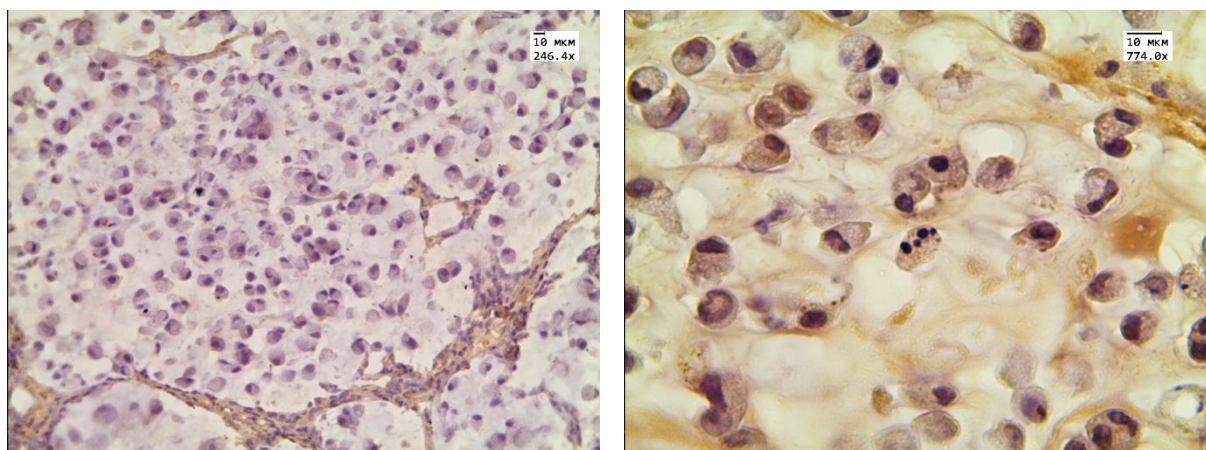
**А****Б**

Рисунок 108. Рак печени. Иммуногистохимическая реакция с антителом Вах и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения – слабая экспрессия; Б – при внутримышечном пути введения экстракта аврана – умеренно выраженная экспрессия маркера и признаки фрагментации ядра в клетках опухоли.

При оценке экспрессии блокирующего апоптоз иммуногистохимического маркера Bcl-2 наблюдали его отрицательную экспрессию в ткани рака печени РС-1 как в группе сравнения, так и после воздействия экстрактом, что говорит о том, что для рака печени РС-1 не характерна экспрессия данного белка, и под действием экстракта не происходит его активация (Рисунок 109).

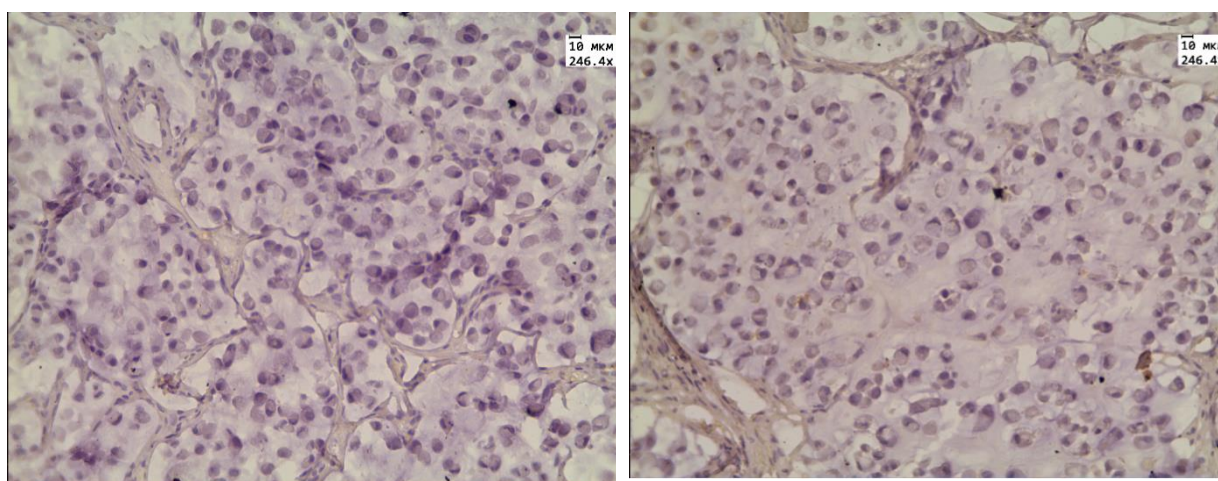
**А****Б**

Рисунок 109. Рак печени. Отсутствие экспрессии при иммуногистохимической реакции с антителом Bcl-2 и докрасиванием ядер гематоксилином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – при внутримышечном пути введения экстракта аврана.

При иммуногистохимическом окрашивании на маркер апоптоза CD95 (Fas/APO-1) в клетках рака печени РА группы сравнения отмечали отрицательную реакцию. В экспериментальной группе с пероральным введением экстракта аврана обнаруживалась слабая цитоплазматическая экспрессия данного рецептора в единичных клетках рака печени, и в большей степени экспрессия проявлялась в строме. При внутримышечном пути введения в ткани опухоли наблюдали выраженную и умеренную экспрессию как в клетках, так и межклеточном пространстве и в соединительнотканых перегородках, при этом выраженность экспрессии была больше через 3 недели после начала эксперимента (Рисунок 110).

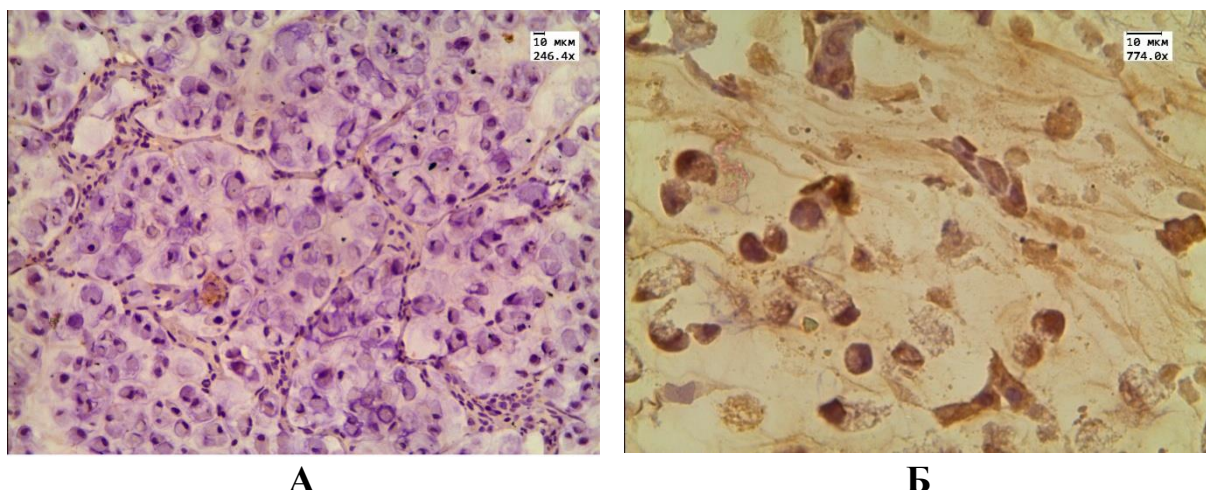


Рисунок 110. Рак печени. Иммуногистохимическая реакция с антителом CD95 (Fas/APO-1) и окрашиванием ядер гематоксилином. Группы: А – сравнения – отрицательная экспрессия маркера Ув. 246; Б – при внутримышечном пути введения экстракта – положительная экспрессия маркера. Ув. 774.

При окраске на маркер Fas-ligand отмечали положительную, но слабую реакцию в клетках рака печени РС-1 группы сравнения. В экспериментальных группах независимо от пути введения экстракта через 3 недели количество положительно окрашенных клеток оставалось таким же, как и в группе сравнения, но отмечали уже умеренную экспрессию, а через неделю после отмены введения экстракта наблюдали уменьшение до 20% количества клеток со слабой экспрессией (Рисунок 111).

Таблица 31 – Экспрессия иммуногистохимических маркеров в клетках рака печени РС-1 группы сравнения и экспериментальных группах под действием экстракта аврана через 3 недели / через 4 недели от начала эксперимента

| Группы<br><br>Маркер<br>( % + экспресс.<br>клеток) | Сравнения                              |                                  | В/м введение<br>экстракта аврана                            |                                                             | Перор.введение<br>экстракта аврана                      |                                                         |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|                                                    | Медиана; (квартиль 25 - 75); [min-max] |                                  |                                                             |                                                             |                                                         |                                                         |
|                                                    | 3 недели                               | 4 недели                         | 3 недели                                                    | 4 недели                                                    | 3 недели                                                | 4 недели                                                |
| <b>Ki67<br/>(Индекс<br/>пролиферации)</b>          | 98<br>(98-99)<br>[95-100]<br>+++       | 99<br>(98-99)<br>[96-100]<br>+++ | <b>0 *</b>                                                  | <b>0 *</b>                                                  | <b>0 *</b>                                              | <b>0 *</b>                                              |
| <b>Маркер EGFR</b>                                 | 94<br>(40-51)<br>[39-53]<br>+++        | 96<br>(39-56)<br>[37-61]<br>+++  |                                                             | <b>3,4*</b><br><b>(3-5)</b><br><b>[2-6]</b><br>+            |                                                         | <b>5,6*</b><br><b>(3-7)</b><br><b>[2-9]</b><br>+        |
| <b>Маркер ангиогенеза<br/>VEGF</b>                 | 27<br>(20-34)<br>[18-37]<br>++         | 31<br>(22-37)<br>[19-39]<br>++   | <b>0*</b>                                                   | <b>0*</b>                                                   | <b>0*</b>                                               | <b>0*</b>                                               |
| <b>Маркер аутофагии<br/>LC3B</b>                   | 0                                      | 0                                | 0                                                           | 0                                                           | 0                                                       | <b>5,4*</b><br><b>(4-6)</b><br><b>[3-8] +++</b>         |
| <b>Маркеры активации и блокирования апоптоза</b>   |                                        |                                  |                                                             |                                                             |                                                         |                                                         |
| <b>p53</b>                                         | 2<br>(1-4)<br>[0-6]<br>++              | 4<br>(2-6)<br>[0-9]<br>++        | <b>97,7*</b><br><b>(84-98)</b><br><b>[81-100]</b><br>++/+++ | <b>92,3*</b><br><b>(83-95)</b><br><b>[79-100]</b><br>++/+++ | <b>91,6*</b><br><b>(87-94)</b><br><b>[83-99]</b><br>+++ | <b>85,4*</b><br><b>(81-92)</b><br><b>[75-98]</b><br>+++ |
| <b>Bcl-2</b>                                       | 0                                      | 0                                | 0                                                           | 0                                                           | 0                                                       | 0                                                       |
| <b>Bax–</b>                                        | 0                                      | 0                                | <b>7*</b><br>(3-8)<br>[2-10]++                              | <b>5*</b><br>(2-6)<br>[1-10]+                               | <b>6 *</b><br>(3-11)<br>[1-12]++                        | <b>6*</b><br>(2-8)<br>[0-9]+                            |
| <b>CD95 ( Fas/APO-1)</b>                           | 0                                      | 0                                | <b>31*</b><br>(28-34)<br>[35-36]<br>++                      | <b>28*</b><br>(25-31)<br>[22-33]<br>+                       | <b>24*</b><br>(21-27)<br>[19-31]<br>++                  | <b>15*</b><br><b>(13-18)</b><br><b>[0-9]</b><br>+       |
| <b>Fas-ligand</b>                                  | 82<br>(75-89)<br>[71-93]<br>+          |                                  | 83±11<br>(78-89)<br>[75-92]<br>++                           | 20*<br>(19-31)<br>[16-35]<br>+                              | 80<br>(71-90)<br>[69-93]<br>++                          | <b>16*</b><br>(14-18)<br>[11-21]<br>+                   |

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  достоверность различий определяли с помощью критерия Манна-Уитни при сравнении значений опытной группы и группы сравнения.

+, ++, +++ - степень выраженности экспрессии (слабая, умеренная и выраженная).

При иммуногистохимическом окрашивании на маркер аутофагии LC3B в клетках рака печени РС-1 группы сравнения экспрессия данного маркера отсутствовала. Не определялась она и в группе животных, которые прожили 4 недели с момента начала эксперимента. Возможно, это связано с тем, что последнюю неделю введение экстракта аврана не производилось,

следовательно, снижалась его концентрация в ткани опухоли, и на клетки не было оказано значительного повреждающего воздействия. Следует отметить, что через 3 недели от начала эксперимента наблюдали слабую и единичную экспрессию маркера только при пероральном пути введения.

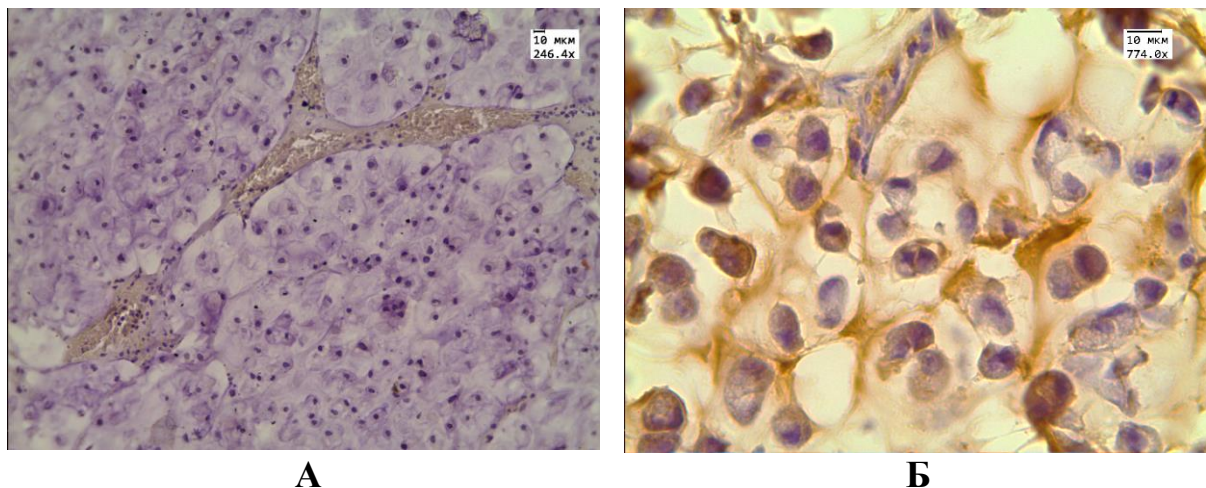


Рисунок 111. Рак печени. Иммуногистохимическая реакция с антителом Fas-ligand и окрашиванием ядер гематоксилином. Группы: А – сравнения – отрицательная экспрессия маркера. Ув. 246; Б – при пероральном пути введения экстракта – умеренная экспрессия маркера. Ув. 774.

### 7.3. Макро- и микроскопические изменения внутренних органов при введении экстракта аврана

Было установлено, что индекс органов К для сердца, легких, селезенки, печени и почек у животных при введении экстракта аврана достоверно не изменялся при обоих путях введения. Однако мы наблюдали увеличение коэффициента К для почек при внутримышечном пути введения экстракта аврана на 21% ( $T > 1.96$ ) (Таблица 32). Значимых макроскопических изменений в органах групп животных через 3 и 4 недели от начала эксперимента не обнаружено.

В пищеводе, желудке и кишечнике у животных при введении экстракта аврана патологии и изменений по отношению к группе сравнения не было выявлено, отмечали нормальное строение слизистого и подслизистого слоев полых органов желудочно-кишечного тракта.

Таблица 32 – Индекс К органов животных с раком печени РС-1

| Индекс<br>К для органов \ Группа | Группа<br>сравнения, без<br>воздействия | Внутримышечное<br>введение экстракта<br>аврана | Перор. введение<br>экстракта аврана |
|----------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Сердце                           | 0,44±0,2                                | 0,51±0,2                                       | 0,37±0,1                            |
| Легкие                           | 0,71±0,1                                | 0,88±0,1                                       | 0,76±0,1                            |
| Печень                           | 4,51±0,4                                | 4,7±0,5                                        | 4,27±0,2                            |
| Почки                            | 0,37±0,1                                | <b>0,45±0,1*</b>                               | 0,34±0,1                            |
| Селезенка                        | 0,43±0,02                               | 0,43±0,05                                      | 0,4±0,03                            |

*Примечание: Так как достоверных отличий между значениями в группах через 3 и 4 недели после начала эксперимента не было, в таблице представлены усредненные значения, характерные для обеих групп.*

*\* – при  $p < 0,05$  и  $T > 1.96$  достоверность различий определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча более 95% при сравнении значений опытной группы и группы сравнения.*

При внутримышечном введении экстракта аврана в месте введения (мышце бедра) определяли слабовыраженный отек, участки инфильтрации макрофагами и зерна гемосидерина, который, скорее всего, образовался на месте мелких кровоизлияний, возникших в месте инъекций, так как животные выводились из эксперимента только спустя неделю после прекращения введения экстракта аврана.

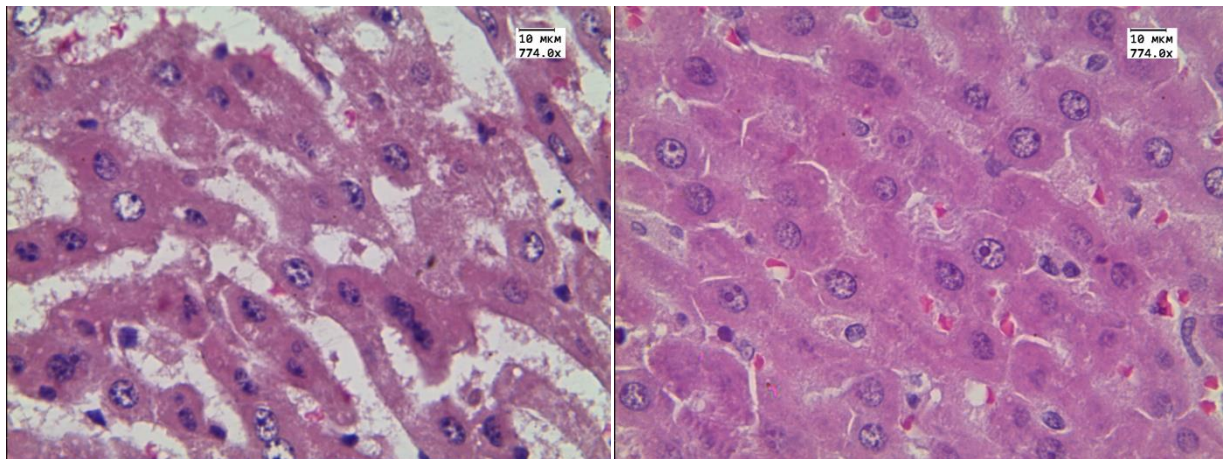
В поджелудочной железе животных группы сравнения наблюдали нормальное строение желез, встречали островки Лангерганса до  $0,02 \pm 0,001$  мм<sup>2</sup>, умеренное полнокровие кровеносных сосудов. При введении экстракта аврана не отмечали появления патологических изменений по сравнению с группой сравнения.

В печени животных группы сравнения наблюдали малокровие крупных кровеносных сосудов, расширенные синусоиды, выраженную тотальную дистрофию вплоть до некроза гепатоцитов. Ядра базофильные, хотя некоторые ядра становились оптически пустыми, что свидетельствует о снижении запасов гликогена в ядре. Количество двуядерных гепатоцитов было до 1 в поле зрения.

На фоне внутримышечного введения экстракта аврана отмечали умеренное полнокровие крупных сосудов, синусоиды были слабо полнокровны и не расширены, дистрофию гепатоцитов отмечали только в единичных клетках, в основном наблюдали одноядерные гепатоциты. При

этом ядра были равномерно базофильно окрашены. При гистологическом обзорном описании разницы между группами с различными путями введения экстракта не обнаружили, хотя обращало на себя внимание то, что при пероральном введении были расширены синусоиды, как и в группе сравнения.

При морфометрическом анализе в печени нами было зафиксировано, что при внутримышечном введении экстракта увеличивалось среднее количество гепатоцитов в поле зрения на 43% ( $T>1.96$ ), а среднее количество всех клеток в поле зрения увеличивалось на 27% ( $T>1.96$ ), чем в группе сравнения, среднее количество клеток Купфера и Ито уменьшалось на 59% ( $T>1.96$ ), а среднее количество лимфоцитов было больше на 330%, чем в группе сравнения ( $T>1.96$ ) (Рисунок 112, Таблица 33).



