

DOI: 10.21294/1814-4861-2016-15-1-37-43
УДК: 616-006.3.04-08-06-056.552]-092.9

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИКАХЕКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*Gratiola officinalis* L.) У КРЫС С ПЕРЕВИТОЙ САРКОМОЙ 45

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

ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского»
Минздрава РФ, г. Саратов
410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, 112, e-mail: navolokin1@rambler.ru

Аннотация

Кахексия является тяжелым осложнением онкологических заболеваний, и пока не существует лекарственных препаратов, позволяющих эффективно бороться с истощением и интоксикацией организма при онкологических заболеваниях. **Цель исследования** – провести оценку противоопухолевой и антикахексической активности водного раствора экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) у крыс в эксперименте *in vivo* с перевитой саркомой 45. **Материал и методы.** Экстракт аврана получен авторским способом и является слабо токсичным для животных. Исследование проводилось на 40 белых крысах-самцах линии Wistar, массой 150 ± 50 г. Животные были разделены на 4 группы (по 10 крыс): контрольная группа; группа сравнения животных с перевитой опухолью без воздействия; группа животных с перевитой опухолью и внутримышечным введением экстракта и группа животных с перевитой опухолью и пероральным введением экстракта. Использована одинаковая доза экстракта – 110 мг/кг. Экстракт вводили ежедневно внутримышечно и перорально через 72 ч после перевивки саркомы 45, также ежедневно оценивали объем опухоли и массу животных. **Результаты.** Экстракт листьев и цветков аврана лекарственного, полученный авторским способом, обладает противоопухолевой активностью, снижая темпы роста опухоли и вызывая выраженные изменения в опухоли, а также оказывает стойкий антикахексический эффект. Индекс торможения опухоли по массе в среднем составил 70,6 %. Внутримышечное введение эффективнее перорального задерживает рост опухоли, но меньше способствует набору массы животных. При обоих способах введения экстракт аврана не оказывает токсического эффекта на периферическую кровь. Ранее нами было установлено, что данный экстракт обладает антиоксидантной активностью, следовательно, антикахексический эффект является патогенетическим, то есть происходит за счет снижения интоксикации. **Выводы.** Экстракт аврана лекарственного обладает широким спектром биологической активности: противоопухолевым, антикахексическим, антиоксидантным действием, кроме того, не является токсичным, поэтому его целесообразно исследовать как перспективное средство для лечения опухолевой кахексии при онкологических заболеваниях, а также кахексии, вызванной другими хроническими заболеваниями.

Ключевые слова: авран лекарственный, саркома, кахексия, кровь, противоопухолевая активность, флавоноид, растительный экстракт.

Кахексия – одно из наиболее тяжелых проявлений и осложнений роста злокачественных новообразований, а также таких заболеваний, как туберкулез, диабет, болезни крови, заболевания эндокринной системы, инфекций и синдрома приобретенного иммунодефицита. Прогрессирование опухолевой кахексии может наблюдаться даже при эффективном лечении противоопухолевыми препаратами, что обусловлено побочными эффектами проводимой терапии, в том числе их миелотоксичностью. Кроме того, кахексия может явиться противопоказанием к назначению радио-

химиотерапии, а также влиять на эффективность их проведения [17, 18, 22].

Все известные в настоящее время средства для лечения кахексии обладают рядом серьезных недостатков, в том числе большим количеством побочных эффектов; они оказывают только симптоматическое лечение; при длительном применении усугубляют кахексию. Кроме того, ни один противоопухолевый препарат не обладает противокахексическим эффектом, а наоборот, только усугубляет истощение организма, в первую очередь из-за собственной токсичности. Долгое

время считалось, что биофлавоноиды не слишком перспективны в плане противоопухолевой активности. Однако открытие в 2011 г. способности растительного флавоноида Вагонина к активации апоптоза в опухолевых клетках [21] сделало актуальным поиск и других биофлавоноидов, обладающих противоопухолевой активностью. По мнению ряда авторов, флавоноиды служат одной из самых перспективных групп из веществ растительного происхождения для борьбы с онкологическими заболеваниями, так как обладают очень широким спектром биологической активности [2, 4, 10].

Авран лекарственный (*Gratiola officinalis* L.) – травянистое растение семейства Норичниковые, широко распространённое в Евразии и Северной Америке, – использовался ранее только в народной медицине и входил в состав сбора Здренко как симптоматическое средство при лечении папилломатоза мочевого пузыря. Само растение сильно ядовито, и все полученные ранее извлечения из сырья аврана обладали достаточно высокой токсичностью, поэтому при внутреннем применении использовались вместе со слизистыми отварами, с большой осторожностью и под обязательным врачебным контролем [24].

При различных способах извлечений из аврана можно получать биологически активные композиции с различным фармакологическим действием: слабительным, рвотным, спазмолитическим, диуретическим, дигиталисоподобным действием на сердце [24], антиоксидантным [6, 19, 23], противоопухолевым и иммуномодулирующим [5, 8, 12, 15], жаропонижающим, антимикробным, противотуберкулезным [7, 13]. Полученный авторским способом [12, 20] экстракт не является токсичным [1, 6] и, кроме того, способен благоприятно влиять и на состояние красного костного мозга [9]. Ранее антикахектический эффект экстракта аврана лекарственного не изучался.

Цель исследования – провести оценку противоопухолевой и антикахектической активности водного раствора экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) у крыс в эксперименте *in vivo* с перивитой саркомой 45.

Материал и методы

Материалом исследования послужил экстракт аврана лекарственного, полученного авторским запатентованным способом [11, 20]. В него входят следующие химические вещества: 4-винил-2-метоксифенол; 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он; 2,3-дигидробензофуран; 3-фуранкарбоновая кислота; 5-гидроксиметил-2-фуральдегид; этил- α -D-рибозид; 4-пропилфенол; пирокатехин; L-люксоза (пентоза); 6-деоксигексоза L-галактоза; бензоиллюксусной кислоты этиловый эфир; гексадекановая кислота (пальмитиновая кислота); гомованилиновая кислота; глюкоза; 1,4-ангидро-D-маннитол;

бензойная кислота; кверцетин и ряд других флавоноидов.

В эксперименте, проводимом в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [14, 16], использовано 40 самцов белых лабораторных крыс, массой 150 ± 50 г, которым подкожно, в область лопатки, имплантировали по 0,5 мл 25 % опухолевой взвеси в растворе Хэнкса саркомы-45, полученной из банка опухолевых штаммов РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Животные с перевиваемой саркомой методом случайной выборки были разделены на три группы по 10 крыс. Первую и вторую группы составили опытные крысы, получавшие водный раствор сухого экстракта аврана перорально и внутримышечно в одинаковой дозировке 110 мг/кг. В третью, группу сравнения, вошли животные с перевиваемой опухолью, но без воздействия. Четвертую группу составили интактные здоровые животные. В опытных группах через 78 ч после трансплантации опухоли крысам вводили раствор экстракта перорально и внутримышечно, ежедневно, в течение двух недель.

Динамику роста опухоли оценивали по изменению ее объема по формуле

$$V = A \times B \times C / 1000 \text{ (мм}^3\text{)},$$

где А – ширина; В – толщина; С – высота опухоли в мм. Измерения проводили электронным штангенциркулем каждый день с начала эксперимента. Также каждый день животное взвешивали для оценки динамики массы тела. 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):

$$M_{\text{истинная}} = M_{\text{животного}} - V\rho,$$

где М – это масса при взвешивании; V – объем опухоли; ρ – плотность прививаемой саркомы = $0,83 \text{ г/см}^3$). Дельта массы тела животных определялась путем вычитания массы животного до начала эксперимента из истинной массы животного в день эксперимента.

По окончании опыта (через 2 нед) крыс выводили из эксперимента и для дальнейшего исследования производили забор образцов ткани органов, опухоли, крови. Гистологические препараты делали по стандартным методикам. Окраску мазков крови осуществляли по Романовскому – Гимзе, стандартными методами. Проводили количественную и качественную оценку мазков крови. В мазках крови производили подсчет не менее 100 клеток, а затем вычисляли процентное соотношение клеток и определяли лейкоцитарную формулу [3].

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащих Хельсинкской декларации. Тема и описания экспериментов одобрены этической комиссией ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (протокол № 13 от 3 мая 2011 г.).

Для обработки полученных данных использовалось статистическое программное обеспечение SPSS v.20.0 с вычислением средней и ее стандартной ошибки, проведением дисперсионного анализа на нормальность распределения. При параметрическом распределении определяли различия при помощи t-критерия Стьюдента для независимых выборок, достоверными отличия считали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При внутримышечном введении экстракта аврана отмечали статистически значимое ($p < 0,005$) замедление темпов роста перевиваемой саркомы по сравнению с группой животных с опухолью, но без воздействия во все дни измерений. На момент окончания эксперимента объем опухоли в группе с внутримышечным введением экстракта ($5,30 \pm 1,94 \text{ см}^3$) был на 71,6 % меньше ($p < 0,005$), чем в контроле ($18,01 \pm 3,39 \text{ см}^3$). Индекс торможения опухоли по массе в среднем составил 70,6 % (рис. 1).

Опухоль в группе животных без воздействия экстракта была представлена вытянутыми клет-

ками разных размеров и форм, с единичными маленькими некрозами до 400 мкм^2 и единичными митозами в поле зрения (рис. 2а). При обоих способах введения экстракта отмечали выраженный патоморфоз опухоли (III степени): обширные зоны некроза, выраженная степень дистрофии в живых клетках, участки фиброза и дезорганизации соединительной ткани (рис. 2б). При оценке динамики дельты истинной массы тела животных в группе сравнения животных с опухолью отмечали тенденцию к развитию опухолевой кахексии; в ходе эксперимента животные похудели на 18 %.

