

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики


ФГБОУ ВО СГМУ
им. В. И. Разумовского Минздрава России

**ВЫЯВЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА
КИРКАЗОНА ЛОМОНОСОВИДНОГО, СОДЕРЖАЩЕГО
ФЛАВОНОИДЫ, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO* И *IN VITRO***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы
Направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Шарковой Екатерины Алексеевны

Научный руководитель
Зав. кафедрой биохимии и биофизики
д.б.н., профессор




С.А. Коннова
14.06.2017

Научный консультант
д.б.н., профессор кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники
ФГБОУ ВО СГМУ
им. В. И. Разумовского
д.б.н., профессор



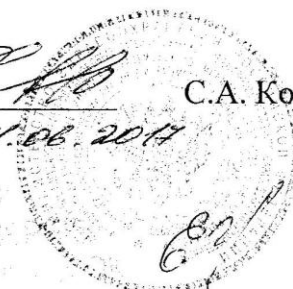
Н.В. Полуконова

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор



С.А. Коннова
14.06.2017

Саратов 2017



Введение. В качестве основного направления в разработке новых препаратов на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС) для использования в терапии онкологических заболеваний является поиск, так называемых, модификаторов биологических реакций (МБР). Ведущее место в лечении онкологических заболеваний занимают ЛР, которые содержат фенольные соединения – дубильные вещества, флавоноиды, ксантоны, антра- и нафтохиноны, фенолгликозиды и др.

К таким растениям относится Кирказон ломоносовидный – *Aristolochia clematitis* (L. 1753.) Как известно, водные извлечения Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) обладают высокой токсичностью за счет присутствия ядовитых соединений. В то время как экстракт, полученный 95% этиловым спиртом не только не содержит ядовитых соединений и, соответственно, не токсичен, но и обладает повышенным содержанием флавоноидов, в связи с чем, перспективен для дальнейшего исследования. Целью данной работы явилось выявление физиологической активности экстракта Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*): противоопухолевой, гено- и цито- токсичности в экспериментах *in vivo* и *in vitro*.

Для достижения данной цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) исследование химического состава экстракта надземной части Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*);
- 2) установление влияния водного экстракта Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) на функциональную активность интерфазных хромосом (тест на цито- и генотоксичность) в экспериментах *in vivo* с использованием политенных хромосом личинок двукрылых насекомых;
- 3) изучение влияния экстракта на клетки почки эмбриона свиньи, зараженные онковирусом (SPEV-2) в эксперименте *in vitro*.

Теоретической и методологической основой исследования выступают научные труды отечественных и зарубежных ученых-биологов, посвященные актуальным проблемам разработки препаратов на основе растительного сырья. В процессе работы были использованы такие приемы научного исследования как системный подход, статистические методы обработки информации.

Структура работы обусловлена целью и задачами исследования, включает введение, три раздела (обзор литературы, материал и методы исследования и результаты исследования), заключение и список использованных источников.

Основное содержание работы.

Водный экстракт Кирказона ломоносовидного (*A. clematitidis*) готовили запатентованным способом, направленным на выход биофлаваноидов. Сырьем послужила надземная часть растения. Для определения в исследуемом экстракте суммы растворимых фенольных соединений и флавоноидов проводили по методу Фолина и Чокальтеу в модификации Синглтона и Росси (Singleton, Rossi, 1965). Метод основан на реакции фенолов с реактивом Фолина-Чокальтеу. Для наиболее подробного изучения экстракта Кирказона ломоносовидного (*A. clematitidis*) был проведен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ хроматограммы экстракта показывает, что экстракт Кирказона ломоносовидного (*A. clematitidis*) содержит большое количество полярных компонентов. В экстракте обнаружены компоненты (Рисунок 1), соответствующие по временам удерживания стандартам нарингина, прунинаи нарингенина.

Так же, композиция экстракта Кирказана ломоносовидного (*A. clematitidis*) содержит компоненты, отличающиеся по временам удерживания, но имеющие при этом близкие по профилю спектры поглощения.