А

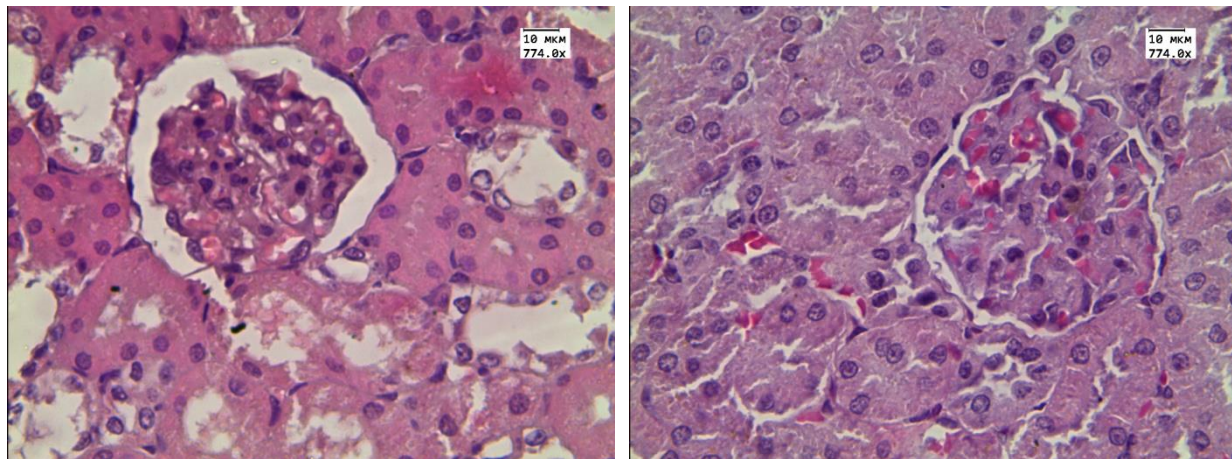
Б

Рисунок 112. Печень. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – расширение синусоидов и выраженная дистрофия гепатоцитов; Б – нормальное строение печени при внутримышечном пути введения экстракта аврана.

При пероральном введении также наблюдали увеличение как среднего количества гепатоцитов на 34% ( $T>1.96$ ), так и среднего количества всех клеток в поле зрения микропрепарата печени на 31% ( $T>1.96$ ) в отличие от группы сравнения, увеличение среднего количества клеток Купфера и Ито на 28% ( $T>1.96$ ).

В почках животных группы сравнения с перевитым раком печени РС-1 наблюдали умеренное полнокровие клубочков и расширение просвета между капсулой Шумлянско-Боумена и сосудистым клубочком, были участки с

умеренной дистрофией эпителия извитых канальцев, эпителий дистальных канальцев был без изменений. При внутримышечном введении экстракта аврана клубочки были более полнокровны, площадь клубочков была на 47 % больше, чем в группе сравнения.



А

Б

Рисунок 113. Почки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 774. Группы: А – сравнения – выраженная дистрофия и некроз эпителия извитых канальцев; Б – при внутримышечном пути введения экстракта – слабо выраженная дистрофия эпителия извитых канальцев.

При пероральном введении экстракта клубочки были полнокровны, но площадь клубочка значимо не менялась в отличие от группы сравнения, как и высота эпителия извитых канальцев. Хотя в ряде случаев отмечали единичные некрозы в эпителии извитых канальцев почки, и их просветы были более выражены, чем в группе сравнения. При обоих путях введения экстракта эпителий дистальных канальцев не возникали изменения (Рисунок 113).

В группе животных с перевитым раком печени РС-1 без воздействия в селезенке отмечали преобладание белой пульпы над красной, которая была полнокровна, границы между красной и белой пульпой были размытыми. Также наблюдали отсутствие ярко выраженных светлых центров в фолликулах и мантийной зоны, площадь фолликулов составила  $0,104 \pm 0,04$  мм<sup>2</sup>.

При введении экстракта аврана наблюдали увеличение площади белой пульпы, полнокровие и более четкие границы, в отличие от в группы

сравнения, также отмечали увеличение площади фолликулов в 1,6 раза ( $T > 1.96$ ). Светлые центры были хорошо выражены, их площадь составила  $0,012 \text{ мм}^2$  при внутримышечном и  $0,015 \text{ мм}^2$  при пероральных путях введения (Таблица 33, Рисунок 114).

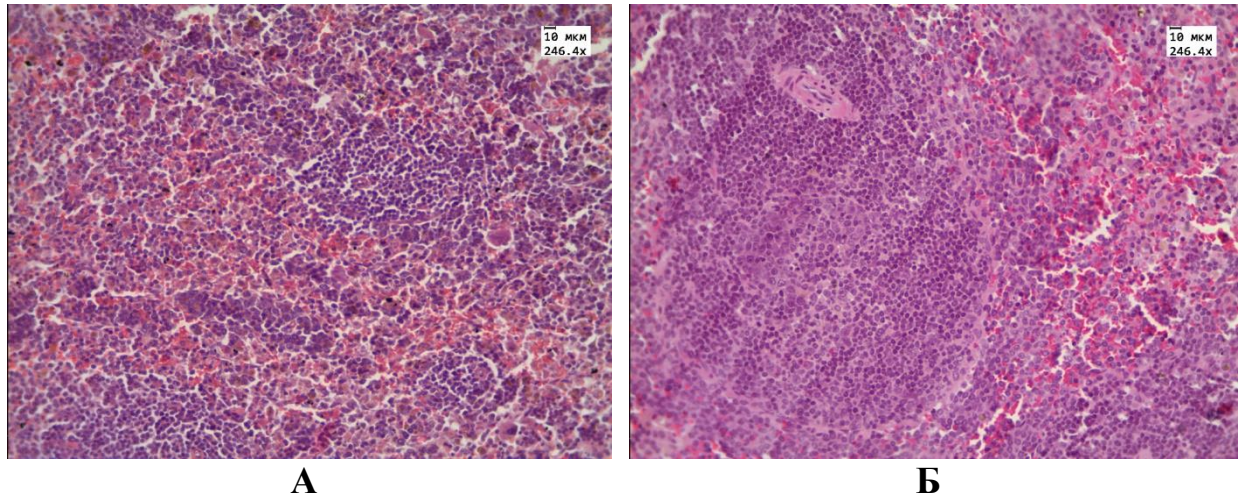


Рисунок 114. Селезенка. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения – отсутствие четких границ между красной и белой пульпой; Б – при внутримышечном пути введения экстракта – гиперплазия фолликулов.

Умеренный отек стромы, полнокровие сосудов микроциркуляторного русла миокарда наблюдали, как в группе сравнения с перевитым раком печени РС-1, так и при обоих путях введения экстракта аврана.

В головном мозге животных группы сравнения с перевитым раком печени РС-1 наблюдали умеренное полнокровие сосудов, незначительный периваскулярный отек вокруг сосудов микроциркуляторного русла. При обоих путях введения экстракта аврана также отмечали умеренное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла (Рисунок 115).

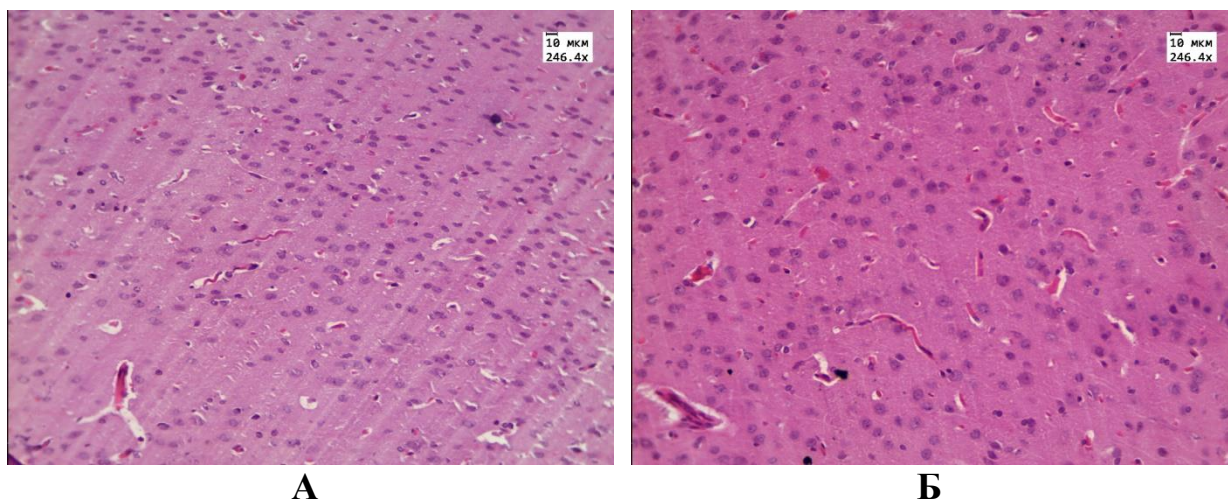


Рисунок 115. Отек и полнокровие вещества головного мозга. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана.

В легких животных группы сравнения просвет альвеол был свободным, межальвеолярные перегородки утолщены и полнокровны, перибронхиальные лимфоузлы до  $0,046 \pm 0,007 \text{ мм}^2$ . При введении экстракта аврана не отмечали значимых патоморфологических изменений в легких. При морфометрии перибронхиальных лимфоузлов наблюдали их увеличение при внутримышечном пути на 57% ( $T > 1.96$ ) и на 54% ( $T > 1.96$ ) – при пероральном пути введения (Рисунок 116, Таблица 33).

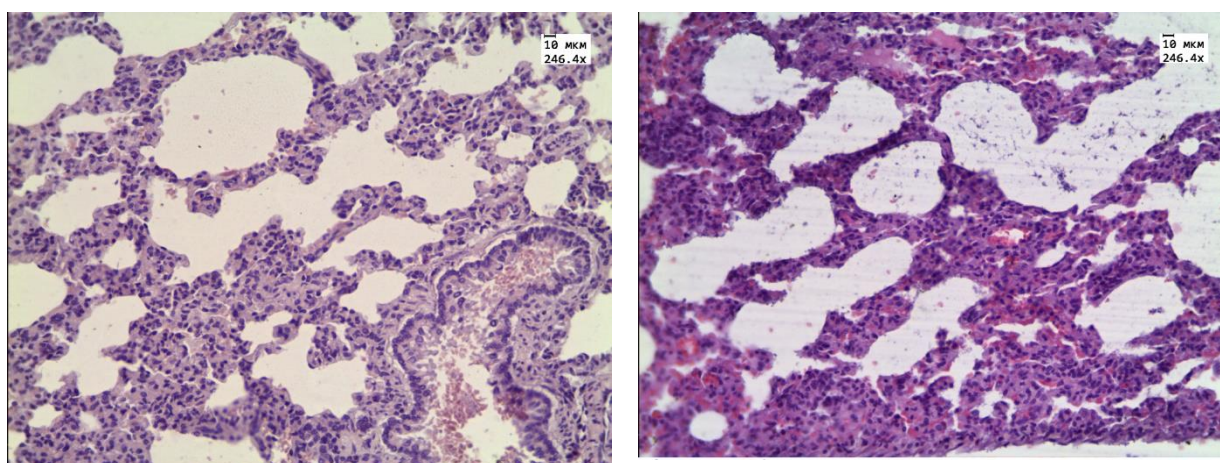
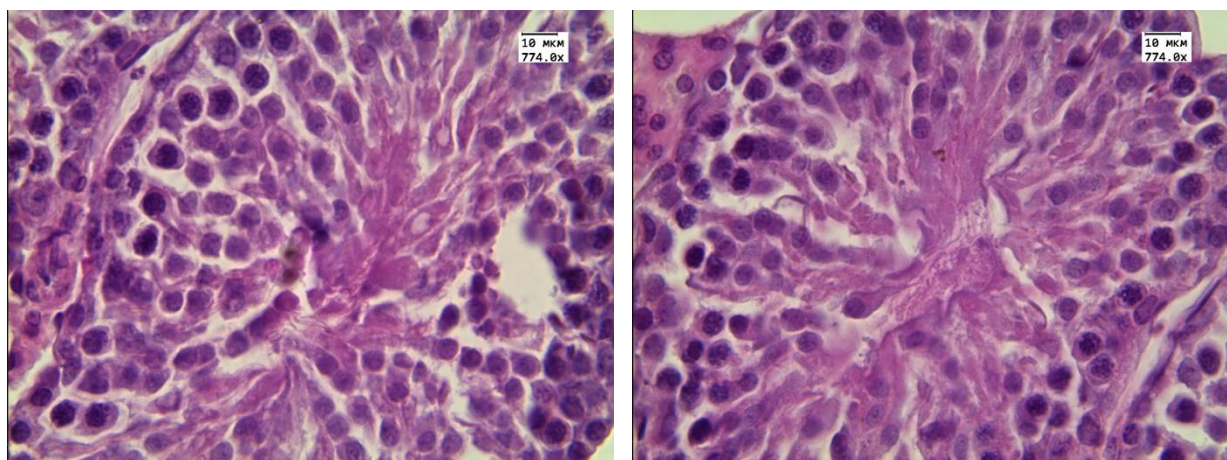


Рисунок 116. Утолщение межальвеолярных перегородок в легких. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – при пероральном пути введения экстракта аврана.

В семенниках животных как группы сравнения, так и после введения экстракта аврана отмечали нормальное строение, сперматогенный эпителий на разных стадиях созревания (Рисунок 117).



А

Б

Рисунок 117. Семенники. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 246,4. Группы: А – сравнения; Б – при внутримышечном пути введения экстракта аврана.

Таблица 33 – Морфометрические показатели во внутренних органах у животных с перевитым раком печени РС-1

| Показатель                   | Группы                                     |                                   |                                   |
|------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|                              | Группа<br>сравнения,<br>без<br>воздействия | С введением экстракта аврана      |                                   |
|                              |                                            | Внутримышечно                     | Перорально                        |
| Селезенка                    |                                            |                                   |                                   |
| S фолликулов мм <sup>2</sup> | 0,105±0,06/<br>0,104±0,04                  | 0,169±0,038*/<br>0,168±0,041*     | 0,168±0,037*/<br>0,169±0,051*     |
| Печень                       |                                            |                                   |                                   |
| Гепатоциты (ср. кол. в п/зр) | 39,3±15/<br>38,9±13/                       | 55,9±11*/<br>55,6±6,3*            | 53,1±1*/<br>52,4±3,7*             |
| Купфера (ср. кол. в п/зр)    | 12,2±1,8/<br>11,5±2,1                      | 5±1,9*/<br>4,7±1,4*               | 14,5±3,3*/<br>14,7±4,1*           |
| Лимфоциты (ср. кол. в п/зр)  | 2±1,5/<br>2±1,1                            | 6,1±1,5*/<br>6,6±2,5*             | 1,3±0,9/<br>1,4±0,5               |
| Общее кол-во кл. в п/зр      | 51,6±3,2/<br>52,4±2,8                      | 65,3±1,9*/<br>66,9±2,8*           | 65,9±2,8*/<br>68,6±4,2*           |
| Легкие                       |                                            |                                   |                                   |
| S перибронх. фолликула       | 0,042±0,01/<br>0,046±0,009                 | 0,069±0,01*/<br>0,073±0,008*      | 0,072±0,011*/<br>0,071±0,012*     |
| Почки                        |                                            |                                   |                                   |
| S клубочка                   | 0,0035±0,0001/<br>0,0032±0,0001            | 0,0048±0,0004*/<br>0,0047±0,0003* | 0,0044±0,0001*/<br>0,0044±0,0001* |
| Высота эпит. извит. канальца | 0,01±0,004/<br>0,01±0,003                  | 0,012±0,005/<br>0,013±0,004       | 0,013±0,002/<br>0,014±0,003       |

Примечание: в числителе указаны значения морфометрических показателей клеток опухоли рака печени РС-1 через 3 недели после начала, а в знаменатели на момент окончания эксперимента. \* – при  $p < 0,5$  и  $T > 1,96$  достоверность различий при сравнении значений опытной группы и группы сравнения определяли с помощью критерия Крамера-Уэлча.

Таким образом, экстракт аврана лекарственного обладал противоопухолевой активностью в отношении перевитого рака печени РС-1 и на протяжении всего эксперимента снижал темпы роста опухоли. Индекс торможения роста опухоли составил 84% при внутримышечном и 31% – при пероральном пути введения к концу третьей недели. Через неделю после отмены введения индекс торможения составил 67% для внутримышечного и 66% для перорального пути введения экстракта.

В группе крыс, получавших экстракт аврана, развивались атрофические и дистрофические изменения опухолевых клеток, а также появлялись четкие зоны некроза опухоли. Уменьшение размеров ядра и размеров самой опухолевой клетки, отсутствие экспрессии при окраске на маркер пролиферации Ki67, наряду с отсутствием митозов и снижением содержания в них РНК, указывало на низкую митотическую и транскрипционную активность клеток опухоли и торможение клеточного цикла в период S- и G<sub>2</sub> - фаз с последующим резким снижением их пролиферации и переходом в фазу G<sub>0</sub> (отрицательный Ki67). Это свидетельствует о цитостатическом действии экстракта аврана и согласуется со значительным замедлением темпов роста опухоли. Под влиянием экстракта в опухолевых клетках появлялись морфологические признаки апоптоза в виде апоптотических телец, уменьшение ядра и клетки и начала конденсации хроматина, что подтверждается положительной экспрессией маркера p53. Все описанные изменения были более выражены при внутримышечном пути введения.

При воздействии экстракта аврана в раке печени РС-1 снижалась экспрессия маркера пролиферации Ki67 и маркера ангиогенеза VEGF, а значит, клетки опухоли находились в G<sub>0</sub> фазе, что подтверждается отсутствием митозов. Кроме того, блокировалась экспрессия маркера EGFR. Введение экстракта приводило к активации всех путей апоптоза (p53, Bax, CD95 (Fas/APO-1) в клетках опухоли. Маркер аутофагии LC3B не экспрессировался и после воздействия экстракта.

Кроме того, на примере рака печени РС-1 было установлено, что экстракт аврана оказывал антикахексический эффект, так как введение экстракта приводило к набору массы животных или препятствовало ее потере. Внутримышечное введение экстракта значительно эффективнее задерживало рост рака печени и способствовало набору массы животных, а также вызывало более выраженный патоморфоз опухоли, чем пероральное.

Отсутствие дистрофических изменений в органах крыс, обусловленных развивающейся опухолью, связано с выраженной антиоксидантной активностью экстракта (за счет флавоноидов, входящих в состав) и избирательностью его цитотоксического действия именно на клетки опухоли. При введении экстракта отмечалась реакция органов иммунной системы в виде увеличения фолликулов селезенки и появления в них четко оформленных светлых центров, увеличение массы селезенки, увеличение перибронхиальных лимфатических узлов, что говорило о возможной стимуляции или активации иммунной системы, за счет чего мог реализоваться и противоопухолевый эффект. В других органах и тканях, в том числе и с высокой пролиферативной активностью (семенники) животных с перевитым раком печени не было обнаружено токсического эффекта на фоне введения экстракта.

## ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведённый на первом этапе в экспериментах *in vitro* сравнительный анализ влияния изученных экстрактов на опухолевую культуру HeLa и неопуховую культуру SPEV для оценки избирательности действия экстрактов именно на раковые клетки показал, что опухолевые клетки HeLa оказались менее чувствительны к воздействию экстракта бессмертника по сравнению с неопуховыми; экстракт не проявлял апоптотическую активность. При воздействии экстракта кукурузы процент гибели опухолевых клеток HeLa был больше, чем неопуховых SPEV, но апоптотической активности под действием этого экстракта также не было выявлено.

При воздействии экстракта аврана в минимальных концентрациях в опухолевых клетках были выражены признаки апоптоза и некроза и отсутствовали фигуры митозов. Следует отметить, что при воздействии на неопуховые клетки SPEV концентрация экстракта LC50 оказалась в 7 раз больше, чем концентрация LC50 при воздействии на опухолевую культуру HeLa, что свидетельствовало об их большей чувствительности.

На втором этапе исследований в экспериментах *in vitro* оценивали морфологические изменения опухолевых клеток в динамике через 24, 48 и 72 часа после воздействия экстрактами. Было установлено, что наиболее выраженной способностью активировать апоптоз обладает экстракт аврана в отношении всех исследованных культур опухолевых клеток уже через 24 часа после воздействия. Причем доля клеток в апоптозе увеличивалась с увеличением концентрации (Рисунок 118). Обращало на себя внимание то, что исследуемые опухолевые культуры имели разную чувствительность к экстракту. Так, культура клеток HeLa давала 40% апоптоза опухолевых клеток уже при минимальной концентрации (0,035 мг/мл), а культура клеток карциномы молочной железы – только 2%. При более высокой концентрации 0,9 мг/мл более 70% апоптоза дали клетки HeLa, Sn12с и SK-BR-3, а Саки-1 – только 19%. В литературе изложены случаи, когда разные концентрации

веществ могут оказывать даже противоположные эффекты на опухолевые клетки (Островская Л.А., 2002; Славецкая М.Б., 2012).