При введении экстракта аврана, как пероральном, так и внутримышечном, наблюдали стабильные показатели массы тела; по ходу всего эксперимента 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 5 % относительно массы на момент начала эксперимента (рис. 3); истинная масса тела животных с опухолью в группе с внутримышечным путем введения экстракта аврана

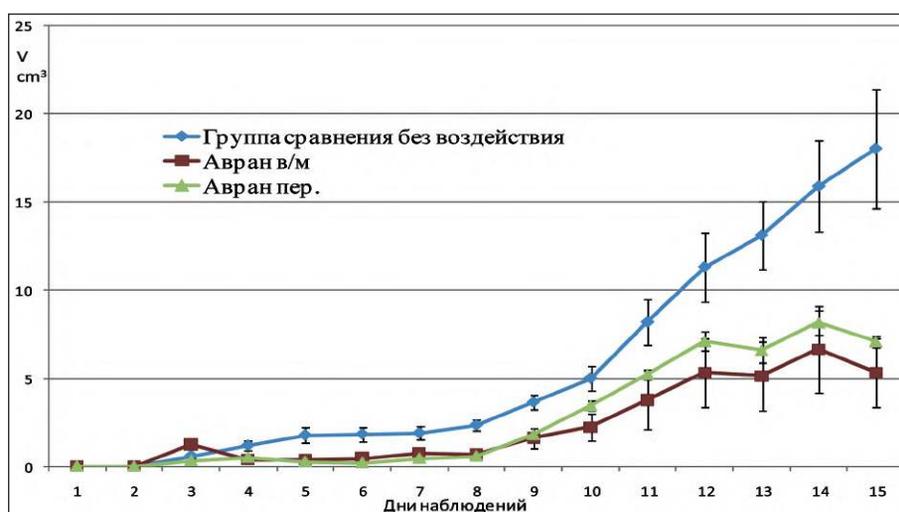


Рис. 1. Динамика роста саркомы 45

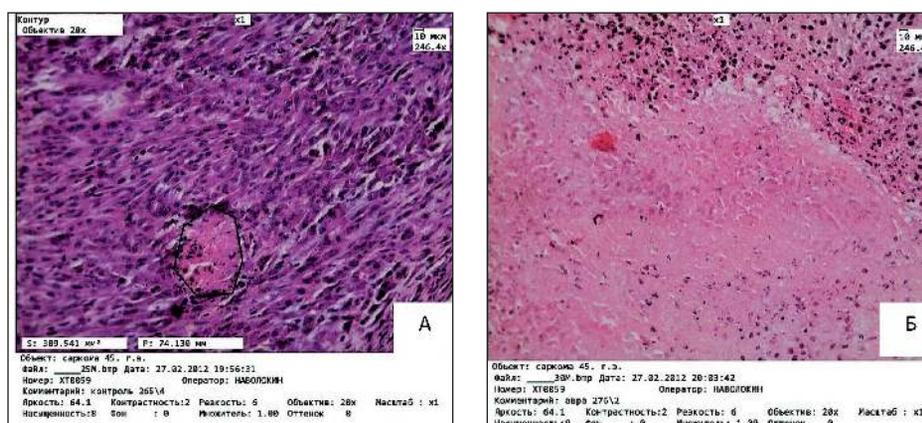


Рис. 2. Микрофото. Морфологическое строение саркомы 45:

А – группа сравнения; Б – при введении экстракта аврана. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 246,4$

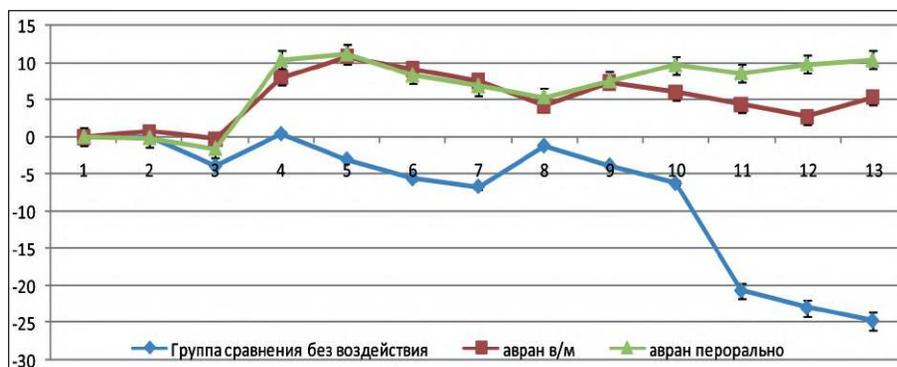


Рис. 3. Динамика дельты массы тела животных с перевитой саркомой 45: по оси ординат – дельта массы животных, а по оси абсцисс – дни измерений

Таблица

Соотношение клеток в лейкоцитарной формуле

Группа	ПЯ, %	СЯ, %	Эозинофилы, %	Базофилы, %	Моноциты, %	Лимфоциты, %
Норма у крыс	1,5 ± 0,5	58,00 ± 1,0	2,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0	9,5 ± 0,5	29,0 ± 1,0
Группа сравнения	8,33 ± 0,33 a**	11,33 ± 0,33 a**	2,0 ± 0,57	1,33 ± 0,33	8,0 ± 1,54	69,0 ± 2,64 a**
Внутримышечное введение экстракта	9,66 ± 1,2 a*	14,67 ± 1,67 a**	1,67 ± 0,33	1,0 ± 0,33	8,67 ± 0,67	64,33 ± 3,17 a**
Пероральное введение экстракта	9,33 ± 0,66 a**	15,67 ± 0,88 a**; б*	1,33 ± 0,33	0,33 ± 0,33	5,67 ± 0,89	67,67 ± 2,72 a**

Примечание: значимость отличий определяли между значениями в норме у здоровых животных с группой сравнения без воздействия и экспериментальными группами – (а); крыс с саркомой в группе сравнения и экспериментальными группами – (б); * – значимые отличия (p<0,05); ** – значимые отличия (p<0,01).

увеличилась на 8 % относительно массы на момент начала эксперимента (рис. 3).

Для оценки токсичности проводили оценку состояния периферической крови. При сравнении показателей в контрольной группе и группе сравнения (здоровых животных и животных с перевитой опухолью) статистически достоверно отмечали увеличение палочкоядерных нейтрофилов и лимфоцитов и уменьшение сегментоядерных нейтрофилов в группе животных с опухолью (табл. 1), что явилось следствием токсического действия продуктов распада опухоли на клетки костного мозга.

При пероральном введении экстракта аврана отмечали увеличение количества сегментоядерных лейкоцитов на 38 % по сравнению с группой животных с опухолью без воздействия (p<0,05), но данный показатель крови приближается к таковым у здоровых животных (табл.).

Заключение

Таким образом, экстракт листьев и цветов аврана лекарственного, полученный авторским способом, обладает противоопухолевой активностью, снижает темпы роста перевиваемых опухолей,

вызывая выраженные изменения в опухоли, и, кроме того, оказывает стойкий антикахекический эффект. Индекс торможения опухоли по массе в среднем составил 70,6 %. Внутримышечное введение эффективнее перорального задерживает рост опухоли, но меньше способствует набору массы животных. При обоих способах введения экстракт аврана не оказывает токсического эффекта на периферическую кровь. Ранее нами было установлено, что экстракт обладает антиоксидантной активностью [6, 19, 23], следовательно, можно полагать, что антикахекический эффект экстракта является патогенетическим, т.е. идет за счет снижения интоксикации.

Выводы

Экстракт аврана лекарственного обладает широким спектром биологической активности, в частности противоопухолевым, антикахекическим действием; является нетоксичным, поэтому его целесообразно исследовать как перспективное средство для лечения опухолевой кахекии и онкологических заболеваний, а также кахекии, вызванной другими хроническими заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байтман Т.П., Наволокин Н.А. Влияние экстракта аврана лекарственного на лабораторных животных с перевитой саркомой S-45 // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т. 3, № 2. С. 374.
2. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е. Растения в комплексной терапии опухолей. М., 2008. 232 с.
3. *Инвайтро* диагностика. Лабораторная диагностика / Под ред. Е.А. Кондрашевой, А.Ю. Островского. М., 2012. 840 с.
4. Корсун В.Ф., Трескунов К.А., Корсун Е.В., Мицконас А. Лекарственные растения в онкологии. М., 2007. 445 с.
5. Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Бибикина О.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б. Цитоморфологические изменения клеток почки эмбриона свиньи в культуре (spen-2) при воздействии экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // Фундаментальные исследования. 2014. № 10-7. С. 1369–1374.
6. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени РС-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea mays* L.) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, № 2. С. 213–220.
7. Наволокин Н.А., Скворцова В.В., Полуконова Н.В., Манякнова Е.В., Панкратова Л.Э., Курчатова М.Н., Маслякова Г.Н., Дурнова Н.А. Противотуберкулезная активность экстракта аврана лекарственного (*gratiola officinalis* L.) in vitro // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, № 4. С. 10–13.
8. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Воронков М.О., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Сравнение противоопухолевой активности экстракта аврана лекарственного и входящего в его состав кверцетина при интратуморальном введении // Российский биотерапевтический журнал. 2015. Т. 14, № 1. С. 111.
9. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Тычина С.А., Корчаков Н.В. Изменения костного мозга и крови лабораторных крыс с перевитой саркомой 45 при пероральном введении экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis*) // Вестник РГМУ. 2015. № 2. С. 317.
10. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Скворцова В.В., Байтман Т.П., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12, № 2. С. 59–59а.
11. Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // Химия растительного сырья. 2013. № 4. С. 165–173.
12. Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Бибикина О.А. Цитотоксическая активность in vitro экстракта аврана на культуре клеток почек эмбрионов свиньи, зараженных онковирусом // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т. 3, № 2. С. 375.
13. Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Райкова С.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А., Шуб Г.М. Противовоспалительная, жаропонижающая и антимикробная активность флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, № 1. С. 34–38.
14. *Руководство* по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. М., 2012. Ч. 1. 944 с.
15. Скворцова В.В., Наволокин Н.А. Патоморфоз саркомы S45 при внутримышечном введении флавоноидсодержащего экстракта лабораторным крысам // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т. 3, № 2. С. 258.
16. Хабриев П.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005. 832 с.
17. Dewys W.D., Begg C., Lavin P.T., Band P.R., Bennett J.M., Bertino J.R., Cohen M.H., Douglass H.O.Jr., Engstrom P.F., Ezdinli E.Z., Horton J., Johnson G.J., Moertel C.G., Oken M.M., Perlia C., Rosenbaum C., Silverstein M.N., Skeel R.T., Sponzo R.W., Tormey D.C. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group // Am. J. Med. 1980. Vol. 69 (64). P. 491–497.
18. Morley J.E., Thomas D.R., Wilson M.M. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance // Am. J. Clin. Nutr. 2006. Vol. 83 (4). P. 735–743.
19. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with transplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012. Vol. 1 (2). 0203.
20. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Durnova N.A., Maslyakova G.N. A new extraction method of bioflavonoids from poisonous plant (*Gratiola officinalis* L.) // Russian Open Medical Journal. 2014. Vol. 3 (3). 0304. doi: 10.15275/rusomj.2014.0304.
21. Polier G., Ding J., Konkimalla B.V., Eick D., Ribeiro N., Köhler R., Giais M., Effertth T., Desaubry L., Krammer P.H., Li-Weber M. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1 // Cell Death Dis. 2011. Vol. 2 (7):e182. doi: 10.1038/cddis.2011.66.
22. Steinborn W., Anker S.D. Cardiac Cachexia: Pathophysiology and Clinical Implications // Basic Appl. Myol. 2003. Vol. 13 (4) P. 191–201.
23. Tkachenko N., Pravdin A., Terentyuk G., Navolokin N., Kurchatova M., Polukonova N. Inhibitor of photodynamic haemolysis by *Gratiola officinalis* L. Extract // SPIE Proceedings. Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics. 2015. Vol. 9448. 94480 P. doi:10.1117/12.2179862.
24. *Авран* лекарственный // AyZdorov.ru: сайт о народной и нетрадиционной медицине [Электронный ресурс]. URL : http://www.ayzdorov.ru/tvtravnik_avran.php (дата последнего обращения: 3.06.2015).

Поступила 10.06.15

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Наволокин Никита Александрович, ассистент кафедры патологической анатомии; научный сотрудник Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (г. Саратов, Российская Федерация). E-mail: navolokin1@rambler.ru. SPIN-код: 9453-6731

Мудрак Дмитрий Андреевич, студент 4-го курса лечебного факультета, лаборант-исследователь Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (г. Саратов, Российская Федерация). E-mail: хурург-wh@mail.ru. SPIN-код: 1600-5866

Полуконова Наталья Владимировна, доктор биологических наук, профессор кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники, ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (г. Саратов, Российская Федерация). E-mail: polukonovanv@yandex.ru. SPIN-код: 1315-2750

Тычина Сергей Александрович, студент 4-го курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (г. Саратов, Российская Федерация). E-mail: elessar122@yandex.ru. SPIN-код: 3706-9443

Корчаков Никита Владимирович, студент 4-го курса лечебного факультета ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (г. Саратов, Российская Федерация). E-mail: nikikor1994@yandex.ru. SPIN-код: 1764-4810

Бучарская Алла Борисовна, кандидат биологических наук, руководитель Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (г. Саратов, Российская Федерация). E-mail: allaalla_72@mail.ru. SPIN-код: 7171-8125

Маслякова Галина Никифоровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии, ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава РФ (г. Саратов, Российская Федерация). E-mail: gmaslyakova@yandex.ru. SPIN-код: 3181-8136

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о котором необходимо сообщить

EVALUATION OF THE ANTITUMOR AND ANTICACHEXIA ACTIVITY OF GRATIOLA OFFICINALIS L. EXTRACT IN RATS WITH TRANSPLANTED SARCOMA 45

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

V.I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov
112, Bolshaya Kazachia st., 410012-Saratov, Russian Federation, e-mail: navolokin1@rambler.ru

Abstract

Cachexia is a severe complication of cancer and currently there are no drugs that would effectively deal with exhaustion and intoxication in various diseases. **Materials and methods.** In this paper a study and evaluation of the antitumor and anticachexia activities of the extract of *Gratiola officinalis* L. in rats with transplanted sarcoma 45 in experiment in vivo was conducted. *Gratiola officinalis* L. extract is received by patented method and is not toxic to animals. The study was conducted on 40 white male rats line Wistar weighing 150 ± 50 g. Animals were divided into 4 groups (10 rats per group): control group, comparison group with sarcoma without affecting, group with sarcoma with intramuscular and group with sarcoma with oral administration of the extract in a dosage of 110 mg/kg. The extract was administered intramuscularly or orally 72 hours after transplantation of sarcoma 45. The tumor volume and the weight of the animals were assessed daily. **Results.** The extract of leaves and flowers of *Gratiola officinalis* L. obtained by patented method has a strong antitumor activity, reducing the growth rate of the tumor and causing marked changes in the tumor, as well as providing stable anticachexia effect. Index of tumor weight inhibition was 70.6 % on average. Intramuscular administration was more effective in reducing of tumor growth, but less effectively increases the weight of animals than oral administration. In both administration methods *Gratiola officinalis* extract has no toxic effect on peripheral blood. We have previously found that the extract has antioxidant activity so that anticachexia effect is pathogenic, meaning it occurs by reducing toxicity. **Conclusions.** *Gratiola officinalis* extract has a broad spectrum of biological activity, in particular antitumor, anticachexia, it is not toxic, so it is advisable to investigate as a promising tool for the treatment of tumor diseases and cancer cachexia, and cachexia caused by other chronic diseases.

Key words: *Gratiola officinalis* L, sarcoma, cachexia, blood, antitumor activity, flavonoids, plant extract.

REFERENCES

1. Bajtman T.P., Navolokin N.A. Effect of extract of Hauran drug on laboratory animals inoculated with sarcoma S-45 // B'ulleten' medicinskih internet-konferencij. 2013. Vol. 3 (2) P. 374. [in Russian]
2. Gol'dberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P., Amosova E.N., Krylova S.G., Gol'dberg V.E. Plants in the treatment of tumors M., 2008. 232 p. [in Russian]
3. *In vitro* diagnostics. Laboratory diagnosis / Eds. E.A. Kondrasheva, A.Ju. Ostrovskij. M., 2012. 840 p. [in Russian]
4. Korsun V.F., Treskunov K.A., Korsun E.V., Mickonas A. Medicinal plants in oncology. M., 2007. 445 p. [in Russian]
5. Navolokin N.A., Polukonova A.V., Bibikova O.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaja A.B. Cytomorphological changes pig embryo kidney cells in culture (spev-2) under the action of a medicinal extract of Hauran (*Gratiola officinalis* L.) // The fundamental researches. 2014. № 10-7. P. 1369–1374. [in Russian]
6. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaja A.B., Durnova N.A. The morphology of internal organs and tumors in laboratory rats with transplanted liver cancer PC-1 when administered orally flavonoidsoderzhaschih Hauran medicinal extracts (*Gratiola officinalis* L.) and maize anthocyanin (*Zea Mays* L.) // Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2013. Vol. 9 (2). P. 213–220. [in Russian]
7. Navolokin N.A., Skvorцова V.V., Polukonova N.V., Manaenkova E.V., Pankratova L.Je., Kurchatova M.N., Maslyakova G.N., Durnova N.A. Activity against drug extract Hauran (*gratiola officinalis* L.) // Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija. 2015. Vol. 78 (4). P. 10–13. [in Russian]
8. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Mudrak D.A., Tychina S.A., Voronkov M.O., Korchakov N.V., Bucharskaja A.B., Maslyakova G.N. Comparison of antitumor activity of the extract of Hauran drug and being a part of quercetin when administered introtumoralnom // Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal. 2015. Vol. 14 (1). 111 p. [in Russian]
9. Navolokin N.A., Mudrak D.A., Tychina S.A., Korchakov N.V. Changes in bone marrow and blood of laboratory rats with transplanted sarcoma 45 after oral administration of *Gratiola officinalis* // Vestnik RGMU. 2015. № 2. P. 317. [in Russian]
10. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Skvorцова V.V., Bajtman T.P., Bucharskaja A.B., Durnova N.A. Antitumor activity of vegetable extracts containing bioflavonoids // Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal. 2013. Vol. 12 (2). P. 59–59a. [in Russian]
11. Guidelines for conducting pre-clinical trials of drugs. Part one / Ed. A.N. Mironov. M., 2012. 944 p. [in Russian]
12. Polukonova N.V., Durnova N.A., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Golikov A.G. Chemical analysis and a method of producing a new From Biological active composition of medicinal herbs Hauran (*Gratiola officinalis* L.) // Khimija Rastitel'nogo Syr'ja. 2013. № 4. P. 165–173. [in Russian]
13. Polukonova A.V., Navolokin N.A., Bibikova O.A. The cytotoxic activity in vitro extract Hauran cell culture embryonic kidney pigs infected Oncoviruses // B'ulleten' medicinskih internet-konferencij. 2013. Vol. 3 (2). P. 375. [in Russian]
14. Polukonova A.V., Navolokin N.A., Rajkova S.V., Maslyakova G.N., Bucharskaja A.B., Durnova N.A., Shub G.M. Anti-inflammatory , anti-

pyretic and antimicrobial activity of the extract of Hauran flavonoid-soderzhashego drug (*Gratiola officinalis* L.) // Eksperimental'naiia i klinicheskaiia farmakologiya. 2015. Vol. 78 (1). P. 34–38. [in Russian]

15. Skvorcova V.V., Navolokin N.A. Pathomorphosis S45 sarcoma when administered intramuscularly flavonoid-soderzhashego extract laboratory rats // Bülleten' medicinskih internet-konferencij. 2013. Vol. 3 (2). P. 258–258. [in Russian]

16. Habriev R.U. Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. M., 2005. 832 p. [in Russian]

17. Dewys W.D., Begg C., Lavin P.T., Band P.R., Bennett J.M., Bertino J.R., Cohen M.H., Douglass H.O.Jr., Engstrom P.F., Ezdinli E.Z., Horton J., Johnson G.J., Moertel C.G., Oken M.M., Perlia C., Rosenbaum C., Silverstein M.N., Skeel R.T., Sponzo R.W., Tormey D.C. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group // Am. J. Med. 1980. Vol. 69 (64). P. 491–497.

18. Morley J.E., Thomas D.R., Wilson M.M. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance // Am. J. Clin. Nutr. 2006. Vol. 83 (4). P. 735–743.

19. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats

with transplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012. Vol. 1 (2). 0203.

20. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Durnova N.A., Maslyakova G.N. A new extraction method of bioflavonoids from poisonous plant (*Gratiola officinalis* L.) // Russian Open Medical Journal. 2014. Vol. 3 (3). 0304. doi: 10.15275/rusomj.2014.0304.