Экстракт бессмертника не вызывал апоптоза в изученных культурах опухолевых клеток. Экстракт кукурузы вызывает апоптоз в 20% клеток культуры рака почки Саки-1 только при концентрации 17,6 мг/мл, что практически в 20 раз превышало концентрацию экстракта аврана.

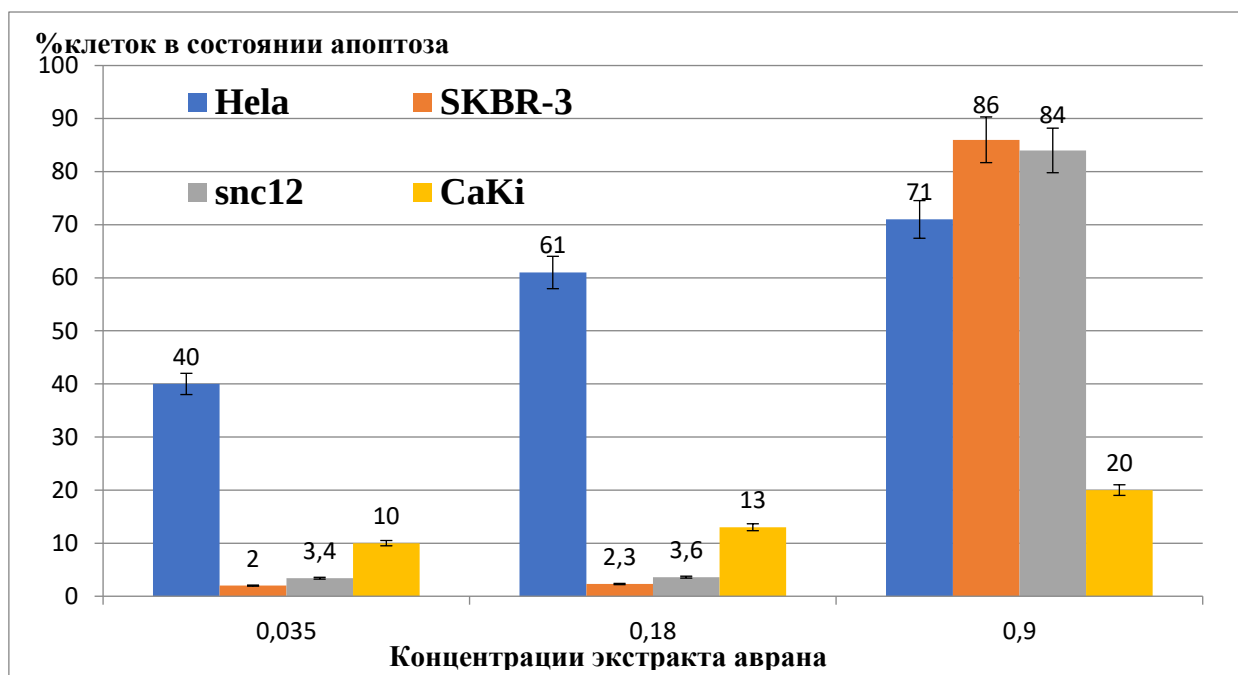


Рисунок 118. Доля клеток в состоянии апоптоза на разных культурах опухолей человека через 24 часа после воздействия экстракта аврана

Через 48 ч после воздействия экстрактов сохранялась апоптотическая активность, и процент клеток в апоптозе из оставшихся жизнеспособных клеток увеличивался.

На следующем этапе с помощью проточной цитофлуориметрии и двойной окраской аннексином V и йодистым пропидием после воздействием экстрактом был осуществлен подсчет живых клеток, а также клеток в состоянии апоптоза или некроза на 7 линиях опухолей человека (Jurkat – Т-клеточного лимфобластного лейкоза, MCF-7 – аденокарциномы молочной железы, A549 – карциномы легкого, PC-3 – карциномы простаты, HCT-116 – карциномы толстой кишки, A498 – карциномы почки, SK-BR-3 – карциномы

молочной железы человека). Клетки разных культур реагировали с разной чувствительностью: в одних преобладал ранний апоптоз, в других – поздний апоптоз или даже некроз. При воздействии экстракта бессмертника были получены следующие значения: количество клеток, находившихся в раннем апоптозе – от 36,1% на линии карциномы легкого A549 до 49,2% на линии карциномы толстой кишки HCT-116; в позднем апоптозе – от 11,7% на линии карциномы толстой кишки HCT-116 до 37,7% на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7.

Было установлено, что количество клеток в стадии раннего апоптоза после воздействия экстракта антоциановой кукурузы BOY на линии карциномы толстой кишки HCT-116 составило 18,6%, в стадии позднего апоптоза на линии карциномы простаты PC-3 – 11,9%, на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 – 35,7%.

Было выявлено, что количество клеток, находившихся в раннем апоптозе после воздействия экстракта антоциановой кукурузы B3Y на линии карциномы легкого A549 составило 16,7%, в позднем апоптозе – от 15,6% на линии карциномы толстой кишки HCT-116 до 39,8% на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7.

Таким образом, экстракт антоциановой кукурузы B3Y проявил противоопухолевую активность на сравнительно большем числе линий опухолевых клеток человека, чем экстракт антоциановой кукурузы BOY.

Активация апоптоза происходила во всех исследуемых культурах опухолей человека при влиянии экстракта аврана. Так, через сутки детектировали в основном клетки, находившиеся в позднем апоптозе (от 27,8% на линии карциномы толстой кишки HCT-116 до 96,8% на линии аденокарциномы молочной железы MCF-7). Только на линии рака легкого A549 отмечали 26,9% клеток, находившихся в стадии раннего апоптоза и более 55% клеток в стадии позднего апоптоза что, по-видимому, объясняется меньшей чувствительностью данной культуры. Данные результаты подтверждают факт различной степени чувствительности опухолевых клеток

к экстракту. Во всех исследуемых культурах количество живых клеток значительно уменьшалось и составляло 1-5% (только при раке почки A458 – 15%). Отличия в чувствительности заключались только в изменении соотношения между ранним и поздним апоптозом и некрозом. Возможность органических соединений вызывать апоптоз в опухолевых клетках описывается в современной литературе (Mane S.D. & Kamatham A.N., 2019), однако такие исследования проводились в основном на одной культуре, что не позволяло получить представление о разной чувствительности опухолевых клеток.

Ранее на клеточных культурах был установлен ряд механизмов противоопухолевой активности флавоноидов, в частности, за счет их способности снижать активность цитоплазматической и митохондриальной АТФ-аз (Максютина Н.П., 1988). Другой механизм связывали с возможностью флавоноидов активировать апоптоз в клетках опухоли и повышать экспрессию генов-супрессоров (Huang H.Y., Zha X.L., 2002; Rong Y., 2008), что доказано в нашем исследовании.

Для определения способности активировать у экстрактов каспазу-3 на проточном цитофлуориметре был проведен тест с anti-caspase-3-FITC (BD). Установлено, что под действием экстрактов бессмертника и аврана в опухолевой линии Jurkat развивался каспазо-зависимый апоптоз, и его индукция осуществлялся через каспазу-3. Таким образом, была подтверждена апоптотическая активность и установлен механизм апоптоза под действием флавоноидов. Полученные данные о наличии апоптотической активности у экстрактов, содержащих флавоноиды, вполне согласуются с данными других авторов (Wang I.K., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K., 2009; Polier G., Ding J., 2011), обнаруживших такую активность у флавоноидов и установивших, что механизм активации апоптоза имеет каспазный путь.

Общее количество клеток в поле зрения через 24 и 48 часов после воздействия экстрактов не менялось. Экстракт бессмертника проявлял цитостатическую активность через 24 часа только на 2-х культурах: HeLa и SK-BR-3. Что касается клеточных культур Сакі-1и Sn12с, то через 24 часа

наблюдали увеличение количества опухолевых клеток. Через 48 часов цитостатический эффект отмечали в культуре клеток Саkі-1и SK-BR-3.

Из двух экстрактов кукурузы наиболее активным оказался экстракт кукурузы ВОУ, который приводил к снижению количества клеток (цитостатическую активность) через 24 часа на 2-х культурах – Саkі-1 и SK-BR-3, а через 48 часов – уже на всех исследуемых культурах (Таблица 34).

Таблица 34 – Динамика изменения среднего количества клеток в поле зрения после воздействия экстрактами в значимых концентрациях по сравнению с контролем

| Экстракт     | Часы | HeLa | SK-BR-3 | Саkі-1 | Sn12c |
|--------------|------|------|---------|--------|-------|
| Аврана       | 24   | ▼    | * ▲ ▼   | ▼      | ▼     |
|              | 48   | ▼    | ▼       | ▼      | ▼     |
| Бессмертника | 24   | ▼    | ▼       | ▲      | ▲     |
|              | 48   | —    | ▼       | ▼      | —     |
| Кукурузы ВОУ | 24   | ▲    | ▼       | ▼      | —     |
|              | 48   | ▼    | ▼       | ▼      | ▼     |
| Кукурузы ВЗУ | 24   | —    | ▼       | —      | —     |
|              | 48   | ▼    | ▼       | ▼      | ▲     |

Примечание: ▼ – меньше чем в контроле, ▲ – больше, чем в контроле, — не отличается от контроля. \* Через 24 часа действия аврана на культуру SK-BR-3 при низких концентрациях увеличивалось количество клеток, при высоких – уменьшалось.

Экстракт аврана в высоких концентрациях блокировал деление клеток во всех клеточных культурах как через 24, так и через 48 часов.

В 2013 году в экспериментах *in vitro* было показано, что флавоноиды обладают антипролиферативной активностью в отношении клеток линии рака предстательной железы DU-145, рака поджелудочной железы (Park J.L., 2013), рака яичника (Sak K., 2015). Полученные результаты согласуются и с последующими исследованиями, показавшими, что некоторые флавоноиды являются цитотоксичными по отношению к клеткам MCF-7 и ингибируют их пролиферацию (Czemplik M., Mierziak J., 2016).

Следует отметить, что увеличение количества клеток в ряде клеточных культур происходило при низких концентрациях аврана. Такое обстоятельство привело к необходимости поиска причин данного явления. Было установлено, что при малых концентрациях экстракта аврана в опухолевых клетках появляются аутофагосомы, а при увеличении концентрации до 0,75 мг/мл клетки культуры HeLa с аутофагосомами уже не образуются и происходит их гибель (Рисунок 119). Таким образом, в результате корреляционного анализа в культуре HeLa была выявлена обратная двусторонняя взаимосвязь средней силы ( $r=-0,56$ ) высокой статистической значимости ( $p=0,004$ ) между концентрацией и количеством клеток с аутофагосомами и обратная двусторонняя взаимосвязь средней силы ( $r=-0,41$ ) высокой статистической значимости ( $p=0,0036$ ) между количеством клеток с аутофагосомами и количеством погибших клеток, а также прямая двусторонняя взаимосвязь средней силы ( $r=0,57$ ) высокой статистической значимости ( $p=0,004$ ) между концентрацией и количеством погибших клеток.

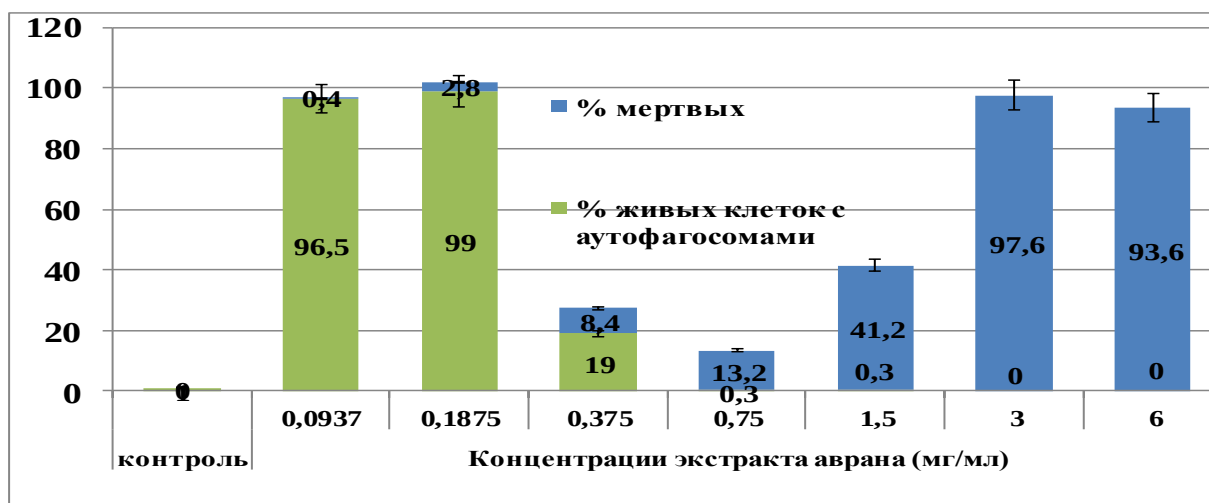


Рисунок 119. Доля клеток с аутофагосомами и мертвых клеток в культуре HeLa при действии разных концентраций экстракта аврана.

Для подтверждения факта активации аутофагии в опухолевых клетках на проточном цитофлуориметре использовали окраску Muse Autophagy LC3-Antibody BasedKit (Millipore Sigma). Было установлено, что под действием

экстракта аврана возникала аутофагия в клетках рака почки A498. Процент клеток с аутофагосомами зависел от концентрации экстракта аврана. При концентрациях от 0,004 мг/мл до 0,056 мг/мл количество клеток с LC3В увеличивалось, а при концентрациях 0,113 мг/мл до 3,6 мг/мл количество клеток с LC3В уменьшалось. Максимальное количество аутофаголизосом в клетках карциномы почки наблюдалось при концентрации экстракта аврана 0,056 мг/мл. Кроме того, *in silico* методом картирования массива сырых ридов на референс (оригинальный алгоритм Geneious), в качестве которого выступали транскрипты 82 генов ПКГ, было установлено, что в неподверженной к внешним воздействиям клеточной культуре карциномы почки человека сравнительно больших показателей достигала экспрессия генов, ассоциированных именно с аутофагией (APP, CTSB, IGF1, SQSTM1 и др.). Таким образом, не только экспрессия гена MUC13 отвечает за высокую резистентность рака почки (Zhang L., Bhasin M., 2011; Sheng Y., Ng C.P., 2017), но и экспрессия генов аутофагии. Можно предположить, что именно аутофагия объясняет ранее непонятное исчезновение резистентности рака почки A498 при применении комбинированной терапии в отличие от стандартной. Полученные нами результаты о роли аутофагии в развитии резистентности опухолевых клеток к лечению подтверждают мнения ряда авторов о роли аутофагии (Williams R.T., Yu A.L., 2013).

В литературе нет единого мнения о роли аутофагии в опухолевых клетках. Кроме того, в отечественной литературе была описана (Пимкина Ю.С., Доросевич А.Е., 2009) неоднозначная роль опухолевого супрессора ARF, который способствует стабилизации и транслокации p53 в митохондрии, но при этом не принимает участия в регуляции молекулярных механизмов апоптоза, однако способствует деполяризации митохондриальной мембраны и активации молекулярных механизмов аутофагии. Ряд авторов говорят о более благоприятном прогнозе для пациентов при появлении аутофагов в опухолевых клетках, полагая, что опухолевые клетки гибнут путем аутофагии (Yang Z., Ghoorun R.A., Fan X., Wu P., Bai Y., Li J., 2015). Однако большинство

исследователей считает, что экспрессия LC3В, наоборот, связана с худшим прогнозом течения заболевания (Tang J.Y. et al., 2013; Liu J.L. et al., 2014; Lai K. et al., 2018). Другие авторы связывают это с тем, что аутофагия может развиваться в опухолевых клетках как защитный механизм при лечении (О.В. Ковалева, М.С. Шитова, И.Б. Зборовская, 2014; Yamaguchi M. et al., 2017). Некоторые авторы говорят о более благоприятном прогнозе для пациентов при появлении аутофагов в опухолевых клетках (Yang Z. et al., 2015).

Мы считаем, что аутофагия не является видом ПКГ. Так, при проведении проточной цитофлуориметрии в экспериментах *in vitro* при воздействии экстрактом аврана на опухолевые клетки рака почки мы получили следующие данные: 95,9% клеток находились в апоптозе и 25,8% клеток с признаками аутофагии, т.е. часть клеток с аутофагами погибали через апоптоз, что не противоречит известным в литературе данным о взаимодействии аутофагии и апоптоза (Galluzzi L. et al., 2009; Youle R.G., Narendra D.P., 2011; Chen L., Han X., Hu Z., 2019).

Полученные в настоящей работе данные по дозозависимой аутофагии опухолевых клеток под действием экстракта аврана позволили затронуть еще одну актуальную проблему в онкологии, а именно формирование резистентности опухолевых клеток к лечению за счет развития цитопротекторной аутофагии. В экспериментах *in vitro* нами было установлено, что частота развития цитопротекторной аутофагии зависит от концентрации экстракта. Проведение экспериментов *iv vivo* позволило установить зависимость между процессом развития аутофагии и путем введения экстракта. Так, при внутримышечном введении аврана в раке почки РА частота развития аутофагии в опухолевых клетках была в 10 раз меньше, чем при пероральном, по-видимому, из-за его большей биодоступности. Следует заметить, что в группе животных с пероральным введением аврана количество опухолевых клеток с аутофагами увеличивалось в отличие от группы сравнения. Этот факт свидетельствует о том, что аутофагия действительно развивается как защитный механизм опухолевой клетки при

действии повреждающего агента, которым в данном случае является экстракт аврана с противоопухолевой активностью. Нельзя исключить, что появление морфологических признаков аутофагии может считаться признаком развития резистентности опухоли к действию препарата из-за его недостаточной дозировки, и это необходимо учитывать при оценке степени патоморфоза и определения дальнейшей тактики в лечении пациентов.

Таким образом, апоптоз в разных культурах опухолевых клеток возникал при действии всех изученных экстрактов, но в разной степени.

Все исследованные культуры опухолевых клеток оказались чувствительными к экстракту аврана, который проявил цитостатическую, цитотоксическую и апоптотическую активности. Также было показано, что он способен блокировать протекторную аутофагию. Поэтому для дальнейшего исследования в экспериментах *in vivo* был взят только экстракт аврана.

В экспериментах *in vivo* исследования проводили на 3-х опухолях: раке печени РС-1, раке почки РА и саркоме 45.

Установлено, что экстракт аврана лекарственного на протяжении всего эксперимента значительно снижал темпы роста всех трех опухолей. Индекс торможения роста перевитой саркомы 45 составил 71,6% при внутримышечном введении и 61,7% – при пероральном.

При внутримышечном пути введения ИТРО для рака почки РА составил 73% и 71% – при пероральном введении экстракта аврана.

В отношении перевитого рака печени РС-1 введение экстракта аврана лекарственного в течение 2-х недель привело к уменьшению объема опухоли на 84% при внутримышечном пути введения и на 66% – при пероральном. Через неделю после завершения введения экстракта, во время которой проводили только измерения объема опухоли, опухоль продолжала расти, но медленнее, чем в группе сравнения, и ИТРО по массе составил 66% для перорального и 67% – для внутримышечного пути введения экстракта.

Обращало на себя внимание, что у животных с перевитыми саркомой 45 и раком печени РС-1 экстракт аврана приводил к набору массы тела в среднем

на 15%, оказывая стойкий антикахексический эффект. Пероральное введение эффективнее способствовало набору массы животными, возможно, потому, что внутримышечное введение вызывало более значительные изменения в опухоли, приводя к большему токсическому эффекту. Ранее нами было установлено, что экстракт обладал антиоксидантной активностью (Наволокин Н.А. и др., 2017), следовательно, можно полагать, что антикахексический эффект экстракта являлся патогенетическим (за счет снижения эндогенной интоксикации) и этиологическим, за счет прямого воздействия на опухоль. Кроме того, нами ранее также было установлено, что экстракт приводил к нормальным значениям показатели костного мозга и крови, о чем судили по миелоцитарной и лейкоцитарной формулам животных с перевитыми опухолями, приводя полученные значения к показателям здоровых животных без опухолей (Наволокин Н.А. и др., 2015, 2016, 2017).