21. Polier G., Ding J., Konkimalla B.V., Eick D., Ribeiro N., Köhler R., Giaisi M., Efferth T., Desaubry L., Krammer P.H., Li-Weber M. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1 // Cell Death Dis. 2011. Vol. 2 (7): e182. doi: 10.1038/cddis.2011.66.

22. Steinborn W., Anker S.D. Cardiac Cachexia: Pathophysiology and Clinical Implications // Basic Appl. Myol. 2003. Vol. 13 (4). P. 191–201.

23. Tkachenko N., Pravdin A., Terentyuk G., Navolokin N., Kurchatova M., Polukonova N. Inhibitor of photodynamic haemolysis by *Gratiola officinalis* L. Extract // SPIE Proceedings. Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics. 2015. Vol. 9448. 94480 P. doi:10.1117/12.2179862.

24. *Gratiola officinalis* // AyZdorov.ru. URL : http://www.ayzdorov.ru/tvtravnik_avran.php. [in Russian]

ABOUT THE AUTHORS

Navolokin Nikita Aleksandrovich, Lecturer of the Pathological Anatomy Department, Researcher, Research Institute of Fundamental and Clinical Uronephrology, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (Saratov), Russian Federation. E-mail: navolokin1@rambler.ru. SPIN-code: 9453-6731

Mudrak Dmitry Andreevich, 4th year student of the Medical Faculty, Researcher, Research Institute of Fundamental and Clinical Uronephrology, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (Saratov), Russian Federation. E-mail: xupypr-wh@mail.ru. SPIN-code: 1600-5866

Polukonova Natalia Vladimirovna, Professor, Department of General Biology, Botany and Pharmacognosy, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (Saratov), Russian Federation. E-mail: polukonovanv@yandex.ru. SPIN-code: 1315-2750

Tychina Sergey Aleksandrovich, 4th year student of the Medical Faculty, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (Saratov), Russian Federation. E-mail: elessar122@yandex.ru. SPIN-code: 3706-9443

Korchakov Nikita Vladimirovich, 4th year student of the Medical Faculty, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (Saratov), Russian Federation. E-mail: nikikor1994@yandex.ru. SPIN-code: 1764-4810

Bucharskaya Alla Borisovna, PhD, Head of Department of General Biology, Botany and Pharmacognosy, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (Saratov), Russian Federation. E-mail: allaalla_72@mail.ru. SPIN-code: 7171-8125

Maslyakova Galina Nikiforovna, Professor, Head of Department of Pathological Anatomy, V.I. Razumovsky Saratov State Medical University (Saratov), Russian Federation. E-mail: gmaslyakova@yandex.ru. SPIN-code: 3181-8136

относящееся к семейству Норичниковых, ранее использовался в научной медицине с 1968 года (ФС 42-2358-85) в составе сбора по прописи Здренко. Кроме того, авран лекарственный входит в Фармакопею Франции десятого издания. Авран лекарственный входит в группу малоизученных растений, так как недостаточно информации о его химическом составе, фармакологическом действии, отсутствуют методы стандартизации. Все это диктует необходимость фармакогностического исследования сырья Аврана лекарственного и разработки нормативной документации для него [1].

Авран лекарственный широко распространен в Евразии и Северной Америке и хорошо известен в народной медицине. В траве Аврана лекарственного найдены биологически активные вещества, имеющие широкий спектр лечебного действия на организм человека, включая противотуберкулезное и антиопухолевое, а также спазмолитический, антимикробный и антиоксидантный эффекты. Кроме того, из листьев Аврана лекарственного получают средства с антикахектическими и иммуномодулирующими свойствами. По данным изученных нами научных источников, большие перспективы разработки противоопухолевых препаратов нового поколения связаны с биофлавоноидами. Авторы полагают, что в связи с широким спектром действия биофлавоноидов, содержащимися в данном растении, потенциально возможно, на их основе разработать новые безопасные противоопухолевые средства. Наряду с флавоноидами авран лекарственный содержит не менее перспективные вещества в плане разработки лекарственных препаратов — тетрациклические тритерпеноиды, включая кукурбитацин, которые обладают широким спектром фармакологических эффектов (противоопухолевое, противовоспалительное, антибактериальное, противовирусное действие против вируса гепатита В (HBV), ингибирование репликации вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и антидепрессивное действие). В настоящее время имеются многочисленные сведения по экспериментальным фармакологическим исследованиям кукурбитацина, подтверждающие его ценность. Кроме того, состав аврана лекарственного привлекает внимание ученых содержащимися в нем алкалоидами, к сожалению, до сих пор еще не установленной структуры, но проявляющими значительную активность и, прежде всего, как противоопухолевые средства [2].

В народной медицине спиртовая настойка Аврана лекарственного используется для лечения асцита, гонореей которого является сердечная недостаточность, при этом действующими веществами, обуславливающими терапевтический эффект, по данным проведенных исследований считают кукурбитацин и элатеризид [4].

Имеются сведения по результатам проведенных доклинических исследований, где были использованы неопухолевые эпителиальные клетки клеточной культуры почки эмбриона свиньи SPEV и опухолевые клетки рака шейки матки человека HeLa. При суточном воздействии экстракта аврана лекарственного на клетки SPEV наблюдался цитостатический эффект при подавлении пролиферативной активности неопухолевых клеток, при этом не вызывая их гибель. Что касается опухолевых клеток HeLa, то экстракт в малых дозах снижал концентрацию СКК и замещал опухолевую ткань соединительной. Полученные данные свидетельствовали о том, что опухолевые клетки наиболее чувствительны к экстракту Аврана лекарственного [3].

Данные по химическому составу аврана лекарственного разрозненны, в некоторых случаях противоречивы, что требует дополнительных исследований и их систематизации.

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

**К.С. Дырина¹, Р.А. Абрамович², Р.Д. Вырщиков³,
О.Г. Потанина², Ю.А. Фомина³, Н.Б. Шестопалова³,
Т.Ю. Калюта³, А.С. Федонников³**

¹ ООО «Биннофарм Групп», Москва, Россия

² Научно-производственный участок Института регенеративной медицины ИНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского, Саратов, Россия

e-mail: solnyshko1809@mail.ru

Ключевые слова: Авран лекарственный, перспективное ЛРС, кукурбитацин, алкалоиды, флавоноиды, химический состав, противоопухолевая активность.

Несмотря на широкое развитие производства лекарственных препаратов, биологически активные соединения растительного происхождения продолжают занимать значительное место в современной медицине.

Одним из ценных видов перспективного лекарственного растительного сырья является Авран лекарственный (*Gratiola officinalis* L.) — травянистое растение,

В связи с этим, изучение фитохимического состава и фармакологической активности аврана лекарственного является актуальной проблемой, в первую очередь как перспективного противоопухолевого лекарственного средства с целью дальнейшей разработки на его основе различных лекарственных форм.

Содержащиеся в Авране лекарственном биологически активные вещества, перспективны для дальнейшего изучения, с последующей разработкой новых лекарственных средств. Важным является вопрос максимального извлечения БАВ из растения, их стандартизация, разработка технологии и состава удобных для применения лекарственных форм, способствующих проявлению всех полезных свойств травы аврана лекарственного.

Литература:

1. В.М. Булаев, Е.В. Ших, Д.А. Сычев. — М. МЕДпресс-информ, 2011. — 144 с.
2. Н.А. Наволокин, Д.А. Мудрак, Н.В. Полуконова, [и др.] Злокачественные опухоли. — 2017. — Т.7, № 3. — С. 133–134.
3. Отчет по оценке результатов доклинических исследований экстракта аврана лекарственного и основных его активных компонентов.
4. Fisher, D.E. Cell. — 1994. — Vol. 78. — P. 539–542.

УДК 543.42:615.074:547.97:547.972:582.951.6

ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НОВОЙ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ КОМПОЗИЦИИ ИЗ ТРАВЫ АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*GRATIOLA OFFICINALIS* L.)

© Н.В. Полуконова*, Н.А. Дурнова, М.Н. Курчатова, Н.А. Наволокин, А.Г. Голиков

Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского, ул. Б. Казачья, 112, Саратов, 410012 (Россия),
e-mail: polukonovanv@yandex.ru

Описан способ экстракции из растительного сырья, позволяющий получать нетоксичную композицию биологически активных веществ из ядовитых растений, содержащих флавоноиды, на примере ядовитого растения аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.). С увеличением процентного содержания этилового спирта (от 15% к 96%), используемого в качестве экстрагента, изменяется выход алкалоидов так, что экстракт, полученный 96%-м этиловым спиртом, не дает положительной качественной реакции на содержание алкалоидов. Исследован химический состав экстракта с новой для аврана лекарственного нетоксичной биологически активной композицией. Установлено, что экстракт содержит неизвестный ранее для этого растения биофлавоноид – кверцетин. Среднее значение кверцетина в данном экстракте с использованием градуировочного графика стандартного образца кверцетина (98%) Sigma составляет 0,66%. Установленное нами методом жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) количество кверцетина в сухом остатке экстрактивных веществ (получаемого из 10 г сухой травы аврана) составило 350 мкг.

Ключевые слова: авран лекарственный, химический состав, биофлавоноиды, способ экстракции, кверцетин.

Введение

В настоящее время достаточно эффективно исследуются способы получения биологически активных композиций (БАК) из сырья лекарственных растений с наименьшими побочными эффектами и вместе с тем с максимальным положительным фармакологическим действием. Авран лекарственный (*Gratiola officinalis* L.) — травянистое растение семейства Норичниковые, широко распространенное в Евразии и Северной Америке. Растение ядовито. Домашние животные распознают авран лекарственный и на пастбищах его не поедают, но это растение может попасть к ним вместе с сеном и вызвать отравление; особенно чувствительны к аврану лошади. Качество сырья аврана лекарственного регламентировано фармакопейной статьей 42-2358-85. Ранее трава аврана входила в состав сбора Здренко как симптоматическое средство при

Полуконова Наталья Владимировна – профессор кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники, доктор биологических наук, e-mail: polukonovanv@yandex.ru

Дурнова Наталья Анатольевна – заведующая кафедрой общей биологии, фармакогнозии и ботаники, доктор биологических наук, профессор, e-mail: ndurnova@mail.ru

Курчатова Мария Николаевна – аспирантка, e-mail: kurchatova.marya@yandex.ru

Наволокин Никита Александрович – студент, e-mail: navolokin1@rambler.ru

Голиков Алексей Геннадьевич – заведующий кафедрой фармацевтической химии, доктор химических наук, профессор, e-mail: golikov20@rambler.ru

лечении папилломатозного гастрита и применялась как слабительное, антигельминтное, кардиотоническое, желчегонное и антисептическое средство [1, 2]. В основном применялись водные настои травы и 15%-я спиртовая настойка [2]. Полученные извлечения из травы аврана обладают достаточно высокой токсичностью, поэтому при внутреннем применении используются вместе со слизистыми отварами, с большой осторожностью и под обязательным врачебным контролем [3].

Разные способы экстракции из одного и того же растительного сырья могут приводить к получе-

* Автор, с которым следует вести переписку.

нию БАК с разными химическим составом и свойствами [4]. Так, при получении экстракта из сырья аврана путем экстракции сырья 96%-м этанолом (или метанолом, или н/(изо)-пропанолом) и хлороформом [5], в результате которого получается и используется хлороформная фракция с неполярными соединениями, включая ядовитые соединения (алкалоиды и гликозиды), экстрактивные вещества остаются токсичными. Кроме того, экстракт, полученный данным способом, обладает значительным слабительным эффектом, обусловленным содержанием в нем токсичных веществ – алкалоидов и гликозидов, оказывающих раздражающий эффект на кишечник, за счет чего резко снижается область его применения. Известны также способы получения водных настоев, спиртовой настойки и экстракта из сырья аврана, включающие использование этилового спирта разной концентрации и хлороформа, при которых экстракты из аврана содержат гликозиды грациозид (грациолин), грациотоксин, кукурбитациновый гликозид — элатерицид, жирное масло, сапонины, яблочную и бетулиновую кислоты, углеводы (стахиоза), терпеноиды (элатеризид, дезацети-лэлатеринид, кукурбитацин E и I), карденолиды, сапонины, флавоноиды (лигнозид, изолигнозид, апигенин, космоин, лигнозид, аврозид, изоаврозид, неоаврозид, изонеоаврозид), а также алкалоиды (0,2%) пока не установленного состава, в разном соотношении, в зависимости от способа выделения [3, 5, 6–9].

В настоящей работе анализируется экстракт, полученный новым, ранее не примененным для аврана способом, позволяющем получать нетоксичные экстрактивные вещества из ядовитых растений. Для данного экстракта из травы аврана нами уже описаны положительные эффекты на организм животных с переви-ваемым раком печени и в то же время негативное воздействие на опухолевые клетки, проявляющееся как в виде цитотоксического, так и цитостатического эффекта [10–12].

Цель исследования – описать способ получения нетоксичного экстракта из травы ядовитого расте-ния *Gratiola officinalis* L., содержащего биофлавоноиды, и провести химический анализ этого экстракта.

Экспериментальная часть

Для экстракции использовано сырье – трава аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.), собран-ное на острове р. Волги у пос. Чардым (Саратовская обл.) в июне 2011 г. Исследования проводились с су-хим сырьем в октябре 2011 г.

Для проведения качественных реакций использованы экстракты из травы аврана, полученные раз-ными способами: 96%-м этиловым спиртом; 70%-м и 15%-м этиловым спиртом, а также водный настой [13]. Для определения наличия флавоноидов использована проба Синода, проведена реакции с хлоридом алюминия, со щелочью и реакции на наличие алкалоидов: с реактивом Вагнера-Бушарда, с раствором 1%-й пикриновой кислоты, с раствором кислоты фосфорномолибденовой, с кремневольфрамовой кислотой [13]. Для сравнения полученного нами 96%-го спиртового экстракта из травы аврана лекарственного также ис-пользованы: водный настой, 15%-я спиртовая настойка, экстракция 70%-м этиловым спиртом [13].

Для установления химического состава использован экстракт из травы аврана, полученный 96%-м этиловым спиртом. Суть данного способа заключается в использовании этилового спирта высокой концен-трации в связи с относительно низкой температурой его кипения по сравнению с водой, что способствует лучшей сохранности флавоноидов в процессе экстрагирования сырья [13]. Подобранный нами способ экс-тракции включает также этап очистки от токсичных соединений (алкалоидов, гликозидов и др.), заклю-чающийся в их растворении в хлороформе, центрифугировании и избавлении от хлороформной фракции [14]. Водная фракция высушивается в чашке Петри, что позволяет получить сухой остаток целевых про-дуктов и в дальнейшем дает возможность определять точную концентрацию целевых продуктов и рассчи-тывать точную дозировку для экспериментов, как *in vitro*, так и *in vivo*, а также позволяет длительное время хранить экстракт до начала применения [14].

Исследование химического состава 96%-го спиртового экстракта аврана проводилось методом хро-мато-масс-спектрометром, модели Trace GC – Trace DSQ (фирма «ThermoFinnigan», США). Были найдены оптимальные условия для разделения смеси анализируемых веществ в данном растворителе (этиловом спирте). Подвижная фаза: гелий, 99,995% чистоты (скорость потока 1,2 мл/мин). Марка хроматографиче-ской колонки: Restek Stabilwax, 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина фазы 0,25 мкм (колонка с не-полярной неподвижной фазой на основе полиэтиленгликоля). Температурная программа: 150 °C при t=10 мин, затем нагрев со скоростью 2 °C/мин до 240 °C в течение 10 мин, t_{инжектора} = 290 °C, t_{источника ионов} = 220 °C. Сканирование проводили в интервале 45–400 а.е.м. (Full Scan), режим Splitless. MS Transfer Line = 250 °C. Время включения филамента через 5 мин после инъекции образца количеством 2 мкл. Используемые биб-

лиотеки масс-спектров: Библиотека NIST 02 (Национальный Институт Стандартов и Технологий, США), Wiley. Распознавание обнаруженных соединений проводили путем сравнения полученных масс-спектров с масс-спектрами библиотек.

Определение количественного содержания кверцетина в 96%-м спиртовом экстракте аврана проводили с помощью жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) по стандартной методике проведения «Высокоэффективная жидкостная хроматография» на приборе «Стайер UV/VIS» (фирма «Аквилон») в изократическом режиме, со спектрофотометрическим детектором [15]. При количественном определении кверцетина использован стандартный образец кверцетина (98%) фирмы Sigma.

Вещество в чашке Петри растворяли количественно 5 мл этилового спирта, после чего непосредственно перед хроматографированием разбавляли смесь в 10 и 20 раз. Хроматографирование проводили на градиентном ВЭЖХ – приборе «Стайер UV/VIS» (фирма «Аквилон») в изократическом режиме, со спектрофотометрическим детектором. Длина волны 254 нм. Центр коллективного пользования разработал методику оптимального разделения и определения кверцетина в присутствии других флавоноидов и алкалоидов. Хроматографирование осуществляли в обращенно-фазовом изократическом режиме, подвижная фаза: изопропанол – вода = 30 : 70 (процент по объему), скорость потока 700 мкл/мин. Время удерживания кверцетина составило 7,65–7,75 мин. Колонка Phenomenex Luna 5U C18(2), размер пор 100 Å, длина 150 × диаметр 4,60 мм, размер сорбента 5 µm. Проба, разбавленная в 20 раз.

Результаты и обсуждение

Нами проведены качественные реакции на наличие биофлавоноидов и алкалоидов в извлечениях из травы аврана лекарственного, полученных разными способами (табл. 1, 2). Интенсивность проявления окраски в разных качественных реакциях на биофлавоноиды увеличивалась от водного настоя к 15%-й спиртовой настойке и экстрактам, полученным с использованием 70 и 96%-го этилового спирта (табл. 1). В то время как появление осадка и изменение интенсивности окраски в разных качественных реакциях (табл. 1), свидетельствующее о наличии алкалоидов, наоборот, понижалось от водного настоя к 15%-й настойке и экстрактам, полученным с использованием 70 и 96% этилового спирта.

В 96%-м спиртовом экстракте аврана алкалоиды не обнаружены.

Таблица 1. Результаты специфических качественных реакций на биофлавоноиды в экстрактах из травы аврана лекарственного, полученных разными способами

Извлечения из травы аврана	Результаты качественных реакций	
	в пробе Синода	с хлоридом алюминия
1	Интенсивное красно-коричневое окрашивание	Интенсивное лимонно-желтое окрашивание
2		
3	Слабое красно-коричневое окрашивание	Слабое лимонно-желтое окрашивание
4		

Примечания: цифрами обозначены: 1) экстракт, полученный 96%-м этиловым спиртом, 2) водно-спиртовой экстракт, полученный 70%-м этиловым спиртом, 3) 15%-я спиртовая настойка, 4) спиртовой раствор водного настоя.

Таблица 2. Результаты качественных реакций на алкалоиды в извлечениях из травы аврана лекарственного, полученных разными способами

Извлечения из аврана	Результаты качественных реакций с			
	реактивом Вагнера-Бушарда	раствором 1% пикриновой кислоты	раствором кислоты фосфорномолибденовой	кремневольфрамовой кислотой
1	Изменения отсутствовали			
2				
3	Выпадение бурого осадка	Пожелтение и помутнение раствора	Пожелтение раствора, со временем переходящее в зеленое	Осветление раствора
4				

Примечания: цифрами обозначены: 1) экстракт, полученный 96%-м этиловым спиртом, 2) водно-спиртовой экстракт, полученный 70%-м этиловым спиртом, 3) 15%-я спиртовая настойка, 4) спиртовой раствор водного настоя.

Были проанализированы предложенный нами способ экстракции из травы аврана 96%-м спиртом [14] и наиболее близкий к нему способ получения экстракта из аврана лекарственного путем экстракции измельченного сырья 96%-м этанолом (или метанолом, или н/(изо)-пропанолом), удаления растворителя под вакуумом при температуре 80 °С, нагревания остатка с растворителем (ароматическим или циклическим) или хлорированным растворителем (бензолом, толуолом, ксилолом, хлороформом), удаления растворителя под вакуумом, растворения очищенного экстракта в воде при температуре 55–130 °С, охлаждения, обработки метилэтилкетонем, фильтрования, удаления растворителя дистилляцией под вакуумом [5] (табл. 3). Токсичность экстракта аврана, полученного указанным способом, по мнению авторов патента, снижена, но экстракт обладает сильным слабительным и спазмолитическим действием [5].