Патоморфоз изучаемых опухолей проявлялся в виде развития дистрофических и некротических изменений в клетках, уменьшения общего количества клеток, размеров ядра и самой клетки. Обращало на себя внимание то, что клетки опухоли приобретали округлую форму и теряли между собой контакты, располагаясь разрозненно, что, по мнению ряда авторов (Guo K., Kang N.X., 2009), является признаком, отличающим апоптоз от начинающегося некроза. Подобные морфологические изменения в альвеолярном раке печени PC-1 и саркоме 45 при воздействии флавоноида лейкоэфдина описаны в работе Л.М. Даировой (1974 г.).

При гистохимической окраске опухоли с лектином зародышей пшеницы WGA при внутримышечном и пероральном введениях экстракта аврана отмечалась хоть и очаговая, но положительная экспрессия при раке почки и саркоме (при отсутствии экспрессии в группе сравнения), то есть клетки опухоли экспрессировали N-ацетил-D-глюкозамин и N-ацетил-нейраминую кислоту. Нельзя исключить, что экспрессия сиаловой кислоты создавала отрицательный заряд на поверхности мембран клеток и приводила к отталкиванию клеток, что, возможно, объясняет разрозненность клеток

опухоли при воздействии экстракта аврана. В случае с раком печени наблюдалась обратная картина, которая, скорее всего, обусловлена особенностями перевитого рака печени (способность клеток опухоли к слизиеобразованию). Под действием экстракта наблюдалось уменьшение слизистого компонента в клетках, что свидетельствовало о снижении синтетических процессов в клетках опухоли.

В ткани саркомы 45 под действием экстракта были обнаружены признаки организации самой опухоли без предшествующего некроза. Возможно, это объясняется активацией фибробластов, изучению роли которых в прогрессировании опухолевого роста в настоящее время уделяется большое внимание (Correia A.L., Bissell M.J., 2012; Dittmer J., Leyh B., 2015).

Патоморфоз 2-3 степени у всех трех перевиваемых опухолей под действием экстракта аврана проявлялся в виде выраженных некробиотических и атрофических изменений в клетках: уменьшения размеров ядра и клетки в среднем в 1,5 раза; уменьшения, вплоть до полного исчезновения, экспрессии при окраске на маркер пролиферации Ki67 (индекс Ki67 при обоих путях введения был равен 0, в то время как в группах без воздействия в среднем он был равен 48%); отсутствия митозов и снижения содержания в ядрах РНК, оцениваемого методом Браше, что указывало на низкую митотическую и транскрипционную активность клеток опухоли и торможение клеточного цикла в период S- и G2 - фаз с последующим резким блокированием их пролиферации и переходом в G0. Такие морфологические изменения в клетках при действии растительных веществ описаны на клеточной культуре карциномы A431, однако они не находили подтверждения в экспериментах *in vivo* (Mantena S.K., 2006.). Как известно, наблюдаемое нами снижение синтеза РНК приводит к быстрому снижению количества короткоживущих антиапоптотических белков и служит предвестником каспазного пути активации апоптоза (Polier G., Ding J., 2011).

Мы также отмечали морфологические признаки апоптоза: появление апоптотических телец, уменьшение размеров ядра и самой клетки и начало

конденсации хроматина. Описанные изменения были в 1,5 -2 раза более выражены при внутримышечном пути введения экстракта по сравнению с пероральным.

На следующем этапе работы нами были определены иммуногистохимические профили пролиферации, ангиогенеза, апоптоза и аутофагии для перевитых опухолей саркомы 45, рака почки РА и печени РС-1 в группе животных без воздействия экстрактом для определения их референтных значений и возможности проведения сравнительного анализа с экспериментальными группами.

Так, для рака почки РА в группе сравнения на 14 день после перевивки наблюдались выраженная экспрессия маркера пролиферации Ki67, слабая экспрессия маркера ангиогенеза VEGF, очаговая экспрессия маркера аутофагии LC3B и отсутствие экспрессии маркера гена EGFR и маркеров апоптоза (p53, Bcl-2, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand).

Для саркомы 45 в группе сравнения на 14 день после перевивки была характерна высокая экспрессия маркеров пролиферации Ki67 и EGFR, умеренная экспрессия маркера ангиогенеза VEGF и отсутствие экспрессии маркеров активации апоптоза p53, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и маркера блокирования апоптоза Bcl-2, а также маркера аутофагии LC3B.

Для рака печени РС-1 в группе сравнения характерна выраженная экспрессия маркера пролиферации Ki67 и экспрессия гена EGFR, а также экспрессия маркера ангиогенеза VEGF, и отсутствие экспрессии маркеров апоптоза (p53, Bcl-2, Bax, CD95 (Fas/APO-1) и аутофагии LC3B, кроме маркера Fas-ligand, дававшего умеренную экспрессию.

После введения животным экстракта аврана экспрессия изученных маркеров качественно менялась для всех изученных перевитых опухолей: исчезала экспрессия маркера злокачественного потенциала EGFR (только при раке печени РС-1) и маркера ангиогенеза VEGF, экспрессия маркера пролиферации Ki67 (то есть клетки опухоли находились в G0 фазе), что согласуется с ранее полученными данными других авторов о способности

флавоноидов влиять на пролиферацию и ангиогнез, но в экспериментах *in vitro* (Fotsis T., Pepper M.S., Aktas E., 1997; Chahar M.K., Sharma N., Dobhal M.P., 2011). Экстракт аврана приводил к активации программированной гибели клеток: апоптоза (p53, Вах, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand) и аутофагии (LC3B).

Экстракт аврана активировал в клетках опухолей экспрессию белка p53. Этот белок контролирует не только пролиферацию клетки, но и способен активировать Вах, а также рецептор смерти Fas/APO-1, что наблюдалось в нашем случае. Далее Вах стимулирует выброс цитохрома С в цитоплазму с образованием апоптосомы, содержащей каспазу-9, которая, в свою очередь, активирует каспазу-3 (активация этой каспазы нами была подтверждена в экспериментах *in vitro*). При взаимодействии рецепторов Fas/APO-1 и Fas-ligand, экспрессия которых была выражена в ткани опухоли под действием экстракта, после связывания их с металлопротеиназой и превращения Fas-ligand в растворимую форму, происходит активация прокаспазы. В результате взаимодействия цепочки «лиганд-рецептор-адаптер-эффе́ктор» формируются агрегаты – апоптосомы (апоптозные шапероны или сигнальные комплексы), в которых происходит активация каспаз, индуцирующих смерть клетки (Abbruzzese J.L, Grunewald R., Weeks E., 1991, Werner A.B. 2002; Zhang X., 2005; Kim H., 2009; Galluzzi L. et al., 2012).

Обращало на себя внимание то, что экспрессия маркеров активации апоптоза наблюдалась даже в безъядерных клетках. Это позволяет предположить, что обширные поля безъядерных клеток, появляющиеся в опухоли под действием экстракта, погибли не через некроз, а через апоптоз. Это согласуется с низким содержанием продуктов ПОЛ у животных с опухолями на фоне введения экстракта и отсутствием признаков интоксикации у животных, которые должны были бы появиться, если бы в опухоли развивались массивные очаги некроза (Наволокин Н.А. и др. 2017). Следует отметить, что при внутримышечном введении экстракта аврана

процент экспрессирующих клеток и выраженность экспрессии маркеров апоптоза была выше.

Таким образом, реализация апоптоза под воздействием экстракта аврана осуществляется через рецептор-зависимый и митохондриальный сигнальные пути с активацией каспазы-3. Полученные данные по активности апоптотических белков согласуются друг с другом (Рисунок 120).



Рисунок 120. Схема: механизмы противоопухолевой активности и пути активации апоптоза при действии на опухолевые клетки флавоноидсодержащих экстрактов.

Экспрессия маркера аутофагии LC3B увеличивалась при пероральном пути введения экстракта аврана. При внутримышечном введении экстракта происходило снижение выраженности экспрессии и количества клеток в состоянии аутофагии, что свидетельствует о блокировании протекторной аутофагии. Данный факт, возможно, связан с количеством экстракта, который поступает в опухоль: при пероральном пути введения часть экстракта разрушается в желудочно-кишечном тракте, а оставшаяся концентрация не вызывает активацию апоптоза и, как следствие, развивается защитная реакция в виде аутофагии. Следует отметить, что в раке печени через неделю после прекращения введения экстракта маркер аутофагии LC3B не экспрессируется,

видимо, потому что повреждающий фактор уже отсутствует. Данные результаты согласуются с полученными данными в экспериментах *in vitro* о зависимости развития протекторной аутофагии от концентрации экстракта: при недостаточной концентрации происходит активация протекторной аутофагии, а при увеличении концентрации – блокирование этого процесса. То есть, пероральное введение из-за меньшей биодоступности и концентрации экстракта в ткани опухоли стимулирует развитие протекторной аутофагии. Нельзя исключить, что развитие резистентности при лечении различных опухолей связано именно с развитием протекторной аутофагии и обусловлено недостаточной дозировкой противоопухолевых препаратов. Поэтому становится еще более актуальным вопрос о преодолении цитопротекторной аутофагии путем адресной доставки лекарств. Экстракт аврана был закапсулирован, и при действии капсул на опухолевые клетки мы получили их 100%-ю гибель. Полученные результаты позволяют считать микрокапсулирование эффективным способом преодоления протекторной аутофагии, но это требует дальнейшего изучения в экспериментах *in vivo*.

При обоих способах введения экстракт аврана не оказывал токсического эффекта на периферическую кровь, наоборот, на фоне рака печени РС-1 наблюдали увеличение количества лимфоцитов, что согласуется также с полученными ранее результатами по влиянию экстракта аврана на костный мозг, где отмечали увеличение количества клеток в лимфоцитарном ростке (Наволокин Н.А. и др., 2016).

В желудке и кишечнике при пероральном пути введения экстракта аврана нами не было выявлено патологических изменений. В работе Войцицкого Е.В., опубликованной в 2006 году, оценивалось влияние на морфологию ЖКТ водного экстракта курильского чая (*Pentaphylloides fruticosa*) при совместном применении с цитостатиками. Было установлено, что флавоноиды ускоряют процессы восстановления эпителиальных клеток ЖКТ и защищают клетки лимфоидного аппарата при лечении цитостатиками.

При внутримышечном введении в мышце бедра (месте введения) обнаруживались мелкие диапедзные кровоизлияния, отек и дистрофия мышечных волокон, в единичных случаях – инфильтрация лейкоцитами.

Во внутренних органах из-за роста перевитой опухоли, ее самопроизвольного разрушения и развития интоксикации наблюдались морфологические изменения, в первую очередь в печени, почках, миокарде и головном мозге. Данные изменения были представлены дистрофией вплоть до некроза отдельных клеток, нарушением кровообращения. При введении экстракта аврана не наблюдалось нарастания указанных морфологических изменений и, напротив, отмечалось уменьшение выраженности дистрофических процессов. Также наблюдалась реакция со стороны органов иммунной системы в виде увеличения массы и размеров фолликулов селезенки и появления в них четко оформленных светлых центров, увеличения перибронхиальных лимфатических узлов, что свидетельствовало о возможной стимуляции или активации иммунной системы, за счет чего мог реализоваться и противоопухолевый эффект. В других органах и тканях животных с перевитой саркомой 45, в том числе и с высокой пролиферативной активностью (семенники), не было обнаружено токсического эффекта на фоне введения экстракта. К сожалению, в доступной нам литературе мы не нашли данных о влиянии флавоноидов на внутренние органы, головной мозг и органы репродуктивной системы.

Таким образом, проведенные исследования позволили расширить имеющиеся представления о механизмах противоопухолевого воздействия и морфологических изменениях, возникающих в самой ткани опухоли и изученных органах под воздействием флавоноидсодержащих экстрактов.

## ГЛАВА 9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В экспериментах *in vitro* в результате проведенного исследования было установлено, что морфологические признаки повреждения опухолевых клеток рака шейки матки HeLa и неопухолевых клеток почки эмбриона свиньи SPEV под действием флавоноидсодержащих экстрактов проявляются в виде вакуолизации цитоплазмы, округления формы клеток, кариопикноза и кариорексиса. Однако в клеточной культуре SPEV при действии экстракта аврана в концентрации 1,5 мг/мл погибает  $0,6 \pm 0,5\%$  клеток, в отличие от опухолевой культуры, в которой при той же концентрации наблюдается  $41,5 \pm 5\%$  гибели клеток, что свидетельствует о большей чувствительности опухолевых клеток к действию экстракта.

На клеточных культурах опухолей человека (Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарцином молочной железы MCF-7 и SK-BR-3, карциномы легкого A549, карциномы простаты PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, карцином почки A498, Сакі-1, Sn12с, рака шейки матки HeLa) было подтверждено, что снижение количества опухолевых клеток и их гибель происходит в основном за счет активации апоптоза (от  $26,9 \pm 3,4\%$  до  $96,8 \pm 5,5\%$  клеток). Установлено, что апоптоз в опухолевых клетках Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat под влиянием флавоноидсодержащих экстрактов бессмертника и аврана реализуется через механизм активации каспаз (каспаза-3).

В экспериментах *in vitro* с помощью двойного окрашивания йодистым пропидием и акридиновым оранжевым было установлено, что при воздействии экстрактами в опухолевых клетках рака шейки матки HeLa появляются морфологические признаки аутофагосом (образование темных вакуолей в цитоплазме, окруженных лизосомами). В дальнейшем факт образования аутофагосом под действием флавоноидсодержащих экстрактов был подтвержден с помощью иммунофлуоресцентного маркера белка LC3В на проточном цитофлуориметре. В результате анализа полученных данных об активации и блокировании аутофагии в опухолевых клетках при действии

экстракта аврана в различных концентрациях был сделан вывод о том, что развитие аутофагии в опухолевых клетках имеет цитопротекторное значение. С помощью молекулярно-генетических методов (*in silico*) было установлено, что выраженность аутофагии имеет генетически детерминированный характер, что изначально объясняет неодинаковую устойчивость к терапии разных типов опухолевых клеток.

Для объективной оценки патоморфоза опухоли под действием экстрактов, а также возможности проведения сравнительного анализа по изменению морфологии до и после воздействия в работе были выявлены особенности морфологии и экспрессии маркеров ангиогенеза, пролиферации, аутофагии и апоптоза (EGFR, VEGF, Ki67, Bax, Bcl-2, p53, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand и LC3B) в клетках и тканях перевитых опухолей животных (рака почки РА, рака печени РС-1 и саркомы 45) в экспериментах *in vivo* без воздействия.

В экспериментах *in vivo* на лабораторных крысах с перевитыми опухолями было установлено, что в основе развития патоморфоза 2-3 степени в 80% наблюдений лежит апоптоз опухолевых клеток, развивающийся под влиянием экстракта аврана. Особенностью патоморфоза опухоли мезенхимального происхождения саркомы 45 является разрастание стромы опухоли без признаков предшествующего некроза, а опухоли эпителиального происхождения (рака почки РА) – появление гигантских клеток и исчезновение экспрессии маркера злокачественного потенциала EGFR (при раке печени РС-1). Вне зависимости от гистогенеза опухолей особенностью патоморфоза под действием экстракта аврана было исчезновение экспрессии маркеров ангиогенеза VEGF и пролиферации Ki67, отсутствие клеток в состоянии митоза (клетки опухоли переходили в G0 фазу), а также увеличение экспрессии маркеров апоптоза (p53, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand), увеличение количества клеток с экспрессией маркера аутофагии (LC3B) при пероральном пути введения экстракта аврана и снижение количества клеток с экспрессией LC3B при внутримышечном введении экстракта аврана. Мы

считаем, что увеличение экспрессии маркера LC3B в ткани опухоли на фоне проведения противоопухолевой терапии свидетельствует о развитии резистентности опухолевых клеток к воздействию экстракта.

Кроме того, выявлено, что патоморфоз опухолевой ткани при введении экстракта аврана не сопровождается развитием выраженных дистрофических и некротических процессов в паренхиме внутренних органов и веществе головного мозга, а к концу эксперимента в 80% случаев происходит увеличение размеров иммунокомпетентных органов (селезёнки, перибронхиальных и мезентериальных лимфатических узлов), а также увеличение массы тела в среднем на 25% в отличие от группы сравнения.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в результате проведенного комплексного морфологического исследования структурных изменений опухолевых и нормальных клеток под действием флавоноидсодержащих экстрактов было установлено, что гибель клеток происходит преимущественно путем апоптоза, который реализуется через механизм активации каспазы-3, а морфологическим критерием и предиктором развития резистентности опухоли к противоопухолевым препаратам является экспрессия белка LC3B – маркера аутофагии.

### **Выводы:**

1. Установлено, что в неопухолевых клетках почки эмбриона свиньи SPEV и опухолевой культуре HeLa при действии экстракта аврана в концентрации 1,5 мг/мл морфологические признаки повреждения имеют сходный характер и проявляются вакуолизацией цитоплазмы, округлением формы клеток, развитием кариорексиса. Однако в клетках почки эмбриона свиньи SPEV гибель клеток развивается в  $0,6 \pm 0,5\%$  случаев, а в опухолевой культуре HeLa – в  $41,5 \pm 5\%$  случаев, что в 66 раз больше.

2. Наиболее информативными морфологическими показателями для оценки противоопухолевой эффективности флавоноидсодержащих экстрактов являются: общее количество клеток в поле зрения, а также количество клеток в поле зрения живых, мертвых, с аутофагосомами,

фигурами митоза и признаками апоптоза. Полученные данные позволяют вычислить показатели LC50 и AC50, отражающие цитотоксическую и апоптотическую активности в нормальных и опухолевых клетках в экспериментах *in vitro*.

3. Анализ частоты развития апоптоза в опухолевых клетках человека (HeLa; SK-BR-3, MCF-7; Jurkat; A549; PC-3; HCT-116; A498, Caki) методом проточной цитофлуориметрии с окраской аннексином V и йодистым пропидием показал, что апоптоз развивается во всех изученных опухолевых культурах только под воздействием экстракта аврана, причем самые высокие показатели частоты развития апоптоза:  $96,3 \pm 2,7\%$ ,  $96,8 \pm 5,5\%$  и  $89,5 \pm 3,3\%$  наблюдаются в культурах SK-BR-3, MCF-7 и A498, соответственно.

4. Морфологические изменения, развивающиеся в изученных опухолевых клетках человека *in vitro* под действием флавоноидсодержащего экстракта аврана, зависят от его концентрации. Установлена прямая корреляционная связь между концентрацией экстракта и количеством погибших клеток и обратная корреляционная связь между концентрацией экстракта и количеством клеток с аутофагосомами, а также между количеством клеток с аутофагосомами и количеством погибших клеток. Так, при концентрации от 0,09 мг/мл до 0,2 мг/мл происходит активация цитопротекторной аутофагии; от 0,2 мг/мл до 0,8 мг/мл – подавление цитопротекторной аутофагии; от 0,375 мг/мл до 1,5 мг/мл – гибель клеток через апоптоз, а начиная с концентрации 3 мг/мл – гибель клеток через некроз.

5. Активация апоптоза в перевитых опухолях под действием экстракта аврана происходит как митохондриальным (p53, Bax), так и сигнальным путем (Fas/APO-1 и Fas-ligand), а реализация его осуществляется через активацию каспазы-3.

6. Аутофагия, развивающаяся в опухолевых клетках, имеет цитопротекторный характер и завершается либо восстановлением структуры клетки, либо ее гибелью через апоптоз. Выявление признаков аутофагии в изученных культурах опухолевых клеток человека и в перевитых опухолях с

помощью маркера LC3B (иммунофлуоресцентным и иммуногистохимическим методами) является морфологическим критерием развивающейся резистентности опухоли к воздействию экстракта аврана с противоопухолевым эффектом.

7. Вне зависимости от гистогенеза перевитой опухоли животных (рак печени РС-1, рак почки РА, саркома 45) при введении экстракта аврана в опухоли развивается патоморфоз 2-3 степени: снижается транскрипционная и пролиферативная активность (Ki67; EGFR), происходит остановка клеточного цикла и переход клеток в период G0 (Ki67), блокируется ангиогенез (VEGF) и активируется апоптоз (p53, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand), блокируется протекторная аутофагия (LC3B). Особенности патоморфоза в перевитой саркоме 45 является замещение опухолевой ткани фиброзной, а в раке почки РА – развитие гигантоклеточного патоморфоза.

8. В паренхиме внутренних органов лабораторных животных с перевитыми опухолями наблюдалось развитие дистрофических и некротических процессов, отека, кровоизлияний, выраженного полнокровия. После введения экстракта аврана отмечалось уменьшение морфологических признаков повреждения и нарушения кровообращения в органах, увеличение истинной массы тела животных в среднем на 15%.

### **Практические рекомендации**

1. Для объективной оценки развивающихся морфологических изменений в клетках опухолевых культур под действием растительных экстрактов, содержащих флавоноиды, рекомендуется использовать тест «живые и мертвые» при одновременной окраске йодистым пропидием и акридиновым оранжевым и применять наиболее информативные показатели: среднее количество клеток в поле зрения; долю клеток с аутофагосомами; активность роста – соотношение среднего количества клеток при воздействии к среднему количеству клеток в контроле. При использовании витальных красителей (Хехст и др.) следует учитывать такие показатели, как: среднее количество живых клеток в поле зрения; индекс пролиферации – соотношение

среднего количества живых клеток в поле зрения при воздействии экстракта, к среднему количеству живых клеток в поле зрения в контроле; индекс апоптотической активности.

2. Предлагаем считать морфологическими признаками чувствительности клеток культуры опухоли к воздействию экстрактов следующие показатели: снижение среднего количества клеток или среднего количества живых клеток; активности роста или индекса пролиферации; отсутствие фигур митоза; повышение доли мертвых клеток, клеток с пикнозом ядра и ядром в виде серпа от общего количества живых клеток, доли клеток в апоптозе более 11%; отсутствие аутофагосом в клетках опухоли.

3. Для оценки эффективности лечебного патоморфоза в перевитых опухолях животных в эксперименте рекомендуется проводить оценку атрофических изменений (размеры клеток, ядра, количество клеток в поле зрения); пролиферативной активности (количество митозов, окраска на маркеры Ki67 и EGFR); количества РНК и ДНК (с помощью окраски по Браше); степени повреждения поверхностных мембран (окраска лектином зародышей пшеницы WGA и PAS-реакция); выраженности ангиогенеза (экспрессия маркера VEGF), аутофагии (экспрессия маркера LC3B) и апоптоза (p53, Bcl-2, Bax, CD95 (Fas/APO-1), Fas-ligand).

4. Для оценки морфологических признаков резистентности опухолевых клеток к противоопухолевой терапии рекомендуется использовать иммуногистохимический маркер LC3B, позволяющий установить образование аутофагосом в опухолевых клетках, являющихся предиктором ее развития.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы исследования**

Основные результаты проведённого диссертационного исследования, помимо ответов на вопросы теоретической и практической медицины, открывают и широкие для научного поиска в указанных направлениях. В теоретическом аспекте, безусловно, актуально проведение исследований, касающихся особенностей механизмов реализации апоптоза и аутофагии и их

взаимосвязи, а также значение их генетической детерминированности в опухолевых клетках при действии на них флавоноидов. Несомненно, перспективным направлением является продолжение уточнения роли активации аутофагии в опухолевых клетках в процессе формирования их резистентности к лечению. В практическом аспекте – это поиск наиболее информативных и специфичных иммуногистохимических маркеров аутофагии для конкретных типов опухолей человека и в дальнейшем разработка на их основе критериев морфологической оценки эффективности противоопухолевой терапии или развития резистентности к ней у каждого конкретного пациента.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АС50 – концентрация, при которой 50% клеток находятся в апоптозе

LC50 – концентрация, при которой погибает 50% клеток

НК – натуральные киллеры

АФК – активная форма кислорода

БАВ – биологически активные вещества

ВЗУ – кукуруза, выросшая в засушливых условиях

ВОУ – кукуруза, выросшая при обычных условиях увлажнения

ИТРО – индекс торможения роста опухоли

ИФН – интерферон

ЛР – лекарственные растения

ОП – олигомерные проантоцианидины

П.Н.О. – пара олигонуклеотидов

ПКГ – программированная клеточная гибель

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СКЖК – среднее количество живых клеток

СКК – среднее количество клеток в поле зрения

ФНО- $\alpha$  – фактора некроза опухоли альфа

ШАА – Шаперон-ассоциированная аутофагия

ЯЦИ – ядерно-цитоплазматический индекс

### Список литературы

1. Автандилов, Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия. – М.: Медицина, 2006. – 192 с.
2. Агапова, Л.С. Прогресс в изучении молекулярных основ онкогенеза и новые способы контроля опухолевого роста / Л.С. Агапова, Б.П. Копнин // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2007. – № 11. – С. 3–9.
3. Андреева, Ю.Ю. Определение возможности таргетной терапии рака желудка / Ю.Ю. Андреева, Г.А. Франк // Архив патологии. – 2012. – Том.74. – №4. – С. 21–26.
4. Бабушкина, Н.А. Моделирование эффективности действия противоопухолевых препаратов в сверхмалых дозах для оптимизации режимов их введения / Н.А. Бабушкина, Л.А. Островская, В.А. Рыкова [и др.] // Проблемы управления. – 2005. – № 4. – С. 47–54.
5. Башмакова, Т.В. Лимфатический регион матки крыс после введения химиотерапевтических средств с коррекцией экстрактом *Pentaphylloides fruticosa*: диссертация ... кандидата медицинских наук: 14.00.15 / Башмакова Татьяна Владимировна; [Место защиты: ГУ "Научно–исследовательский институт региональной патологии и патологической морфологии Сибирского отделения РАМН"]. – Новосибирск, 2005.– 201 с.: ил.
6. Белоусов, Ю.Б. Критерии эффективности и безопасности в фармакотерапии / Ю. Б. Белоусов. – М.: МИА.– 2015. – 366 с.
7. Билык, О.В. Биофлавоноид кверцетин и перспективы его использования в медицине / О.В. Билык, В.К. Рыбальченко, Б.П. Романюк // Загальна патологія та патол. фізіологія. – 2007. – Т. 2, №1.– С. 4–9.
8. Бочарова, О.А. Комплексные фитоадаптогены в онкологии / О.А. Бочарова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2009. – № 8. – С. 21–25.
9. Булаев, В.М. Безопасность и эффективность лекарственных растений: учеб. пособие / В.М. Булаев, Е.В. Ших, Д.А. Сычев. — М.: Практическая

медицина, 2013. — 272 с.

10. Булаев, В.М. Современная фитотерапия / В.М. Булаев, Е.В. Ших, Д.А. Сычев. – М. : МЕДпресс–информ, 2011. – 144 с.

11. Бунятян, Н.Д. Гепатопротективное действие эллаготанинов / Н.Д. Бунятян, В.В. Чикиткина, Л.В. Яковлева // Экспериментальная и клиническая фармакология – 1988. – Т.61, № 5. – С. 53–55.

12. Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии / В.М. Перельмутер, М.В. Завьялова, С.В. Вторушин [и др.]. // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – №3. – С. 58–64.

13. Владимирова, Л.Ю. Возможности использования фактора некроза опухоли– тимозин– $\alpha 1$  в неoadъювантной химиотерапии рака молочной железы / Л. Ю. Владимирова, Н.А.Подзорова, Е.М. Непомнящая, Е.Ю. Златник // Медицинский совет.–2016.– №10.– с. 38–43.

14. Влияние экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) на экспрессию маркера пролиферации ki67 и маркера апоптоза p53 в перевиваемом раке почки (РА) лабораторных крыс / Н.А. Наволокин, Д.А. Мудрак, Н.В. Полуконова, [ и др.] // Злокачественные опухоли. – 2017. – Т.7, № 3. – С. 133–134.

15. Вознесенская, И.А. Папилломы гортани / И.А. Вознесенская. – М., Медгиз. – 1958. –144 с.

16. Гибель клетки (апоптоз). / Е.Ф.Лушников, А.Ю. Абросимов, В.Л. Габай [и др.] – М: Медицина, 2001. – 192 с.

17. Гланц С. Медико–биологическая статистика. — М.: Практика, 1998. — 459 с.

18. Горбунова, В.А. Новые подходы в лекарственном лечении сарком мягких тканей / В.А. Горбунова // Поволжский онкологический вестник. – 2012. – № 2. – С. 25–34.

19. Гржибовский, А. М. Анализ трех и более независимых групп

количественных данных / А. М. Гржибовский // Экология человека. - 2008. - № 3. - С. 50-58. - Библиогр.: С. 58.

20. Гурьянцева, Л.А. Новые препараты – стимуляторы грануломоноцитопоеза / Л.А. Гурьянцева, Н.С. Поженко., Т.Ю. Хричкова // Бюл. СО РАМН. – 2000. – № 2. – С.53 – 58.

21. Давыдов, М.И. Рациональная фармакотерапия в онкологии: руководство для практикующих врачей / М. И. Давыдов. – М. : Литтерра, 2015. – 844 с.

22. Давыдов, М.И. Экспериментальная онкология на рубеже веков / М. И. Давыдов, А. Ю. Барышников. – М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – 551 с.

23. Даирова, Л.П., Гистологические и гистохимические изменения в перевиваемых опухолях крыс при действии препаратов из группы флавоноидов: автореферат ... кандидата медицинских наук: 14.00.14 / Даирова Лидия Музаппаровна; [Место защиты: Алма–Атинский государственный медицинский институт]. – Алма–Ата, 1974.– 25 с.: ил.

24. Дапэн, Л. Обзор клинических испытаний канглайта для инъекций, проведенных за границей / Л. Дапэн, М. И. Давыдов // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 113–115.

25. Действие экстрактов левзеи сафлоровидной на биосинтез РНК и белков в органах мыши / И.Н. Тодоров, Ю.И. Митрохин, О.И. Ефремова [и др.] // Хим.–фарм. журн.– 2000.– Т. 34. – № 9. – С. 24–26.

26. Дерягина, В.П. The effect of flavonoids and indoles on growth of ehrlich adenocarcinoma in mice / В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова // Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. – 2009. – Т. 20. – №1. С. 10–15.

27. Джахангирова, М.А. Экспериментальная оценка стимулирующего влияния суммарных экистероидных препаратов из *SileneBrahuisa* и *SileneViridiflora* на эритроцитопоез у лабораторных животных / М.А. Джахангирова, В.Н. Сыров // Патология. – 2005. – № 2.– С. 7–9.

28. Долгова, В.П. Патологические изменения, возникающие в организме мышей, обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной днк / В.П. Долгова, Н.А. Николин, В.Е. Попова // ВаВилоВский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т.17. – №.1. – С. 129–146.

29. Запускалова, О.Б. Морфологическое и функциональное состояние лимфоидной ткани в отдаленные сроки после введения цитостатических препаратов: автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.00.25; 14.00.16 / АМН СССР. НИИ фармакологии Том. науч. центра. – Томск, 1989. – 26 с.

30. Иванов, С.Д. Современные тенденции разработки молекулярных предиктивных маркеров ответа на лучевую и химио–лучевую терапию онкологических заболеваний / С.Д. Иванов // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2011. – Т.56. – №5. – С. 44—55.

31. Изменения лейкоцитарной формулы, красного костного мозга и опухоли лабораторных крыс с перевитой саркомой–45 при введении экстрактов аврана лекарственного, бессмертника песчаного, кукурузы антациановой / Н.А. Наволокин, Д.А. Мудрак, С.А. Тычина, Н.В. Корчаков // Саратовский научно–медицинский журнал. – 2015. –Т.11, № 3. – С. 328–332.

32. Изменения микроциркуляции в тканях матки крыс после введения комплекса химиотерапевтических препаратов. / В.Е. Войцицкий, И.В. Майбородин, В.И. Майбородина [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия: Приложение. – 2006. – С. 35–36.

33. Иммуногистохимия в оценке степени патоморфоза злокачественных новообразований / С.А. Мозеров, Ю.А. Комин, Е.С. Мозерова [и др.] // Здоровье и образование. – 2016– Т. 18. – №. 11. – С. 108–116.

34. Капля, О.А. Влияние экстракта шлемника байкальского и его комбинации с циклофосфаном на состояние системы естественной цитотоксичности у мышей с карциномой легких Льюис / О.А. Капля, Е.Ю. Шерстобоев, Е.П. Зуева // Бюл. exper. биол. – 2004. – Т. 137. – № 5. – С. 538–

541.

35. Каприн, А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. – 2018. – 250 с.

36. Киселев, В.В. О составе колхицина и новом алкалоиде колхамине / В.В. Киселев, Г.П. Меньшиков, Л.А. Беэр // ДАН СССР. – 1952. – Т. 87. – С. 227–228.

37. Клетки по Льюину ред.: Л. Кассимерис, ред.: В.П. Лингаппа, ред.: Д. Плоппер, пер.: И.В. Филиппович. — 3-е изд. (эл.). — М.: Лаборатория знаний, 2018. — 1059 с.

38. Ковалева, О.В. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? / О.В. Ковалева, М.С. Шитова, И.Б. Зборовская // Клиническая онкогематология. – 2014. – Т. 7. – С. 103–113.

39. Копнин, Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения / Б.П. Копнин // Практическая онкология. – 2002. – № 4. – С. 229–235.

40. Корман, Д.Б. Альтернативная терапия рака / Д. Б. Корман. – М. : Практическая медицина, 2016. – 192 с.

41. Корман, Д.Б. Альтернативная лекарственная терапия рака / Д.Б. Корман // Злокачественные опухоли. – 2012. – Т. 2. – № 2. – С. 68–76.

42. Корман, Д.Б. Альтернативная терапия рака / Д.Б. Корман // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8, № 4 (32). – С. 236–244.

43. Корман, Д.Б. Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов / Д.Б. Корман. – М.: Практическая медицина, 2014. – 336 с.

44. Корман, Д.Б. Основы противоопухолевой терапии / Д.Б. Корман. – М. : Практическая медицина, 2006. – 512 с.

45. Коросов, А.В. Количественные методы экологической токсикологии: Учебное–методическое пособие / А.В. Коросов, Н.М. Калинкина. – Петрозаводск, 2003. – 52 с.

46. Корсун, В.Ф. Клиническая фитотерапия в онкологии./ В.Ф. Корсун, К.А. Трескунов – Минск: «Белоруская навука», 2003. – 366 с.
47. Краевский, Н.А. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека: Руководство. т. 1–2. 4–е изд. / Н.А. Краевский, А.В. Смольянный, Д.С. Саркисов, – М.: Медицина; 1993. – 688 с.
48. Краевский, Н.А. Проблемы патоморфоза опухолей / Н.А. Краевский // Вестник Академии медицинских наук СССР. – 1976. – №. 6. – С. 3—4.
49. Лимарева, С.В. Таксаны в адъювантной и неоадъювантной терапии рака молочной железы / Лимарева С.В. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2010. – Т.4. – С. 15–23.
50. Лушников, Е.Ф. Лучевой патоморфоз опухолей человека. 45. / Е.Ф. Лушников. – М.: Медицина; 1977. – 328 с.
51. Максютин, Н.П. Экспериментальные и клинические исследования лг карстовых форм из листьев подорожника большого в онкологии / Н.П. Максютин // 2-я Республиканская конференция по медицинской ботанике Киев, 1988. – С. 375–376.
52. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Под ред. Р.У. Хабриева. М, 2005. – 832 с.
53. Молекулярные основы генетической нестабильности опухолевых клеток / Б.П. Копнин, Л.С. Агапова, Ю.Л. Володина [и др.] – Отчет о НИР № 96–04–48180 (Российский фонд фундаментальных исследований).
54. Мосейчук, И.П. Эффективность растительных флавоноидов при хроническом поражении печени ксенобиотиками / И.П. Мосейчук // 2-я Республиканская конференция по медицинской ботанике. Киев, 1988. – С. 383.

55. Мосейчук, И.П. Эффективность растительных флавоноидов при хроническом поражении печени ксенобиотиками / И.П. Мосейчук // 2-я Республиканская конференция по медицинской ботанике. Киев, 1988. – С. 383.
56. Опыт применения мульти– спиральной КТ для оценки эффективности химиолучевой терапии рака желудка / Н.К. Силантьева, Т.А. Агабабян, В.Ю. Скоропад, [и др.] // Медицинская визуализация. – 2011. – Т.3. – С. 112—124.
57. Островская, Л.А. Противоопухолевая эффективность совместного воздействия низкоинтенсивного магнитного поля и сверхмалых доз хтс узкого спектра / Л. А. Островская, М. И. Будник, Д. Б. Корман // Тез. докл. III Междунар. симпозиума "Механизмы действия сверхмалых доз" (3–6.12.2002). – Москва, 2002. – С. 10– 25.
58. Островская, Л.А. Чувствительность экспериментальных опухолевых моделей к сверхмалым дозам хтс / Л.А. Островская, Н.И. Биохтарова, Е.Б. Бурлаков // Тез. докл. III Междунар. симпозиума "Механизмы действия сверхмалых доз" (3—6.12.2002). — Москва, 2002. — С. 10– 26.
59. Оценка противоопухолевой и антикахексической активности экстракта аврана лекарственного (*Gratiola Officinalis* L.) у крыс с перевитой саркомой / Н.А. Наволокин, Д.А. Мудрак, Н.В. Полуконова, [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2016. –Т.15, № 1. – С. 37–43.
60. 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 // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 6. – С. 19–23.
61. Патоморфоз рака желудка при неoadъювантной пролонгированной химиолучевой терапии с последующей гастрэктомией d2 / Е.Ф.Лушников, А.Ю. Абросимов, Б.А. Бердов, [и др.] // Сибирский

онкологический журнал. – 2014. – Т.1. – С. 5–10.

62. Перушкова, А.М. Иммунотропная активность флавоноидов надземной части горца змеиноного и лапчатки прямостоячей / А.М. Перушкова, Н.В. Макаров, Л.Н. Крюкова // Известия АН Каз. ССР. Сер. Биология. – 1991. – № 1. – С. 78–80.

63. Пимкина, Ю.С. Роль опухолевого супрессора ARF в онкогенезе / Ю.С. Пимкина, А.Е. Доросевич // Архив патологии. – 2009. – Т. 71. – №.1 – С. 60–63.

64. Преимущества и возможности флуоресцентных методов для визуализации апоптоза и аутофагии в опухолевых клетках человека *in vitro* / Н.А. Наволокин, Н.В. Полуконова, Д.А. Мудрак, [и др.] // Оптика и спектроскопия. – 2019. – Том. 126. – Вып. 6. – С. 773–782.

65. Пупышев, А.Б. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты / А. Б. Пупышев // Цитология. – 2014. – Т.56. – № 3. – С. 179–196.

66. Райхлин, Н. Т. Регуляция и проявления апоптоза в физиологических условиях и в опухолях / Н. Т. Райхлин, А. Н. Райхлин // Вопросы онкологии. – 2002. – № 2. – С. 159–171.

67. Растения в комплексной терапии опухолей / Е. Д. Гольдберг, Т.Г. Разина, Е.П. Зуева и др. [и др.]. – М.: Издательство РАМН, 2008. – 232 с.

68. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

69. Самылина, И.А. Лекарственные растения, обладающие гормональной активностью: проблема безопасности / И.А. Самылина, В. М. Булаев, Е. В. Ших // Фармация. – 2011. – № 1. – С. 38–41.

70. Самылина, И.А. Проблемы безопасности лекарственных растений, содержащих эндогенные токсичные вещества / И. А. Самылина, В. М. Булаев // Фармация. – 2009. – 3. – С. 6–8.

71. Самылина, И.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии: Анализ растительного сырья и его применения в медицине / И.А. Самылина. – МИА, 2008. – 288 с.
72. Самылина, И.А. Токсикофармакологические эффекты лекарственных растений и сырья. Учебное пособие по фармакогнозии. / И.А. Самылина. – М. 2008. – С. 318.
73. Сверхмалые дозы биологически активных веществ как основа лекарственных препаратов для ветеринарии / М. Б. Славецкая [и др.]. – М.:Аквариум; 2012. – 168 с.
74. Сенькова, А.В. Взаимоотношение процессов прогрессирования множественной лекарственной устойчивости в опухоли и морфологических изменений в печени у мышей с перевиваемой лимфосаркомой RLS40 в условиях полихимиотерапии / А.В. Сенькова, Т.А. Агеева, М.А. Зенкова // Бюллетень СО РАМН. – 2011. – №2. – С.87–93.
75. Серов, В.В. Общепатологические подходы к познанию болезни. / В.В. Серов – М.: Медицина; 1999. – 302 с.
76. Скибо Ю.В., Методы исследования программируемой клеточной гибели: Учебно–методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза» / Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова. – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011.– 61 с.
77. Ставровская, А.А. Новое в изучении множественной лекарственной устойчивости клеток рака молочной железы / А.А. Ставровская, Г.П. Генс // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т.2. – №1. – С. 39–51.
78. Таксотер и нитрозометилмочевина – экспериментальная оценка эффективности совместного применения / Д.Б. Корман [и др.] // Вопросы онкологии. – 1999. – № 4. – С. 429–433.
79. Тутельян, В.А. Безопасность и эффективность биологически активных веществ растительного происхождения / В.А. Тутельян, Ю.Б. Белоусов, К.Г. Гуревич // М. – 2007. – С. 316.