Наиболее значимые отличия сравниваемых способов получения экстрактов заключаются в трех действиях: «4», «6» и «7» (табл. 3). В действии «4» приготовление экстракта в противопоставленном способе происходит не только с добавлением растворителя, но и кипячением полученного раствора не указанное в патенте количество времени, из чего следует, что время кипячения не влияет на выход целевых продуктов. В то время как в нашем способе экстракция путем кипячения в 96%-м этиловом спирте (температура его кипения, как известно, 78 °С) длится строго 15 мин (т.к. при более длительном кипячении происходит разрушение целевых продуктов).

Таблица 3. Сопоставительный анализ предложенного и противопоставленного способов экстракции из травы аврана лекарственного

Этапы	Противопоставленный способ	Предложенный нами способ
1	Измельчение сырья	
2	Экстракция спиртом 96%-м путем кипячения	Экстракция спиртом 96%-м на водяной бане, путем доведения до кипения и кипячения в течение 14–15 мин. Фильтрование полученного экстракта и тщательный отжим экстрагируемого сырья для удаления крупных балластных частиц
3	Выпаривание экстракта методом дистилляции или перегонки в вакууме	Выпаривание досуха в термостате при температуре не выше 55–60 °С
4	Растворение полученного экстракта ароматическими или ациклическими углеводородами или хлорированными растворителями с последующим кипячением данного раствора	Добавление к выпаренному экстракту дистиллированной воды 40–50 °С (4/5 части от общего объема), тщательное растворение сухого экстракта. Добавление к водному раствору сухого экстракта хлороформа (1/5 части от общего объема) для растворения токсичных соединений (алкалоидов, гликозидов). Все манипуляции проводятся при температуре не выше 55–60 °С
5	Отсутствует	Центрифугирование водно-хлороформного раствора сухого экстракта в течение 15 мин при скорости 1500 оборотов в минуту, что в короткий срок позволяет получить наиболее полное разделение на водную фракцию целевых продуктов и хлороформную фракцию токсичных продуктов, содержащих неполярные примеси, такие как хлорофилл и др., а также алкалоиды и гликозиды
6	Удаление растворителя (хлороформа) из горячего раствора при температуре 80 °С путем использования вакуума. Экстрагирование алканолом с 4 до 5 атомов углерода, или диалкилом кетоном, имеющим всего от 4 до 6 атомов углерода	Удаление хлороформной фракции вместе с неполярными примесями (хлорофилла) и др., а также алкалоидами и гликозидами. Все длительные манипуляции проводятся при температуре не выше 55–60 °С
7	Отделение органической фазы от водной путем декантации или вакуумом, в дальнейшем используется органическая фаза и удаление растворителя полностью из органической фазы, соответственно азеотропной дистилляцией, оставляя осадок, который называется очищенный экстракт	В дальнейшем используется водная фаза
8	Получается жидкий остаток, содержащий алкалоиды и гликозиды и не содержащий флавоноиды	Высушивание водной фракции в чашке Петри, что позволяет получить сухой остаток целевых продуктов

На этапах «б» и «7» (табл. 3) в противопоставленном нашему способе путем испарения удаляют хлороформ без удаления алкалоидов и гликозидов, с помощью которого они были выделены, и в дальнейшем работают с органической фракцией, содержащей данные токсические соединения и не содержащей флавоноиды, т. к. их большая часть разрушилась на предыдущих этапах. В то время как в нашем способе алкалоиды и гликозиды, содержащиеся в хлороформной фракции, полученной путем центрифугирования (на 1500 оборотов), удаляются.

В итоге получается экстракт в виде сухого остатка, что позволяет оценивать его концентрацию, а в противопоставленном способе добавляются спирты и эфиры и на выходе получается жидкий экстракт, в котором затруднено определение концентрации.

Указанные нами отличия способов сказываются на конечном продукте, что подтверждается и разными их биологическими свойствами. Так, хотя в противопоставленном способе и указывается, что полученный экстракт обладает сниженной токсичностью, его LD₅₀ для крыс составляет при пероральном введении 600 мг/кг [7], а экстракт, полученный заявленным нами способом, даже при более биодоступном введении, внутривентриальном (т.е. 100% попадании в кровоток) – 1663 мг/кг не вызывает гибели ни одного животного [5, 11]. Вышеизложенное свидетельствует о гораздо более высокой токсичности экстракта, полученного противопоставленным способом, и низкой токсичности полученного нами экстракта. Следовательно, экстракты, полученные сравниваемыми способами, представляют собой разные биологические активные композиции с разными классами токсичности [5, 10–12].

Помимо разных классов токсичности, сравниваемые биологически активные композиции обладают и разным действием. Так, противопоставленный экстракт обладает выраженным слабительным эффектом [5], которым обладает и отвар из аврана, что обусловлено содержащимися в нем токсичными веществами (алкалоидами и гликозидами), оказывающими раздражающий эффект на кишечник, и не обладает общим благоприятным влиянием на организм животных, в отличие от экстракта, полученного нами способом [5, 10–12].

Из экстракта аврана, полученного 96%-м этиловым спиртом, были выделены органические вещества, вероятность обнаружения которых соответствует параметрам «превосходное и хорошее соответствие» (табл. 4, рис. 1). В результате проведенного исследования нами впервые обнаружено, что среди флавоноидов аврана присутствует также и кверцетин (рис. 2). Среднее значение кверцетина в данном экстракте с использованием градуировочного графика стандартного образца кверцетина (98%) Sigma составляет 0,66%. Установленное нами методом жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) количество кверцетина в сухом остатке экстрактивных веществ (получаемого из 10 г сухой травы аврана) составило 350 мкг.

Таблица 4. Содержание веществ в экстракте из травы аврана лекарственного, полученном 96%-м этиловым спиртом

Название вещества	Молекулярный вес	Брутто формула соединения
4-vinyl-2-methoxyphenol (4-винил-2-метоксифенол)	150	C ₉ H ₁₀ O ₂
4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4H-пиран-4-ОН)	144	C ₆ H ₈ O ₄
2,3-dihydrobenzofuran (2,3-дигидробензофуран)	120	C ₈ H ₈ O
3-Furoic acid (3-фуранкарбоновая кислота)	112	C ₅ H ₄ O ₃
2-Furancarboxaldehyde, 5-(Hydroxymethyl), (5-гидроксиметил-2-фууральдегид)	126	C ₆ H ₆ O ₃
Ethyl-α-d-riboside (этил-α-d-рибозид)	178	C ₇ H ₁₄ O ₅
4-propylphenol (4-пропилфенол)	136	C ₉ H ₁₂ O
Pyrocatechol (пирокатехин)	110	C ₆ H ₆ O ₂
L-luxose (pentose) (L-луксоза (пентоза))	150	C ₅ H ₁₀ O ₅
6-Deoxyhexose L-galactose, 6-deoxy (6-деоксигексоза L-галактоза)	164	C ₆ H ₁₂ O ₅
4-Hydroxy-3-methoxyphenylethyl alcohol (Бензоилуксусной кислоты этиловый эфир)	168	C ₉ H ₁₂ O ₃
Hexadecanoic Acid (Palmitic Acid)	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Гексадекановая кислота (Пальмитиновая кислота)		
Homovanillic acid (Гомованилиновая кислота)	182	C ₉ H ₁₀ O ₄
D-allose (глюкоза)	180	C ₆ H ₁₂ O ₆
d-Mannitol, 1,4-anhydro- (1,4-ангидро- d-маннитол)	164	C ₆ H ₁₂ O ₅
Benzoic Acid Retardex (Бензойная кислота)	122	C ₇ H ₆ O ₂
Кверцетин	302.2	C ₁₅ H ₁₀ O ₇