80. Тутельян, В.А. Биологически активные вещества растительного происхождения. Распространенность, пищевые источники, биодоступность / В.А. Тутельян, Н.В. Лашнева // Вопросы питания. – 2008. – Т. 77, № 1. – С. 4–19.
81. Тюляндин, С.А. Ингибиторы тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста у больных немелкоклеточным раком легкого: 10 лет СПУСТЯ / С.А. Тюляндин, Д.А. Носов // Злокачественные опухоли. – 2012. – Т.1. – №2. – С. 5–13
82. Характеристика антирадикальной активности экстрактов из растительного сырья и содержание в них дубильных веществ и флавоноидов / М.Н. Макарова, В.Г. Макаров, Н.М. Станкевич [и др.] // Растит. ресурсы. 2005.– Т. 41. – Вып. 2. – С. 106–115.
83. Харкевич, Д.А. Фармакология: Учебник. – 10-е изд., перераб., доп. и испр./ Д.А. Харкевич – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2008. – 750 с.
84. Цыб, А.Ф. Терапевтическая радиология: Руководство для врачей / А.Ф. Цыб, Ю.С. Мардынский. – М.: Медицинская книга, 2010. – 552 с.
85. Чекнев, С.Б. Естественная цитотоксичность в комплексе межклеточных взаимодействий / С.Б. Чекнев // Вести. РАМН.– 1999.– № 4.– С. 30–34.
86. Чиссов, В.И. Злокачественные новообразования в России в 2001—2011 годах (заболеваемость и смертность). / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена; 2012. – 289 с.
87. Экспрессия маркеров апоптоза и аутофагии в перевитой саркоме–45 у крыс при введении флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) / Н.А. Наволокин, Г.Н. Маслякова, Д.А. Мудрак, [и др.] // Экспериментальная и клиническая морфология. – 2019. – Т29. – №1. – С. 56–62.
88. Экспрессия маркеров апоптоза и аутофагии в перевитом раке почки у крыс при введении флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*GRATIOLA OFFICINALIS* L.) / Н.А. Наволокин, Г.Н.

Маслякова, Н.В. Полуконова, [и др.] // Архив патологии. –2019. – Т.81. – №1. – С. 24–30.

89. A high-throughput screen identifies the long non-coding RNA DRAIC as a regulator of autophagy / Tiessen I., Abildgaard MH., Lubas M., [et al.] // *Oncogene*. –2019. – Vol.38. – №26. – P.5127–5141.

90. A new extraction method of bioflavonoids from poisonous plant (*Gratiola Officinalis* L.) / N.A. Navolokin, N.V. Polukonova, M.N. Kurchatova, [et al.] // *Russian Open Medical Journal*. – 2014. – Vol. 3, № 3. – P. 304.

91. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival / K.N. Ogston, I.D. Miller, S. Payne, [et al.] // *Breast*. – 2003. – Vol. 12. – №5. – P. 320–327.

92. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation / Y. Ichimura, T. Kirisako, T. Takao, [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 408. – P. 488–492.

93. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes/ D.J. Klionsky, J.M. Cregg, W.A. Jr. Dunn, [et al.] // *Dev Cell*. – 2003. – Vol.5. – P.539–545.

94. AAV-Mig-6 Increase the Efficacy of TAE in VX2 Rabbit Model, Is Associated With JNK Mediated Autophagy / Z. Li, Y. Tian, L. Qu, [et al.]// *Journal of Cancer*. –2019. – Vol. 10. – N. 4. – P.1060–1069.

95. Abbruzzese, J. L. A phase clinical, plasma and cellular pharmacology study of gemcltabine / J. L. Abbruzzese, R. Grunewald, E. A. Weeks // *J. Clin. OncoL*. – 1991. – Vol. 12. – P. 1535–1540.

96. Abbruzzese, J.L. Carcinoma of the pancreas: special issue editor / J.L. Abbruzzese // *The Cancer Journal from Scientific American*. – 2001. V.7. –№ 4. – P. 241.

97. Abbruzzese, J.L. Molecular diagnosis of pancreatic and biliary cancer: ready for broad implementation? / J. L. Abbruzzese // *The Cancer Journal from Scientific American*. – 2000. – V. 6. – № 5. – P. 282–284.

98. Activated CRH receptors inhibit autophagy by repressing conversion

of LC3BI to LC3BII / L. Jin, Y. Qian, J. Zhou, [et al.]//Cellular Signalling. – 2019. – Vol. 58. – P. 119–130.

99. Activation of Bax and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis / H. Kim, H.C. Tu, D. Ren, [et al.] // Mol Cell. – 2009. – Vol. 36. – P. 487–499.

100. Adrenergic modulation of AMPK–dependent autophagy by chronic stress enhances cell proliferation and survival in gastric cancer / X. Zhi, B. Li, Z. Li, [et al.] // International Journal of Oncology. – 2019. – Vol. 54. – N. 5. – P.1625–1638.

101. Ageing in Drosophila: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network / L. Partridge, N. Alic, I. Bjedov, M.D. Piper // Exp Gerontol. – 2011. – Vol. 46. – N.5. – P. 376–381.

102. Agrawal, A. Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies / A. Agrawal, M.T. Lynskey // Addiction. – 2008. – Vol.103. – №7. – P.1069–1081.

103. An evaluation of selected herbal reference texts and compassion to published reports of adverse herbal events / C. A. Hallen, IB Anderson, S. V. Kim, P.D. Blanc // Actv. Drug React. Toxicol. Rev. – 2002. – Vol.21. – P.143–150.

104. Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of radionuclide imaging / H. Kenis, H.R. Zandbergen, L. Hofstra, [et al.] // Journal Nucl Med. – 2010. – Vol. 51. – P. 259–267.

105. Anticachectic effects of Coptidisrhizoma, an anti–inflammatory herb, on cancer cells that produce interleukin 6 / N. Lizuka, K. Miyamoto, S. Hazama, [et al.]// Cancer Lett. – 2000. – Vol.158. – №1. – P.35–41.

106. Anticancer activities of chalcone flavokawain B from *Alpinia pricei* Hayata in human lung adenocarcinoma (A549) cells via induction of reactive oxygen species–mediated apoptotic and autophagic cell death / YC. Hseu, YC. Huang, V. Thiyagarajan, [et al.] // Journa of Cellular Physilogy. – 2019. – Vol. – Iss.10.– P.17514–17526.

107. Antimetastatic effect of a standardized mistletoe preparation on B16 melanoma cells in mice/ U. Mengs, K. Weber, T. Schwarz [et al.] // European Journal of Cancer. – 1997. – Vol. 33. – № S5. – P.S48.
108. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis / H.W. Leung, C.L. Kuo, W.H. Yang [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – Vol. 534. – N 1–3. – P.12–18.
109. Antrodin C, an NADPH Dependent Metabolism, Encourages Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Lung Carcinoma Cells by Use of an AMPK Inhibition–Independent Blockade of the Akt/mTOR Pathway / H. Yang, X. Bai, H. Zhang, [et al.] // Molecules. –2019. – Vol. 24. – N. 5. – P. 993
110. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl–2 homologs, not Bax or Bak. // S.N. Willis, J.I. Fletcher, T. Kaufmann [et al.] / Science. – 2007. – Vol. 315. – P. 856–859.
111. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up–regulation of Beclin–1 / W. Qian, J. Liu, J. Jin, [et al.] // Leuk Res. – 2007. – Vol. 31. №3. – P. 329–339.
112. Ashkenazi, A. Death receptors: signaling and modulation / A. Ashkenazi, V.M. Dixit // Science. – 1998. – Vol. 281. – P. 1305–1308.
113. Autophagic degradation of active caspase–8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis / W. Hou, J. Han, C. Lu, [et al.]. // Autophagy. – 2010. –N.6. –P. 891–900.
114. Autophagy induction by low–dose cisplatin: the role of p53 in autophagy/ K.H. Cho, J.H. Park, K.B. Kwon [et al.] // Oncol. Rep. – 2014. – T. 31. – Vol. 1. – P. 248–254.
115. Autophagy inhibitors regulate TRAIL sensitivity in human malignant cells by targeting the mitochondrial network and calcium dynamics / A. Onoe–Takahashi, M. Suzuki–Karasaki, M. Suzuki–Karasaki, [et al.] // International Journal of Oncology. –2019. – Vol.54. – №5. – P. 1734–1746.
116. Autophagy protein microtubule–associated protein 1 light chain–3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke–induced

emphysema/ Z.N. Chen, H.C. Lam, Y. Jin [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107. – N 44. – P. 18880–18885.

117. Autophagy suppresses the pathogenic immune response to dietary antigens in cystic fibrosis / VR.Villella, S. Esposito, E.Ferrari, [et al.] // Cell Death & Disease. – 2019. – Vol. 10. – P. 258.

118. Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. / A.B. Werner, E. de Vries, S.W. Tait, [et al.] // J Biol Chem. – 2002. – Vol. – 277. – №25. – P.22781–22788.

119. Bergmann, A. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration / A. Bergmann, H. Steller // Science Signaling. – 2010. – Vol.3. – № 145. – P. 8.

120. Beyer, L.A. Historical perspective on the use of animal bioassays to predict carcinogenicity: evolution in design and recognition of utility / L. A. Beyer, B. D. Beck, T. A. Lewandowski // Critical Reviews in Toxicology. – 2011. – Vol. 41. – №4. – P. 321–338.

121. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the Bax- and BAK-dependent cell death program.// D. Ren, H.C. Tu, H. Kim, [et al.] / Science. – 2010. – Vol. 330. – P. 1390–1393.

122. Blocking autophagy flux promotes interferon- $\alpha$ -mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma / W. Yang, C. Jiang, W. Xia, [et al.] // Cancer Letters. – 2019. – Vol. 451. – P. 34–47.

123. Braud, A. Primary chemotherapy combining vinorelbine, cyclophosphamide and epirubicin (NEC) in locally advanced breast cancer (LABC): final results of a phase II study / A. Braud, E. Levy, Y. Kirova // Proc Am Soc Clin Oncol. – 2000. – Abstr 565.

124. Brown, R. Therapeutic applications of apoptosis research / R. Brown, M. Bamford, G. Waikinsshaw // Exper. Cell Res. – 2000. – Vol. 256. – P. 1–11.

125. Calpain-mediated cleavage of ATG5 switches autophagy to apoptosis/ S. Youse, R. Perozzo, I. Schmid [et al.] // Nat. Cell Biol. – 2006. – Vol. 8. – P. 1124–1132.

126. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic

phosphatidylserine exposure / K. Segawa, S. Kurata, Y. Yanagihashi, [et al.] // Science. – 2014. – Vol. 344. – P.1164–1168.

127. Cathepsin B expression in colorectal cancer in a Middle East population: Potential value as a tumor biomarker for late disease stages / M.H. Abdulla, M.A. Valli–Mohammed, K. Khayal, [et al.] // Oncol Rep. 2017. – Vol.37. – N.6. – P. 3175–3180.

128. Caveolin–1: a multifaceted driver of breast cancer progression and its application in clinical treatment. / X.L. Qian, Y.H. Pan, Q.Y. Huang, [et al.]// Onco Targets and therapy. – 2019. – Vol.12. – P. 1539–1552.

129. Charoensuk, V. Differential cytotoxic effects of arsenic compounds in human acute promyelocytic leukemia cells / V. Charoensuk, W.P. Gati, M. Weinfeld, X.C. Le // Toxicol Appl Pharmacol. – 2009. – Vol. 239. – №1. – P. 64–70.

130. Chen, L. The PVT1/miR–216b/Beclin–1 regulates cisplatin sensitivity of NSCLC cells via modulating autophagy and apoptosis. / L. Chen, X. Han, Z. Hu, L. Chen //Cancer Chemotherapy and Pharmacology. –2019. – Vol.83. – №5. – P.921–931.

131. Chipuk, J.E. How do BCL–2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization // J.E. Chipuk, D.R. Green / Trends Cell Biol. – 2008. – Vol. 18. – P. 157–164.

132. Choi, A.M.K. Autophagy in human health and disease/ A.M.K. Choi, S.W. Ryter, B. Levine // N Engl J Med. – 2013. – Vol. 368. – P. 651–662.

133. CLE–10 from *Carpesium abrotanoides* L. Suppresses the growth of human breast cancer cells (mda–mb–231) in vitro by inducing apoptosis and pro–death autophagy via the pi3k/akt/mtor signaling pathway / L.Tian, F. Cheng, L. Wang, [et al.] // Molecules. –2019. – Vol. 24. – N. 6. – P.1091.

134. Combination Therapy of Chloroquine and C<sub>2</sub>–Ceramide Enhances Cytotoxicity in Lung Cancer H460 and H1299 Cells / H.L. Chou, Y.H. Lin, W. Liu, C.Y. [et al.] // Cancers. – 2019. – Vol. 11. – N. 3. – P. 370.

135. Congenital disorders of autophagy: an emerging novel class of inborn

errors of neuro–metabolism / D. Ebrahimi–Fakhari, A. Saffari, L. Wahlster, [et al.] // *Brain*. – 2016. – Vol. 139. – P. 317–337.

136. Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly (ethylene glycol) / A.S. Janoff, L.D. Mayer, M.S. Webb, [et al.] // *Bioscience Reports*. – 2002. – Vol.22. № 2. – P. 225–250.

137. Correia, A.L. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance / A.L. Correia, M.J. Bissell // *Drug Resist Updat*. – 2012. – Vol.15. – P. 39-49.

138. Corrigendum to "ATG7 Activates an Autophagy–Essential Ubiquitin–like Protein ATG8 through Multi–step Recognition / M.Yamaguchi, K.Satoo, H.Suzuki, [et al.] // *J Mol Biol*. – 2018. – Vol.430. – №9. – P.1402.

139. Cuervo, A.M. Chaperone–mediated autophagy: roles in disease and aging / A.M. Cuervo, E. Wong// *Cell Res*. – 2014. – Vol. 24. – P. 92–104.

140. Cutts, J.H. Effects on hematopoiesis in rats of extracts of *Vinca rosea* / J.H. Cutts, C.T. Beer, R.L. Noble // *Rev. Canad. Biol*. – 1957. –Vol. 16. – P. 476–491.

141. Cutts, J.H. Effects on hematopoiesis in rats of extracts of *Vincarosea* / J.H. Cutts, C.T. Beer, R.L. Noble // *Rev. Canad. Biol*. – 1957. – Vol. 16. – P. 476–491.

142. Czemplik, M. Flavonoid C–glucosides Derived from Flax Straw Extracts Reduce Human Breast Cancer Cell Growth In vitro and Induce Apoptosis / M. Czemplik // *Front Pharmacol*. – 2016.– Vol.7.– P. 282.

143. Danial, N.N. BCL–2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death// N.N. Danial / *Clin Cancer Res*. – 2007. – Vol. 13. – P. 7254–7263.

144. De Smet, P.A. Herbal remedies / P.A. De Smet // *N. Engl. J. Med*. – 2002. – Vol. 347. – P. 2046–2056.

145. De Smet, PA. Health risks of herbal remedies: an update / P.A. De Smet // *Clin. Pharmacol. Ther*. – 2004. – Vol. 76. – P.1–17.

146. Deberardinis, R.J. Cellular metabolism and disease: what do metabolic

outliers teach us? / R.J. Deberardinis, C. B Thompson // *Cell*. – 2012. – Vol. 148. №6. – P. 1132–1144.

147. Dhar, SK. UVB-induced inactivation of manganese-containing superoxide dismutase promotes mitophagy via ROS-mediated mTORC2 pathway activation / S.K. Dhar, I. Batinic-Haberle, D.K. St Clair // *The Journal Of Biological Chemistry*. –2019. – Vol. 294. – №17.– P. 6831–6842.

148. Dickson I. Autophagy inhibitor combination strategies for pancreatic cancer. / I. Dickson // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. –2019. – Vol.16. – №5.– P.262–263.

149. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell / M. Himmji, T. Ohtsuk, E. Fukazawa, [et al.] // *Cancer Letters*. – 2007. – Vol.245. – P. 269—274.

150. Differences in LC3B expression and prognostic implications in oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma patients / K. Lai, S. Matthews, J.S. Wilmott, [et al.] // *BMC Cancer*. – 2018. – Vol. 18. – P. 624.

151. Different standards for reporting ADRs herbal remedies and conventional OTC medicines: face-to-face interviews with 515 of herbal remedies / J Barnes, S.Y. Mills, N.C. Abbot, M. Willoughby, E.Ernst // *Br. J. Clin. Pharmacol*. – 1998. – 45. – P. 496–500.

152. Dihydroartemisinin, an antimalarial drug, induces absent in melanoma 2 inflammasome activation and autophagy in human hepatocellular carcinoma HepG2215 cells / X. Shi, L. Wang, L. Ren, [et al.] // *Phytotherapy Research*. – 2019. – Vol. 33. – №5. – P. 1413–1425.

153. Dittmer, J. The impact of tumor stroma on drug response in breast cancer/ J. Dittmer, B. Leyh, Semin // *Cancer Biol*. – 2015. – Vol.31. – P. 3–15.

154. DNA methylation-mediated Klotho silencing is an independent prognostic biomarker of head and neck squamous carcinoma / Y. Zhu, X. Cao, X. Zhang, [et al.] // *Cancer Management and Research*. – 2019. – Vol. 2019. – N. 11. – P. 1383–1390.

155. Doeer, W. Uber Pathomorphose / W. Doeer // Arztl. Wochensch. – 1956. – Vol. 11. – №6. – P. 121—126.
156. Dworak, O. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy / O. Dworak, L. Keilholz, A. Hoffmann // Int. J. Colorectal Dis. – 1997. – Vol.12. – P. 19–23.
157. Echinacea tennesseensis ethanol tinctures harbor cytokine– and proliferationenhancing capacities. /D. S. Senchina, D. A. McCann, G.N. Flinn, [et al.] // Cytokine. – 2009. – Vol. 46. – №2. – P. 267–272.
158. Effect of flavone acetic acid on Lewis lung carcinoma: evidence for an indirect effect / G.J. Finlay, G.P. Smith, L.M. Fray, B.C. Baguley // J. Natl. Cancer Inst. – 1988. – Vol. 80, N 4. – P. 241–245.
159. Effect of flavonoid–containing extracts on the growth of transplanted sarcoma 45, peripheral blood and bone marrow condition after oral and intramuscular administration in rats / N.A. Navolokin, D.A. Mudrak, A.B. Bucharskaya, [et al.] // Russian Open Medical Journal. – 2017. – Vol. 6, № 3. – P. 304.
160. Effects of obesity and weight loss on mitochondrial structure and function and implications for colorectal cancer risk / S.P. Breininger, F.C. Malcomson, S. Afshar, [et al.] // Proceedings of the Nutrition Society. – 2019. – Vol. 22. – P.1–12.
161. Exosomes from MiR–21–5p–Increased Neurons Play a Role in Neuroprotection by Suppressing Rab11a–Mediated Neuronal Autophagy In Vitro After Traumatic Brain Injury / D. Li, S. Huang, J. Zhu, [et al.] // Medical Science Monitor. –2019. – N. 25. – P. 1871–1885.
162. Extract of Deschampsia antarctica (EDA) Prevents Dermal Cell Damage Induced by UV Radiation and 2,3,7,8–Tetrachlorodibenzo–p–dioxin / A. Zamarrón, E. Morel, SR. Lucena, [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20. – N. 6. – P.1356.
163. Fabbri, L. Primary Cilium in Cancer Hallmarks. / L. Fabbri, F. Bost, N.M. Mazure //International Journal of Molecular Sciences. –2019. – Vol. 20. – N.

6. – P. E1336.

164. Farrugia, G. Oxidative Stress And Programmed Cell Death In Yeast / G.Farrugia, R. Balzan // *Front Oncol.* – 2012. – Vol. 2. – P.64.

165. Feedback Loop Formed by ATG7/Autophagy, FOXO3a/miR-145 and PD-L1 Regulates Stem-Like Properties and Invasion in Human Bladder Cancer / J. Zhu, Y. Li, Y. Luo, [et al.] // *Cancers.* – 2019. – Vol. 11. – N. 3. – P. E349.

166. Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death / B. Zhou, J.Liu, R. Kang, [et al.] // *Seminars in Cancer Biology.* – 2019. – Vol. S1044. – №19. – P. 30006–30009.

167. Fisher, D. E. Apoptosis in anticancer therapy, crossing the threshold / D. E. Fisher // *Cell.* – 1994. – Vol. 78. – P. 539–542.

168. Flavone acetic acid directly induces expression of cytokine genes in mouse splenic leukocytes but not in human peripheral blood leukocytes / Я. Futami, L.A. Eader, K.L. Komschlies [et al.] // *Cancer Res.* – 1991.– Vol. 51. – N 24. – P. 6596–6602.

169. Flavonoid effects relevant to cancer / D.M. Brownson, N.G. Azios, B.K. Fuqua [et al.] // *J. Nutr.* – 2002. – Vol. 132. – №11. – P. 3482–3489.

170. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis / T. Fotsis , M.S. Pepper, E. Aktas, [et al.] // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – №14. – P. 2916–2921.

171. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs / M.K. Chahar, N. Sharma, M.P. Dobhal, Y.C. Joshi // *Pharmacognosy Reviews.* – 2011. – Vol. 9. – P.1–12.

172. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinoma by inducing apoptosis /V. Patel, A. M. Senderwicz, D. Pinto [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol.102. – P. 1674–1681.

173. Gamma-Tocotrienol Induces Apoptosis in Prostate Cancer Cells by Targeting the Ang-1/Tie-2 Signalling Pathway / K.D. Tang, J. Liu, P.J. Russell,

[et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20. – N. 5. – P. 1164.

174. Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer / M. Tanaka, M. Javle, X. Dong, [et al.] // Cancer. – 2010. – Vol.116. – № 22 – P. 5325–5335.

175. Gene expression profiles of transcription factors and signaling molecules in the ascidian embryo: towards a comprehensive understanding of gene networks / K.S. Imai, K. Hino, K. Yagi, [et al.] // Development. 2004. – Vol.131. – №16. – P.4047–4058.

176. Goussetis, D.J. Autophagy is a critical mechanism for the induction of the antileukemic effects of arsenic trioxide / D.J. Goussetis, J.K. Altman // J Biol Chem. – 2010. – Vol. 285. – №39. – P. 29989–29997.

177. Hardwick, J.M. Multipolar functions of BCL-2 proteins link energetics to apoptosis/ J.M. Hardwick, Y.B. Chen, E.A. Jonas // Trends Cell Biol. – 2012. – Vol. 22. – P. 318–328.

178. Herbst, R.S. Oblimersen Sodium (Genasense bcl-2 Antisense Oligonucleotide): a rational therapeutic to enhance apoptosis in therapy of lung cancer / R.S. Herbst, S.R. Frankel // Clin Cancer Res. – 2004. Vol.12. – P. 4245s–4248s.

179. HERC3-mediated SMAD7 ubiquitination degradation promotes autophagy-induced EMT and chemoresistance in glioblastoma / H. Li, J. Li, L. Chen, [et al.] // Clinical Cancer Research. –2019. – P. 3791.2018

180. Hetts, S.W. To die or not to die / S.W. Hetts // JAMA. – 1998. – Vol. 279. – P. 300–307.

181. High expression of Beclin-1 predicts favorable prognosis for patients with colorectal cancer / Z. Yang, R.A. Ghoorun, X. Fan, [et al.] // J . Clin Res Hepatol Gastroenterol. – 2015. – Vol. 39. – P. 98–106.

182. High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma / J.Y. Tang, E. Hsi, Y.C. Huang, [et al.] // Hum

Pathol. – 2013. – Vol. 44. – P. 2558–2562.

183. High-selective HDAC6 inhibitor promotes HDAC6 degradation following autophagy modulation and enhanced antitumor immunity in glioblastoma. / J.R. Liu, C.W. Yu, P.Y. Hung, [et al.] // *Biochemical Pharmacology*. – 2019. – Vol. 163. – P. 458–471.

184. Hodes, M.E. Vincalcoblastine. Preliminary clinical studies / M.E. Hodes, R.J. Rohn, W.H. Bond // *Cancer Res.* – 1960. – Vol. 20. – P 104–148.

185. Holmes, F. Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer / F. Holmes, R. Walters, R. Theriault // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1991. – Vol. – 83. P. 1797–1805.

186. Hsiang, Y.H. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin / Y.H. Hsiang, L.F. Liu // *Cancer Res.* – 1988. – Vol. 48. – P. 1722–1726.

187. <http://marrvel.org/search/gene/SQSTM1>.

188. Hubacher, O. Therapie karzinoma to serend stadienmit SP-G und SP-1 / O. Hubacher // *Dtsch. Med. Wschr.* – 1964. – Vol. 89. – P. 254.

189. Human blood mononuclear cell in vitro cytokine response before and after two different strenuous exercise bouts in the presence of bloodroot and Echinacea extracts / D. S. Senchina, J.E. Hallam, A. S. Dias, M. A Perera // *Blood Cells Mol Dis.* – 2009. – Vol. 43. – №3. – P. 298–303.

190. Human GPRC6A mediates testosterone-induced ERK and mTORC1 signaling in prostate cancer cells / R.Ye, M. Pi, MM. Nooh, [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 2019. – Vol. 95. – N. 4. – P. 118.115014.

191. Hydroxytyrosol protects from aging process via AMPK and autophagy; a review of its effects on cancer, metabolic syndrome, osteoporosis, immune-mediated and neurodegenerative diseases / CK.Das, A. Parekh, P.K. Parida, [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2019. – Vol. 143. – P. 58–72.

192. Ibrahim, N.K. Phase I and pharmacokinetic study of ABI 007, a cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel / N.K. Ibrahim, N. Desai, S. Legha // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – Vol. 8. – P. 1038–

1044.

193. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity / S.T. Im, S.T. Oh, S. Song [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2005. – Vol. 5, N 2. – P. 271–279.

194. Immu–nohistochemical analysis of tumor regression grade for rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy./ V. Moreno Garcia, P. Cejas, J. Feliu [et al.] // *ASCO Meet. Abstr.* – 2009. – Vol. 27. - №15S. – P. e22089.

195. Immunohistochemical Expression of Autophagy–Related Proteins in Advanced Tubular Gastric Adenocarcinomas and Its Implications / A. Ieni, R. Cardia, G. Giuffrè, [et al.] // *Cancers.* –2019. Vol. 11. – N.3. – P. 389.

196. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute / E.M. Mishalak, A. Villunger, J. M. Adams [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2008. – Vol.15. – P. 1019–1029.

197. *In vivo* analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker/ N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Matsui, Y. Ohsumi // *Mol Biol Cell.* – 2004. – Vol. 15. – P. 1101–1111.

198. Indecine–N–oxide: a new antitumor agent / D.S. Poster, S. Bruno, J. Pnta [et al.] // *Cancer Threat, Rep.* — 1981. — Vol. 1–2. — P. 53–57.

199. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1./ X.H. Liang, S. Jackson, M. Seaman, [et al.] // *Nature.* – 1999. – Vol. 402. – P. 672–676.

200. Influence of functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate / R. Huang, Y. Du, J. Yang, L. Fan // *Carbohydr. Res.* – 2003.– Vol. 338. – N 6. – P. 483–489.

201. Inhibition of Autophagy Improves the Efficacy of Abiraterone for the Treatment of Prostate Cancer. / X. Ma, L. Zou, X. Li, [et al.] // *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals.* – 2019. – Vol. 37. – N. 2. – P. 351–358.

202. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease / B.

Ravikumar, C. Vacher, Z. Berger, [et al.] // *Nat Genet.* – 2004. – Vol. 36. – P. 585–595.

203. Inhibition of Triple–Negative Breast Cancer Cell Aggressiveness by Cathepsin D Blockage: Role of Annexin A1 / M.A.P. Zóia, F.V.P. Azevedo, L. Vecchi, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2019. – Vol. 20. – N. 6. – P. E1337.

204. Inhibitory Effect of CAPE and Kaempferol in Colon Cancer Cell Lines–Possible Implications in New Therapeutic Strategies. / L. Budisan, D. Gulei, A. Jurj, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2019. – Vol. 20. – N. 5. – P. E1199.

205. Interaction between p53 and Ras signaling controls cisplatin resistance via HDAC4– and HIF–1 $\alpha$ –mediated regulation of apoptosis and autophagy / X. Zhang, Z. Qi, H. Yin, G. Yang // *Theranostics.* – 2019. – Vol. 9. – N. 4. – P. 1096–1114.

206. Interferon– $\beta$  sensitizes human malignant melanoma cells to temozolomide–induced apoptosis and autophagy / K. Makita, H. Hara, E. Sano, [et al.] // *International Journal of Oncology.* – 2019. – Vol. 54. – N. 5. – P. 1864–1874.

207. International study group on rectal cancer regression grading: interobserver variability with commonly used regression grading systems / R. Chetty, P. Gill, D. Govender [et al.] // *Hum. Pathol.* – 2012. – Vol.43. – №11. – P.1917–1923.

208. Intranuclear inclusions in hepatocellular carcinoma contain autophagy–associated proteins and correlate with prolonged survival / S. Schwertheim, D. Westerwick, H. Jastrow, [et al.] // *The Journal Of Pathology. Clinical Research.* – 2019. – Vol. 5. – Iss. 3. – P. 164–176.

209. Investigation of the effect of mistletoe (*viscum album* l.) Extract iscador on the proliferation and apoptosis of murine thymocytes: bell–shaped curve of efficacy and help in immunological dose–finding / T. Hajto, T. Berki, L. Pálinskás, [et al.] // *Arzneimittel–Forschung.* – 2006. – Vol. 56. – № 6A. – P. 441–446.

210. Iridoids from *Valeriana jatamansi* induce autophagy-associated cell death via the PDK1/Akt/mTOR pathway in HCT116 human colorectal carcinoma cells. / Y.Z. Tan, C. Peng, C.J. Hu, [et al.] // *Bioorganic Chemistry*. – 2019. – Vol. 87. – P. 136–141.
211. Isobavachalcone reveals novel characteristics of methuosis-like cell death in leukemia cells / L.Yang, L.Song, S. Zhao, [et al.] // *Chemico-Biological Interactions*. – 2019. – Vol. 304. – P. 131–138.
212. Janssen, O. In vitro effect of mistletoe extracts and mistletoe lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to induction of programmed cell death (apoptosis) / O. Janssen, A. Scheffler, D. Kabelitz // *Arzneimittelforschung*. – 1993. – Vol. 43. – P. 1221–1224.
213. Johnson, I. J. Plant alkaloids. In: *Cancer medicine* / I. J. Johnson; Ed. by J. F. Holland, E. Frei // Philadelphia: Lea and Febiger. – 1973. – P. 840–850.
214. Kawato, Y. Antitumor activity of a camptothecin derivative, CPT-11, against human tumor xenografts in nude mice / Y. Kawato, I. Furuta, M. Aonuma // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 28. – P. 192–198.
215. Kawato, Y. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11 in the antitumor effect of CRT-11 / Y. Kawato, M. Aonuma // *Cancer Res.* – 1991. – Vol. 51. – P. 4187–4191.
216. Kelly, M.G. The biological effects and chemical composition of podophyllin. A review / M. G. Kelly, J. L. Hartwell // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1954. – Vol.14.– P. 967–1010.
217. Kerr, Y. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy / Y. Kerr // *Cancer*. – 1984. – Vol.73. – P. 2013–2026.
218. Kerr, Y.E. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics / Y.E. Kerr, A.H. Willie, A.R. Currie // *Brit. J. Cancer*. – 1972. – Vol.26. – P 239–257.
219. Kim, M.H. Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases / M.H. Kim // *J. Cell. Biochem.* – 2003. – Vol. 89. – N 3.– P. 529–538.

220. King, L. The similarity of the effect of podo– phyllin and colchicines and their use in the treatment of condylomata acuminata / L. King, M. Sullivan // Science. – 1946. – Vol.104. – P. 244–245.
221. Kleijnen, J. Mistletoe treatment for cancer. Review of controlled trials in humans / J. Kleijnen, P. Knipshild // Phytomedicine. – 1994. – Vol. 1. – P. 255–260.
222. Koch, E. Evidence for immunotoxic effects of crude ginkgo biloba leaf extracts using the popliteal lymph node assay the mouse / E. Koch, Я. Jaggy, S.S. Chatterju // Int. J. Immunopharmacol. – 2000. – Vol.22. – P.229–236.
223. Kraus, J.A. Predictors of pathologic complete response after standaeoadjuvant chemotherapy in triple–negative breast carcinoma / J.A. Kraus, S. Berival, D.J. Dabbs, [et al.] // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. – 2012. – Vol. 4. – P. 334—339.
224. Lactate dehydrogenase A regulates autophagy and tamoxifen resistance in breast cancer / C.K. Das, A. Parekh, P.K. Parida, [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research. – 2019. – Vol. 1866. – P. 1004–1018.
225. Lataster, W.R. Experimental studies of the antitumor activity of amygdalin ME (NSC–15780) alone and in combination with/3–glucosidase (NSC–128056) / W. R. Lataster, F. M. Schabel // Cancer Chemother. Rep. – 1975. – Vol. 59. – P. 951–965.
226. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing / Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, [et al.] // EMBO J. – 2000. – Vol. 19. – P. 5720–5728.
227. Lester, S.C. Manual of surgical pathology. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2010.
228. Lettre, G. Developmental apoptosis in C. elegans: a complex CEDnario / G. Lettre, M.O. Hengartner // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2006. – Vol.7. – P. 97–108.
229. Li, C. Dna damage, deamidation, and death / C. Li, C.B. Thompson //

Science. – 2002. – Vol. 298. – № 5597. – P. 1346–1347.

230. Li, W.W. Microautophagy: lesser-known self-eating/ W.W. Li, J. Li, J.K. Bao // Cell Mol Life Sci. – 2012. – Vol. 69. – P. 1125–1136.

231. Liu, L. Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems/ L. Liu, K. Sakakibara, Q. Chen, K. Okamoto // Cell Res. – 2014. – Vol. 24. – P. 787–795.

232. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice./ M. Komatsu, S. Waguri, T. Chiba, [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 441. – P. 880–884.

233. Lotan, R. Retinoids as modulators of invasion and metastasis / R. Lotan, M. Hendrix, M. Nakajima // Clin. Exp. Metastas. – 1990. – Vol. 8. – N1. – P. 12.

234. Luo, S. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-XL / S. Luo, D.C. Rubinsztein // Cell Death. Differ. – 2010. – Vol. 17. – P. 268–277.

235. Lyn Kinase Promotes the Proliferation of Malignant Melanoma Cells through Inhibition of Apoptosis and Autophagy via the PI3K/Akt Signaling Pathway. / Q. Zhang, X. Meng, G. Qin, X. Xue // Journal of Cancer. – 2019. – Vol. 10. – N. 5. – P. 1197–1208.

236. Lysosome inhibition sensitizes pancreatic cancer to replication stress by aspartate depletion / I.A. Elliott, A.M. Dann, S. Xu, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2019. – Vol. 116. – N. 14. – P. 6842–6847.

237. Majd, S. Alzheimer's disease and cancer: when two monsters cannot be together / S. Majd, J. Power, Z. Majd // Frontiers in Neuroscience. – 2019. – Vol. – 13. – P. 155.

238. Mane, S.D. Ascorbyl stearate stimulates cell death by oxidative stress-mediated apoptosis and autophagy in HeLa cervical cancer cell line in vitro / S.D. Mane, A.N. Kamatham // 3 Biotech. – 2019. – Vol. 9. – N. 115. – P. 115.

239. Mantena, S.K. Herbal, whese inhibits growth, induces G1 arrest and

apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk<sub>i</sub>–Cdk–cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP / S. K Mantena, S. D Sharma, S. K Katiyar // *Carcinogenesis*. – 2006. – Vol. 27. - №10. – P. 2018–2027.

240. Mantena, S.K. Natural product induces G1–phase cell cycle arrest and caspase–3–dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells/ S. K Mantena, S. D Sharma, S. K Katiyar // *Mol Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5. – №2. – P. 296–308.

241. Mathé, G. The non–enumerable described retrovirus integrase inhibitors are not a lure, as evidenced by ten years of clinical experience / G. Mathé // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2000. – Vol. 54. – № 1. – P. 3–6.

242. Mathé, G. to treat or not to treat ebv and its related infections, dysplasias and tumors/ G. Mathé // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2001. – Vol. 55. – № 7. – P. 343–347.

243. Mathews, R. Recent progress in the medical applications of carotinoids / R. Mathews, M. Micheline // *Pure Appl. Chem.* – 1991. – Vol. 63. – N 1. – P. 147–156.

244. McCormick Matthews, L.H. Systematic review and meta–analysis of immunohistochemical prognostic biomarkers in resected oesophageal adenocarcinoma / L.H. McCormick Matthews, F. Noble, J. Tod [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2015. – Vol. 113. – №1. – P. 107–118.

245. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides / S.P. Wasser // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 60. – N 3. – P. 258–274.

246. Melanin–like nanoparticles decorated with an autophagy–inducing peptide for efficient targeted photothermal therapy / Z. Zhou, Y. Yan, L. Wang, [et al.] // *Biomaterials*. – 2019. – Vol. 203. – P. 63–72.

247. Melatonin–mediated regulation of autophagy: Making sense of double–edged sword in cancer / M. Mirza–Aghazadeh–Attari, A. Mohammadzadeh, A. Adib, [et al.] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2019. –

Vol.15. – N. 17. – P.5308–5316.

248. Mellen, M.A. Autophagy is not universally required for phosphatidylserine exposure and apoptotic cell engulfment during neural development/ M.A. Mellen, E.J.de la Rosa, P. Boya // *Autophagy*. – 2009. – Vol.5. – P.964–972.

249. Mellen, M.A. The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium / M.A. Mellen, E.J.de la Rosa, P. Boya // *Cell Death Differ.* – 2008. – Vol.15. – P.1279–1290.

250. Methylxanthine derivatives promote autophagy in gastric cancer cells targeting PTEN. / H. Liu, J. Song, Y. Zhou, [et al.] // *Anti-Cancer Drugs*. – 2019. – Vol. – 30. – N. 4. - P. 347–355.

251. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m6A modification of TFEB mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes / H. Song, X. Feng, H. Zhang, [et al.] // *Autophagy*. – 2019. – Vol. 14. – P. 1–19.

252. Middleton, E. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer / E. Middleton, C. Kandaswami, T.C. Theoharides // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol.52. – N 4. – P. 673–751.

253. miR-20a inhibits hypoxia-induced autophagy by targeting ATG5/FIP200 in colorectal cancer / J. Che, W. Wang, Y. Huang, [et al.] // *Molecular Carcinogenesis*. – 2019. – Vol.58. – №7. – P. 1234–1247.

254. Mizushima, N. Autophagy: Renovation of cells and tissues / N. Mizushima, M. Komatsu // *Cell*. – 2011. – Vol. 147. – P. 728–741.

255. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators on oncological patients. / K. Spelman, J. Burns, D. Nichols, [et al.] // *Altern Med Rev.* – 2006. – Vol. 11. – №2. – P.128–150.

256. Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival autophagy versus apoptosis / Y. Zhu, S. Massen, M. Terenzio [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288. – P. 1099–1113.

257. Molecular biology of herbal therapy in cancer cells/ R. Rauch, S.

Kahl, H. Boechzelt, [et al.] // Chin Med. – 2007. – Vol.2. – P.8.

258. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death / L. Galluzzi [et al.] // Cell Death Differ. – 2012. – Vol.19 – P. 107–120.

259. Molecular functions and clinical impact of thyroid hormone–triggered autophagy in liver–related diseases. / H.C. Chi, C.Y. Tsai, M.M. Tsai, [et al.] // Journal of Biomedical Science. – 2019. – Vol. 26. – N. 1. – P. 24.

260. Morusinol Exhibits Selective and Potent Antitumor Activity Against Human Liver Carcinoma by Inducing Autophagy, G2/M Cell Cycle Arrest, Inhibition of Cell Invasion and Migration, and Targeting of Ras/MEK/ERK Pathway / Z. Zhu, T. Xiao, X. Chang, [et al.] // Medical Science Monitor. – 2019. – N. 25. – P. 1864–1870.

261. MUC13 overexpression in renal cell carcinoma plays a central role in tumor progression and drug resistance / Y. Sheng, C.P. Ng, R. Lourie, [et al.] // Int J Cancer. – 2017. – Vol.140. – N.10. – P. 2351–2363.

262. Mukonal Inhibits Cell Proliferation, Alters Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis and Autophagy in Human CNE1 Nasopharyngeal Carcinoma Cells / Y. Guo, Y. Hao, G. Guan, [et al.] // Medical Science Monitor. – 2019. – Vol. – 25. – P. 1976–1983.

263. Multidimensional design of anticancer peptides / Lin, Y.–C., Lim Y.F., Russo E., [et al.] // Angewandte Chemie – International Edition. – 2015. Vol. 54. – № 35. – P. 10370–10374.

264. Multifaceted roles of ATM in autophagy: From nonselective autophagy to selective autophagy / N. Liang, Q. He, X. Liu, H. Sun // Cell Biochemistry & Function. – 2019. – Vol.37. – №3. – P. 177–184.

265. Nakatogawa, H. ATG8, a ubiquitin–like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion./ H. Nakatogawa, Y. Ichimura and Y. Ohsumi // Cell. – 2007. – Vol. 130. – P. 165–178.