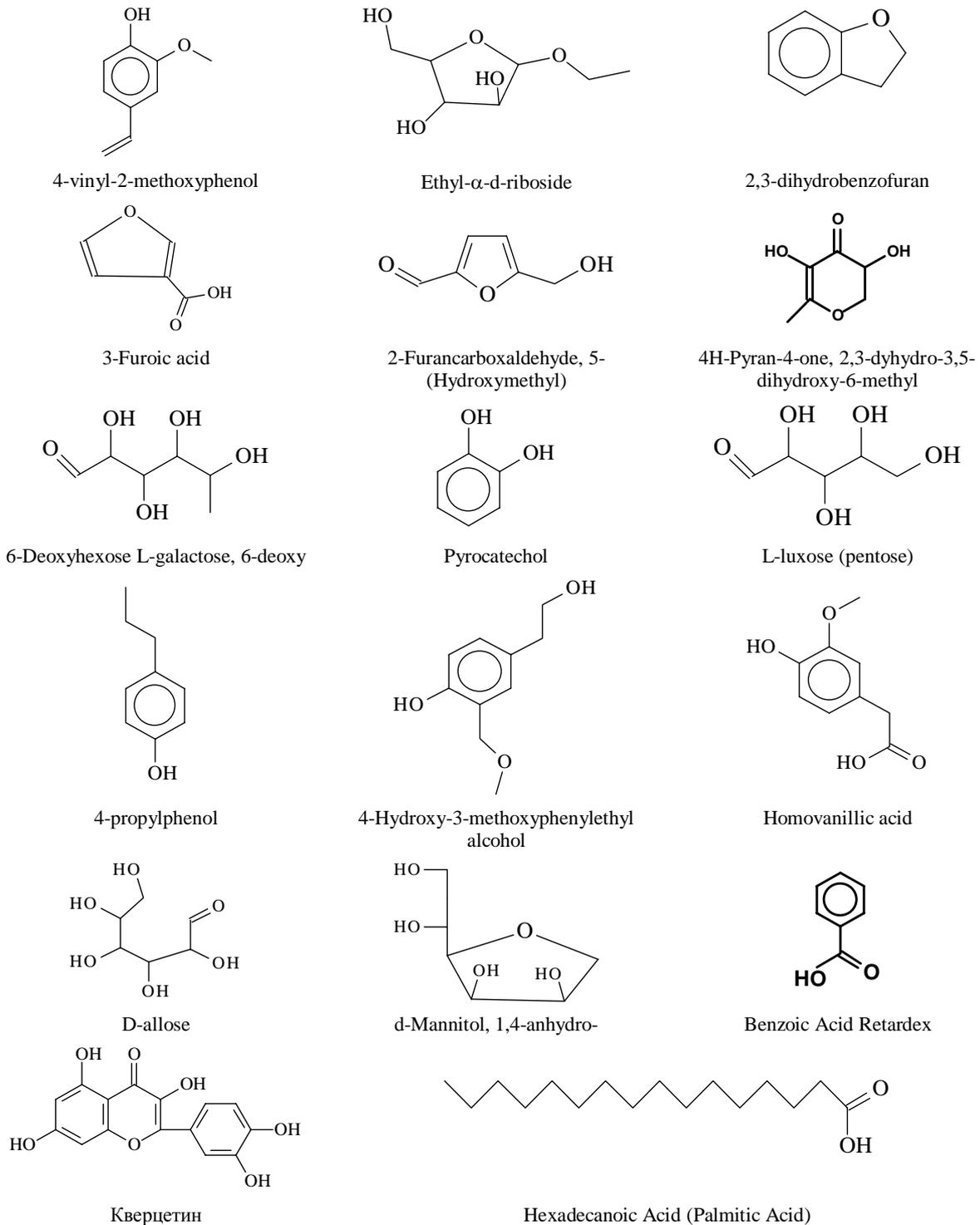


Рис. 1. Формулы веществ, выявленных в экстракте аврана лекарственного

В результате нами разработан способ получения сухого экстракта из травы аврана лекарственного, содержащего новую, ранее не известную для данного растения биологически активную композицию. Новая композиция включает сумму флавоноидов, в т.ч. и кверцетин, и лишена токсических соединений – алкалоидов и гликозидов, о чем свидетельствует то, что даже высокие дозировки полученного нами экстракта не вызывают посинения губ, удушья, остановки сердца крыс [12, 16–19]. Кроме того, полученная нами БАК обладает новыми свойствами, в частности антиоксидантным, противоопухолевым и др. [5, 10–12], среди которых отсутствуют такие, как слабительное, рвотное, спазмолитическое, диуретическое, дигиталисоподобное на сердце.

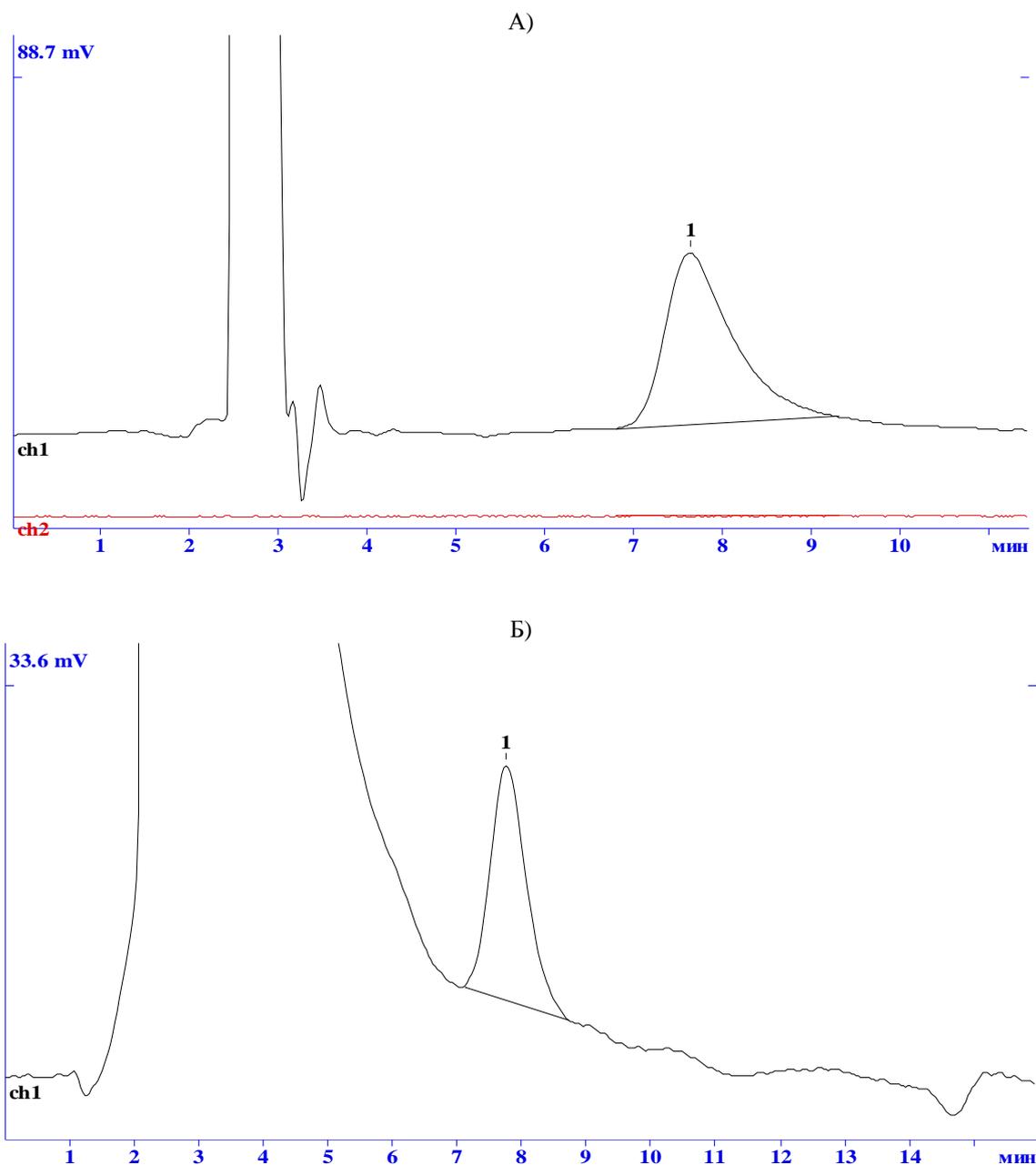


Рис. 2. Хроматограммы: А – анализируемого раствора (проба, разбавленная в 20 раз), Б – модельного раствора кверцетина, в концентрации – 10 мкг/мл

Выводы

В полученном нами 96%-м спиртовом экстракте аврана выявлен отрицательный результат качественных реакций на алкалоиды, что объясняет отсутствие токсических эффектов при его использовании в экспериментах с лабораторными животными.

Новая для аврана лекарственного нетоксичная биологически активная композиция содержит флавоноид – кверцетин, не обнаруженный ранее в сырье аврана. Среднее значение кверцетина в данном экстракте с использованием градуировочного графика стандартного образца кверцетина (98%) Sigma составляет около 0,66%. Установленное нами методом жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) количество кверцетина в сухом остатке экстрактивных веществ (получаемого из 10 г сухой травы аврана) составило 350 мкг.

Полученный данным способом экстракт из травы аврана лекарственного может быть рекомендован для дальнейшего изучения его биологических свойств.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР. М., 1989. Вып. 2. 400 с.
2. <http://www.dorogaistin.ru>
3. <http://www.travolekar.ru/articles.php>
4. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. М., 1976. 186с.
5. Patent 196400488251063118 (GB). Plant extract / M.J. Le. 1967.
6. Patent 5804575 (US). Methods of manufacturing betulinic acid / Pezzuto Dg., Darrick S.H.L. Kim. 1997.
7. Ruzicka L., Lambertson A.H., Christie Ruzicka C.W. Synthetic approach to betulinic acid // *Helv. Chim. Acta.* 1938. Vol. 21. Pp. 1706–1717.
8. Куркин В.А. Фармакогнозия : учебник для студентов фармацевтических вузов. Самара, 2004. 1180 с.
9. Алефинов А.Н. Фитотерапия против онкологии. СПб., 2010. 240 с.
10. Полуконова Н.В., Меркулова Е.П., Дурнова Н.А., Романтеева Ю.В., Бородулин В.Г. Изучение антиоксидантной активности экстракта аврана лекарственного на крысах с перевитой опухолью печени РС-1 // Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения : тез. докл. науч.-практ. конф. Киев, 2011. С. 585.
11. Наволокин Н.А., Павлова А.В. Морфологические изменения в мышцах у лабораторных крыс и определение токсичности при введении экстракта аврана // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2012. Вып. 2. С. 82–83.
12. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with trasplanted liver cancer // *Russian Open Medical Journal.* 2012. Vol. 1, N2. С. 0203. URL: <http://www.romj.org/2012-0203>.
13. Государственная фармакопея РФ. М., 2008. 704 с.
14. Патент 2482863 (РФ). Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью / Н.В. Полуконова, Н.А. Наволокин, Н.А. Дурнова, Г.Н. Маслякова, А.Б. Бучарская. 2013.
15. Золотов Ю.А. Аналитическая химия: фрагменты картины. М., 1999. 144 с.
16. Байтман Т.П., Наволокин Н.А. Влияние экстракта аврана лекарственного на лабораторных животных с перевитой саркомой S-45 // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2013. Т. 3, №2. С. 374.
17. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N. Morphofunctional changes in laboratory rats with transplanted liver cancer PC-1 after prolonged per-oral administration of flavonoid containing extracts // Вестник российского государственного медицинского университета. 2012. Вып. 1. С. 277–278.
18. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Морфология внутренних органов и опухоли лабораторных крыс с перевитым раком печени РС-1 при пероральном введении флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) и кукурузы антоциановой (*Zea mays* L.) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9, №2. С. 213–220.
19. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Скворцова В.В., Байтман Т.П., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12, №2. С. 59–59а.

Поступило в редакцию 28 февраля 2013 г.

После переработки 16 ноября 2013 г.

Polukonova N.V.* , Durnova N.A., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Golikov A.G. CHEMICAL ANALYSIS OF THE NEW BIOLOGICAL ACTIVE COMPOSITION FROM MEDICATIVE HERB HEDGE-HISSOP (*GRATIOLA OFFICINALIS* L.)

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Bolshaya Kazachia st., 112, Saratov, 410012 (Russia), e-mail: e-mail: polukonovanv@yandex.ru

The method of extraction from vegetable raw materials, allowing to receive non-toxic composition of biologically active substances from poisonous plants containing flavonoids, for example, poisonous plant coast of *Gratiola officinalis* L. The increase of the percentage content of ethyl alcohol (from 15 to 96%), used as a solvent, output changes alkaloids so that the extract obtained 96% ethanol does not provide for positive qualitative reaction on the content of alkaloids. Investigated the chemical composition of the extract of the coast of *Gratiola officinalis* non-toxic, biologically active composition. It is established that the extract contains a previously unknown to this plant bioflavonoid - quercetin. The average value of quercetin in this extract, using the calibration curve of the standard sample quercetin (98%) Sigma, is 0.66%. Established by liquid chromatography (HPLC) number of quercetin in the dry residue of the extractive substances (gained from 10 g of dry grass coast of *Gratiola officinalis*) amounted to 350 mcg.