266. Nasreddine, G. Cytotoxicity of [HuArgI (co)–PEG5000]–induced

arginine deprivation to ovarian Cancer cells is autophagy dependent / G. Nasreddine, M. El-Sibai, R.J. Abi-Habib // *Investigational New Drugs*. – 2019. doi:10.1007/s10637-019-00756-w.

267. New, J. Autophagy-Dependent Secretion: Mechanism, Factors Secreted, and Disease Implications. / J. New, S.M. Thomas // *Autophagy*. – 2019. – Vol. 15. – Iss.10. – P.1682–1693.

268. Niggemann, B. Side effects of complementary and alternative medicine/ B. Neiggemann, C. Gruber// *Allergy*. – 2003. – Vol.58. – P. 707–716.

269. Novel Hollow Polymer Shells by Colloid-Templated Assembly of Polyelectrolytes /E. Donath, G.B. Sukhorukov, F. Caruso, [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 1998. – Vol.37. N16. – P. 2201–2205.

270. Novel naphthalene-enoates: Design and anticancer activity through regulation cell autophagy / M. Di Yang, X.B. Shen, Y.S. Hu, [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 113. – P. 108747.

271. Nrf2-miR-129-3p-mTOR Axis Controls an miRNA Regulatory Network Involved in HDACi-Induced Autophagy / W. Sun, Y. Yi, G. Xia, [et al.] // *Molecular Therapy*. – 2019. – Vol. 27. – №5. – P.1039–1050.

272. Ohsumi, Y. Historical landmarks of autophagy research / Y. Ohsumi // *Cell Res*. – 2014. – Vol. 24. – P. 9–23.

273. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (viscum album agglutinin-i): overview of recent results from in vitro experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications / T. Hajto, K. Hostanska, T. Berki, [et al.] // *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. – 2005. – Vol. 2. – № 1. – P. 59.

274. One novel curcumin derivative ZYX01 induces autophagy of human non-small lung cancer cells A549 through AMPK/ULK1/Beclin-1 signaling pathway / GZ. Zhou, QQ. Wang, PB. Wang, [et al.] // *Cell Mol Biol*. –2019. – Vol. 65. – N. 2. – P. 1–6.

275. Overexpression of autophagy-related gene 3 promotes autophagy and inhibits salinomycin-induced apoptosis in breast cancer MCF-7 cells / F. Li,

G. Huang, P. Peng, [et al.] // Journal of Southern Medical University. – 2019. – Vol. 39. – N. 2. – P.162–168.

276. Overexpression of ribonuclease inhibitor induces autophagy in human colorectal cancer cells via the Akt/mTOR/ULK1 pathway / Y. Tang, F. Ren, X. Cong, [et al.] // Molecular Medicine Reports. – 2019. – Vol. 19. – Iss.5. – P.3519–3526.

277. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma / A. Mandart, F. Dalibard, J. Mandart, [et al.] // Cancer. – 1994. – Vol.73. – P. 2680 — 2686.

278. PEST-containing nuclear protein regulates cell proliferation, migration, and invasion in lung adenocarcinoma/ DY. Wang, Y. Hong, Y.G. Chen, [et al.] // Oncogenesis. – 2019. – Vol.8. – P. 22.

279. Phase I and pharmacokinetic study of the human DNA methyltransferase (MeTase) antisense oligodeoxynucleotide MG 98 given as a 21 –day continuous infusion every 4 weeks / L.Siu, K. Gelmon, M. Moore [Et al.] // Proc. ASCO. – 1999. — Vol. 19. – Abstr. 733.

280. Phase I trial of intravenous aviscumine (rviscumin) in patients with solid tumors: a study of the European organization for research and treatment of cancer new drug development group / P. Schoffski, S. Rigget, M. Fumollau [et al.] // Ann. Oncol. – 2004. – Vol. 15. – P. 1816–1824.

281. Phase I–II study of maytansine (NSC–153858) // E. Cabanillas, V. Rodriguez, G. P. Bodey [et al.] // Proc. Amer. Assoc. Cancer Res and ASCO. – 1977. – Vol. 18. – P. 20b.

282. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxusbrevifolia* / M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall [et al.] // J. Amer. Chem. Soc. – 1971. – Vol.94. – P. 1354–1365.

283. Potential Prognostic Role for SPOP, DAXX, RARRES1, and LAMP2 as an Autophagy Related Genes in Prostate Cancer / L. Jamali, A. Moradi, M. Ganji, [et al.] // Urology journal. – 2019. doi: 10.22037/uj.v0i0.4935.

284. PRMT2 $\beta$  suppresses autophagy and glycolysis pathway in human breast cancer MCF-7 cell lines. / Y. Chen, X. Dai, Y. Yao, [et al.] // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. – 2019. – Vol. 51. – N. 3. – P. 335–337.
285. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma / J.L. Liu, F.F. Chen, J.Lung, [et al.] // *Br J Cancer*. – 2014. – Vol.111. – P. 944–954.
286. Qu, L. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) and Autophagy in Acute Lung Injury (ALI): A Review / L. Qu, C. Chen, Y. Chen, [et al.] // *Medical Science Monitor*. – 2019. – N. 25. – P. 1828–1837.
287. Rademacher, B.L. Topical application of a dual PI3K/mTOR inhibitor prevents anal carcinogenesis in a human papillomavirus mouse model of anal cancer / B.L. Rademacher, K.A. Matkowskyj, E.D. LaCount, E.H. Carchman // *European Journal of Cancer Prevention*. – 2019. – Vol.28. – N.6. - P. 483–491.
288. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters / H. Sanderson, D.J. Johnson, T. Reitsma, [et al.] // *Regul Toxicol Pharmacol*. – 2004. – V39. – №2. – P.158–183.
289. Ravikumar, B. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy / B. Ravikumar, R. Duden, D.C. Rubinsztein // *Hum Mol Genet*. – 2002. – Vol.11. – P. 1107–1117.
290. Recombinant adenoviruses expressing apoptin suppress the growth of MCF-7 breast cancer cells and affect cell autophagy. / S. Chen, YQ. Li, X.Z. Yin [et al.] // *Oncology Reports*. – 2019. – Vol.1. – Iss.5. – P. 2818–2832.
291. Regulation of HSP27 on NF-kappa B pathway activation may be involved in metastatic hepatocellular carcinoma cells apoptosis / Guo K., NX. Kang, Y. Li [et al.] // *BMC Cancer*. – 2009. – V. 9. – № 100. – P. 1—10.
292. Regulation of the proline regulatory axis and autophagy modulates stemness in TP73/p73 deficient cancer stem-like cells / T. Sharif, E. Martell, C. Dai, S.K. Singh // *Autophagy*. – 2019. – Vol. 15. – N.5. – P. 934–936.
293. Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: heat shock response and autophagy / K. Dokladny, M. Nathaniel Zuhl,

M. Mandell, [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2013. – V. 288. – P. 14959–14972.

294. Renal cancer–selective Englerin A induces multiple mechanisms of cell death and autophagy / R.T. Williams, A.L. Yu, M.B. Diccianni, [et al.] // J Exp Clin Cancer Res. – 2013. – Vol. 20. – N.32. – P.57.

295. Resistance of Renal Cell Carcinoma to Sorafenib Is Mediated by Potentially Reversible Gene Expression / L. Zhang, M. Bhasin, R. Schor–Bardach, [et al.] // PLoS One. – 2011. – Vol. 6. – N.4. – P.e19144.

296. Resistance to lysosomotropic drugs used to treat kidney and breast cancers involves autophagy and inflammation and converges in inducing CXCL5 / S. Giuliano, M. Dufies, P.D. Ndiaye, [et al.] // Theranos. – 2019. – Vol. 9. – N. 4. – P. 1181–1199.

297. Response assessment in solid tumours: a comparison of WHO, SWOG and RECIST guidelines/ P.K. Julka, D.C. Doval, S. Gupta, G.K. Rath // Br. J. Radiol. – 2008. – Vol.81. – P. 444—449.

298. Roder, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids / E. Roder // Pharmazie. – 1995. – Vol.50. – P. 83–98.

299. Rong, Y. Bcl–2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis// Y. Rong, C.W. Distelhorst / Annu Rev Physiol. – 2008. – Vol. 70. – P.73–91.

300. Ryu, S.H. The cytotoxic principle of Scutellariae Radix against L1210 cell / S.H. Ryu, B.Z.Ahn, M.Y. Pack // Planta Med.– 1985. – Vol.51. – N 4. – P. 355.

301. Sak, K. In vitro Cytotoxic Activity of Flavonoids on Human Ovarian Cancer Cell Lines / K. Sak // Cancer Sci Res Open Access. – 2015. – Vol.2. – №1. – P.1–13.

302. Sako, A. Hyperlipidemia is a risk factor for lymphatic metastasis in superficial esophageal carcinoma / A. Sako, J. Kitayama, I.S. Kai Fotsis, H. Nagawa // Cancer Lett. – 2004. – Vol. 208. – N 1. – P. 43–49.

303. Segawa, K. Caspase–mediated cleavage of phospholipid flippase for

apoptotic phosphatidylserine exposure / K. Segawa // *Science*. – 2014. – Vol. 344. – №6188. – P. 1164–1168.

304. Selection of highly metastatic variants of different human prostatic carcinomas using orthotopic implantation in nude mice / J.J. Killion, C.A. Pettaway, S. Pathak, [et al.] // *Clin Cancer Res*. – 1996. – Vol.2. – №9. – P.1627–1636.

305. Shikonin induces apoptosis and prosurvival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways. / Y. Liu, X. Kang, G. Niu, [et al.] // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. –2019. – Vol. – 47. – N. – P. 625–635.

306. Shirwaikar, A. Phytotherapy safety aspects / A. Shirwaikar, R.Verma, R. Lobo. // *Nat. Prod. Radiance*. – 2009. – Vol.8. – P. 55–63.

307. Size-Adjustable Micelles Co-loaded with Chemotherapeutic Agent and Autophagy Inhibitor for Enhancing Cancer Treatment via Increasing Tumor Retention / J. Rao, L. Mei, J. Liu, [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2019. – Vol.89. – P.300–312.

308. Song, Z. Death by design: mechanism and control of apoptosis / Z. Song, H. Steller // *Trends in Cell Biology*. – 1999. – Vol.12 (9). – P. 49–52.

309. Spiridonov, N.A. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds / N.A. Spiridonov // *Phytother Res*. – 2005. – Vol.19. – №5. – P. 428–432.

310. Stability of nitrosomethylurea in aqueous solutions and biological media / O. A. Kim, V. A. Barsel', S. A. Matveeva, [et al.] // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 1983. – Vol.17. – № 5. – P. 325–328.

311. Stein, M.C. Are herbal products dietary supplements or drugs? An important question for public safety/ M.C. Stein // *Clin. Pharmacol. Ther*. – 2002. –Vol.71. – P. 411–413.

312. Stewart B.W., Kleihues P. World cancer report. Lyon: IARC Press; 2003; 2008.

313. Su, Y.C. Role of ttf-1, ck20, and ck7 Immunohistochemistry for

diagnosis of primary And secondary lung adenocarcinoma / Y.C. Su, Y.C. Hsu, C.Y. Chai // Kaohsiung J Med Sci January. – 2006. – Vol.22. – N.1.– P.18.

314. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice/ T. Hara, K. Nakamura, M. Matsui, [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 441. – P. 885–889.

315. Surgery-induced cryptorchidism induces apoptosis and autophagy of spermatogenic cells in mice / Y. Zheng, P. Zhang, C. Zhang, W. Zeng // Zygote. – 2019. – Vol.27. – №2. – P. 101–110

316. Survivin overexpression in head and neck squamous cell carcinomas as a new therapeutic target / M.A. Frassanito, I. Saltarella, A. Vinella, [et al.] //Oncology Reports. – 2019. – Vol.4. – №5. – P. 2615–2624.

317. Synthesis and evaluation of novel benzotropolones as ATG4B inhibiting autophagy blockers. / M. Tanc, M. Cleenewerck, A. Kurdi, [et al.] //Bioorganic Chemistry. – 2019. – Vol. 87. – P. 163–168.

318. Synthesis and evaluation of tetrahydroquinolin-2(1H)-one derivatives as novel anti-pancreatic cancer agents via targeting autophagy / Q. Shen, J. Wang, C.X. Liu, [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2019. – Vol. 170. – P. 28–44.

319. Synthesis and hypolipidemic and antiplatelet activities of p-asarone isomers in humans (in vitro), mice (in vivo), and rats (in vivo) / J. Poplawski, B. Lozowicka, A.T. Dubis [et al.] // J. Med. Chem. – 2000. – Vol. 43. – N 20. – P. 3671–3676.

320. Synthesis of new camptothecin analogs with improved antitumor activitie / S. Niizuma, M. Tsukazaki , H. Suda [et al.] // Bioorg Med Chem Lett. – 2009. – Vol.19. – P. 2018– 2021.

321. Thakkar, N. S. Inhibition of doxorubicin-induced apoptosis in vivo by 2-deoxy-D-glucose / N.S. Thakkar, C.S. Potten // Cancer Research. – 1993. – Vol.53. – №9. – P. 2057–2060.

322. Thakkar, N.S. Abrogation of adriamycin toxicity *in vivo* by cycloheximide / N.S. Thakkar, C.S. Potten // Biochemical Pharmacology. – 1992.

– Vol. 43. - №8. – P.1683–1691.

323. The apoptotic activity of flavonoid-containing *Gratiola officinalis* extract in cell cultures of human kidney cancer / N.V. Polukonova, N.A. Navolokin, A.B. Bucharskaya, [et al.] // Russian Open Medical Journal. 2018. Vol.7. – Iss.4. – P.e0402.

324. The assessment of symptoms experienced by patients receiving cytotoxic chemotherapy – an examination of current practice in outpatient chemotherapy units in the uk the assessment of symptoms experienced by patients receiving cytotoxic chemotherapy – an examination of current practice in outpatient chemotherapy units in the UK / V. Brown, W. Harlow, J. Sitzia [et al.] // European Journal of Cancer. – 2001. – Vol. 37. – P. S436.

325. The ATG12–ATG5 conjugate has a novel E3–like activity for protein lipidation in autophagy./ T. Hanada, N.N. Noda, Y. Satomi, [et al.] // J Biol Chem. – 2007. – Vol. 282. – P. 37298–37302.

326. The Beclin 1 net– work regulates autophagy and apoptosis/ R. Kang, H.J. Zeh, M.T. Lotze, D. Tang // Cell Death Differ. – 2011. – Vol.18. – №4. – P. 571–580.

327. The development of an instrument to assess patients experiences of side effects of cytotoxic chemotherapy / V. Brown, J. Sitzia, A. Richardson, [et al.] // European Journal of Cancer. – 2001. – Vol. 37. – P. S404.

328. The EGFR mutation and its correlation with response of gefitinib in previously treated Chinese patients with advanced non–small–cell lung cancer / X.T. Zhang, L.Y. Li, X.L. Mu [et al.] // Ann. Oncol. – 2005. – Vol. 16. – P. 1334–1342.

329. The FBXW7–SHOC2–Raptor Axis Controls the Cross–Talks between the RAS–ERK and mTORC1 Signaling Pathways / CM. Xie, M.Tan, XT. Lin, [et al.] // Cell Reports. – 2019. – Vol. 26. – N. 11. – P. 3037–3050.

330. The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth in vitro and in vivo / E. Angst, J.L. Park, A. Moro, [et al.] // Pancreas. – 2013.– Vol.42.– P. 223–229.

331. The influence of traditional herbal formulas on cytokine activity / J.J. Burns, L. Zhao, E.W. Taylor, K. Spelman // *Toxicology*. – 2010. – Vol. 28. N.278. – P.140–159.
332. The nature of cytotoxic drug-induced cell death in murine intestinal crypts / T.V. Anilkumar, C.E. Sarraf, T. Hunt, M.R. Alison // *Br. J. Cancer*. –1992. – Vol. 65. – № 4. – P. 552–558.
333. The role of autophagy during the early neonatal starvation period/ A. Kuma, M. Hatano, M. Matsui, [et al.] // *Nature*. – 2004. – Vol. 432. – P. 1032–1036.
334. Therapeutic potential of the new TRIB3-mediated cell autophagy anticancer drug ABTL0812 in endometrial cancer / I. Felip, C.P. Moiola, C. Megino-Luque, [et al.] // *Gynecologic Oncology*. – 2019. – Vol.153. – №2. – P.425–435.
335. Thompson, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease / C. B. Thompson // *Science*. – 1995. – Vol. 267. – P. 1456–1462.
336. TLR2 promotes development and progression of human glioma via enhancing autophagy /Li C., [et al.] // *Gene*. –2019. – Vol. 700. – P. 52–59.
337. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. / Y. Kamada, T. Funakoshi, T. Shintani, [et al.] // *J Cell Biol*. – 2000. – Vol. 150. – P. 1507–1513.
338. TRPM2 mediates disruption of autophagy machinery and correlates with the grade level in prostate cancer / A. Tektemur, S. Ozaydin, E. Etem Onalan, [et al.] // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2019. – Vol.145. – №5. – P.1297–1311.
339. Turcotte, S. A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy/ S. Turcotte, D.A. Chan // *Send to Cancer Cell*. – 2008. – Vol.14. – №1. – P. 90–102.
340. Ubiquitination and selective autophagy/ S. Shaid, C.H. Brandts, H. Serve, I. Dikic // *Cell Death Differ*. – 2013. – N. 20. – P. 21–30.
341. Vasalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factor / P. Vasalli

// Ann. Rev. Immunol. – 1992. – Vol.10. – P. 411–452.

342. Vaux, D.L. The molecular biology of apoptosis / D.L.Vaux, A. Strasser // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1996. – Vol.93. – №6. – P.2239–2244.

343. Wani, A. Alboxin clears amyloid- $\beta$  by inducing autophagy through PTEN-mediated inhibition of the AKT pathway / A. Wani, M. Gupta, M. Ahmad, [et al.] // Autophagy. – 2019. – Vol.15. – №10. - P. 1810–1828.

344. Welch, B. L. On the Comparison of Several Mean Values: An Alternative Approach / B. L Welch. // Biometrika. – 1951. - Vol. 38.- N. ¾. - P. 330–336.

345. Williamson, D. In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo / D. Williamson, K. Barron, J. Shioi, // G. Free Radical Research. – 2005. – Vol. 39. – P. 457–469.

346. Winners of the 2002 Nobel Prize in medicine or physiology. Genetic regulation of organ development and programmed cell death / U. Lendahl, S. Orrenius, B. Sydney, [et al.] // Lakartidningen. – 2002. – Vol. 99. – №41. – P. 4026–4032.

347. Wirawan, E. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria / E. Wirawan // Cell Death Dis. – 2010. – Vol.1. –P. 1–10.

348. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1/ G. Polier, J. Ding, BV Konkimalla, [et al.] // Cell Death Dis. – 2011. – Vol.2. – P. e182.

349. Xie, Z. ATG8 controls phagophore expansion during autophagosome formation/ Z. Xie, U. Nair, D.J. Klionsky // Mol Cell Biol. – 2008. – Vol. – 19. P. 3290–3298.

350. Xu, T. Hedgehog and Wntless signaling are not essential for autophagy-dependent cell death. / T.Xu, D. Denton, S.Kumar // Biochemical Pharmacology. – 2019. – Vol. 162. – P. 3–13.

351. Youle, R.J. Mechanisms of mitophagy / R.J. Youle, D.P. Narendra //

Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2011. – N. 12. – P. 9–14.

352. Zaporozhan, V.N. The Role of markers of proliferative activity in the selection of personalized treatment in locally advanced cervical cancer / V.N. Zaporozhan, O.V. Lukyanchuk, L.G. Rocha // Women's health. – 2015. – Vol. 3. – № 24. – P. 12—18.

353. Zhang, G.  $\beta$ -Thujaplicin induces autophagic cell death, apoptosis, and cell cycle arrest through ROS-mediated Akt and p38/ERK MAPK signaling in human hepatocellular carcinoma / G. Zhang, J. He, X. Ye. // Cell Death & Disease. – 2019. – Vol.10. – N. 4. – P. 255.

354. Zhang, L. MRPL35 is up-regulated in colorectal cancer and regulates colorectal cancer cell growth and apoptosis / L. Zhang, P. Lu, L. Yan, [et al.] // The American Journal of Pathology. – 2019. – Vol. 189. – Iss. 5. – P. 1105–1120.

355.  $\alpha$ -hederin induces autophagic cell death in colorectal cancer cells through reactive oxygen species dependent AMPK/mTOR signaling pathway activation / J. Sun, Y. Feng, Y. Wang, [et al.] // International Journal of Oncology. – 2019. – Vol. 54. – N. 5. – P. 1601–1612.