Keywords: *Gratiola officinalis* L., hyssop, bioflavonoids, chemical composition, extraction method, Quercetin.

References

1. Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. [USSR]. Moscow, 1989, no. 2, 400 p. (in Russ.).
2. <http://www.dorogaistin.ru> (in Russ.).
3. <http://www.travolekar.ru/articles.php> (in Russ.).
4. Ponomarev V.D. *Ekstragirovanie lekarstvennogo syr'ia*. [Extraction of crude drug]. Moscow, 1976, 186 p. (in Russ.).
5. Patent 196400488251063118 (GB). 1967.
6. Patent 5804575 (US). 1997.
7. Ruzicka L., Lambertson A.H., Christe Ruzicka C.W. *Helv. Chim. Acta*, 1938, vol. 21, pp. 1706–1717.
8. Kurkin V.A. *Farmakognozia*. [Pharmacognosy]. Samara, 2004, 1180 p. (in Russ.).
9. Iefirov A.N. *Fitoterapiia protiv onkologii*. [Herbal medicine against cancer.]. St. Petersburg, 2010, 240 p. (in Russ.).
10. Polukonova N.V., Merkulova E.P., Durnova N.A., Romanteeva Iu.V., Borodulin V.G. *Biologicheski aktivnye veshchestva: fundamental'nye i prikladnye voprosy polucheniia i primeneniia: tezisy dokladov nauchno-prakticheskoi konf.* [Biologically active substances: fundamental and applied to obtain and use: Abstracts of scientific conference]. Kiev, 2011, pp. 585. (in Russ.).
11. Navolokin N.A., Pavlova A.V. *Biulleten' meditsinskikh Internet-konferentsii*, 2012, no. 2, pp. 82–83. (in Russ.).
12. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. *Russian Open Medical Journal*, 2012, vol. 1, no. 2, pp. 0203. URL: <http://www.romj.org/2012-0203>.
13. Gosudarstvennaia farmakopeia RF. [State Pharmacopoeia of the RF]. Moscow, 2008. 704 c. (in Russ.).
14. Patent 2482863 (RU). 2013. (in Russ.).
15. Zolotov Iu.A. *Analiticheskaiia khimiia: fragmenty kartiny*. [Analytical chemistry: fragments of paintings]. Moscow, 1999, 144 p. (in Russ.).
16. Baitman T.P., Navolokin N.A. *Biulleten' meditsinskikh internet-konferentsii*, 2013, vol. 3, no. 2, pp. 374. (in Russ.).
17. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N. *Vestnik rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*, 2012, no. 1, pp. 277–278.
18. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Masliakova G.N., Bucharskaia A.B., Durnova N.A. *Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal*, 2013, vol. 9, no. 2, pp. 213–220. (in Russ.).
19. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Masliakova G.N., Skvortsova V.V., Baitman T.P., Bucharskaia A.B., Durnova N.A. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2013, vol. 12, no. 2, pp. 59–59a. (in Russ.).

Received February 28, 2013

Revised November 16, 2013

* Corresponding author.

ID: 2017-02-1276-A-13114

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

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

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

Резюме

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

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

Введение

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

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

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

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

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

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

Материал и методы

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

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

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

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

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

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

Результаты и обсуждение

При внутримышечном введении экстракта аврана отмечали статистически значимое ($T \geq 1,96$) замедление темпов роста перевиваемого рака почки, чем в группе сравнения во все дни измерений. На момент окончания эксперимента объем опухоли в этой группе составил $6,7 \pm 0,53 \text{ см}^3$ и был на 40 % меньше ($T \geq 1,96$), чем в группе сравнения ($11 \pm 0,92 \text{ см}^3$).

При пероральном ведении экстракта аврана наблюдали замедление темпов роста опухоли ($T \geq 1,96$) по сравнению с крысами группы сравнения с пятого по десятый день и с двенадцатого по четырнадцатый день введения экстракта. На момент окончания эксперимента объем опухоли в этой группе составил $8,55 \pm 0,26 \text{ см}^3$ и был на 23 % меньше ($T \geq 1,96$), чем в группе сравнения ($11 \pm 0,92 \text{ см}^3$). Следует отметить, что именно в этой группе животных с 9 по 11 день отмечали самый медленный темп прибавки массы опухоли. (Рис.1).

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

Патоморфоз рака почки

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

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

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

Примечание: ИТРО – индекс торможения роста опухоли по массе

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

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

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

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



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

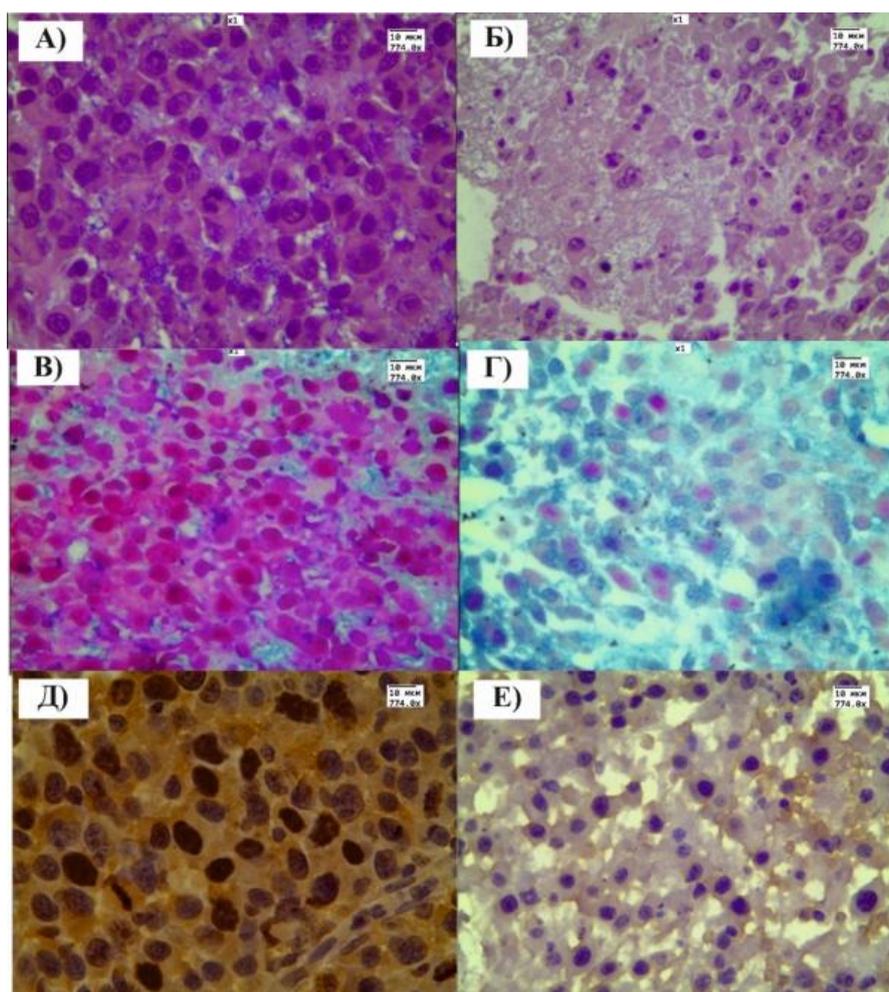


Рисунок 2. Морфологические изменения в перевитом раке почки. А – контрольная группа, Н&Е; Б – дистрофические и некротические изменения, апоптотные тельца, при в/м введении экстракта аврана, Н&Е; В – контрольная группа, окраска по Браше; Г – снижение экспрессии окраски на ДНК при в/м введении экстракта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

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

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

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

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

Заключение

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

Литература

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

ID: 2013-02-6-T-2077

Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Бибилова О.А.

Цитотоксическая активность *in vitro* экстракта аврана на культуре клеток почек эмбрионов свиньи, зараженных онковирусом

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, кафедра общей биологии, фармакогнозии и ботаники, кафедра патологической анатомии

Научные руководители: д.б.н. Богатырев В.А., д.б.н. Полуконова Н.В., д.м.н. Маслякова Г.Н.

На белых лабораторных крысах ранее было установлено, что экстракт аврана лекарственного *Gratiola officinalis* L. обладает антиоксидантным, противоопухолевым и иммуномодулирующим действиями (Полуконова и др., 2011; Navolokin et al., 2012).

Цель работы – определить цитотоксичность *in vitro* разных концентраций раствора сухого экстракта аврана на культуре клеток почек эмбриона свиньи (SPEV-2).

Материалы и методы. Использован раствор экстракт из сырья аврана лекарственного. Моделью опухолевых клеток послужила культура клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV-2), зараженных онковирусом. Сухой экстракт аврана растворялся в культуральной среде RPMI 4. Цитотоксичность определяли культивированием культуры SPEV-2 с исследуемым раствором в питательной среде. Анализировались следующие концентрации раствора экстракта: 3,2 мкг/мл; 32 мкг/мл; 320 мкг/мл; 3,2 мг/мл и 32 мг/мл. Клетки культивировались в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 часов, после чего окрашивались йодистым пропидием и анализировались. Для визуализации клеток использовали комбинирование нескольких микроскопических режимов регистрации светорассеяния и флуоресценции (на световом микроскопе Leica DM 2500, конфокальном микроскопе Leica LSM SP-5). Использованы следующие показатели: среднее число мертвых клеток, окрашенных пропидием в оранжевый цвет, среднее общее количество клеток в культуре, отношение числа мертвых клеток к общему количеству клеток в культуре, умноженное на 100%.

Результаты и обсуждение. Минимальной концентрацией раствора экстракта, достоверно ингибирующей рост клеток в культуре, является 32 мкг/мл. Наибольшая цитостатическая активность раствора экстракта установлена для концентрации 3,2 мг/мл, которая приводит к практически полной гибели клеток в культуре.

Ключевые слова

клеточные культуры, авран, цитотоксичность, почка