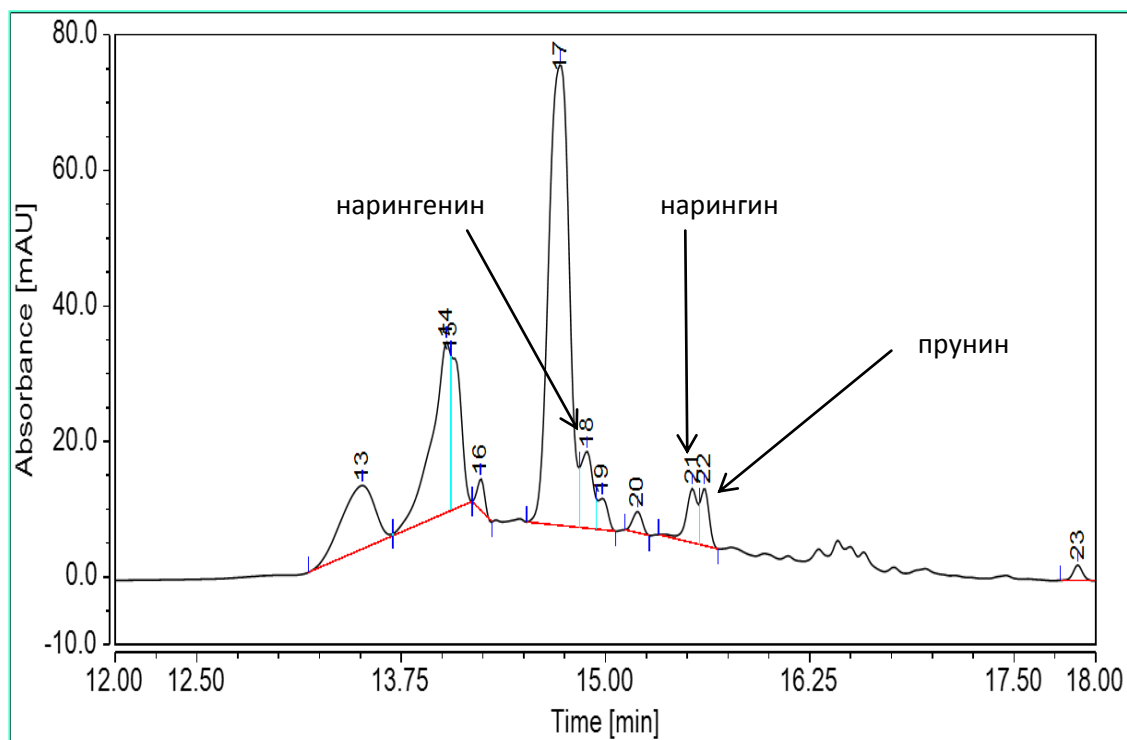


Рисунок 1 – Высокоэффективная жидкостная хроматография экстракта Кирказона ломоносовидного (*A. clematitidis*).

Стрелками показаны совпадения по временам удерживания стандартов нарингина, прунина и нарингенина

Для исследования противоопухолевой активности экстракта Кирказона ломоносовидного (*A. clematitidis*) была выбрана культура клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV-2) Культура инфицирована онковирусами «а» и «с», обладает выраженной чувствительностью к вирусам: арбовирусы; ротавирус SA -11. Воздействовали водным экстрактом Кирказона ломоносовидного (*A.clematitidis*), разведенным в питательной среде в концентрациях, начиная с 30 мг/мл с последующим разведением в 2 раза. Наблюдения величина с 1 часа до 24 часов. Клетки с ядерным материалом в виде «серпов» расценивали как состояние, предшествующее апоптозу. Появление характерной внутриклеточной грануляции рассматривали, как свидетельство развития некробиотических процессов в клетке, отделения их от подложки и последующей гибели ДНК на фрагменты неодинаковой величины (при флуоресцентном режиме) расценивали, как признаки апоптоза.

В опытных образцах под действием экстракта Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) при всех концентрациях уменьшилось общее количества клеток, что свидетельствует о подавлении пролиферативной активности клеток, зараженных онковирусом. Концентрации экстракта (15 и 30 мг/мл) приводили к быстрой массовой гибели клеток (Рисунок 2).

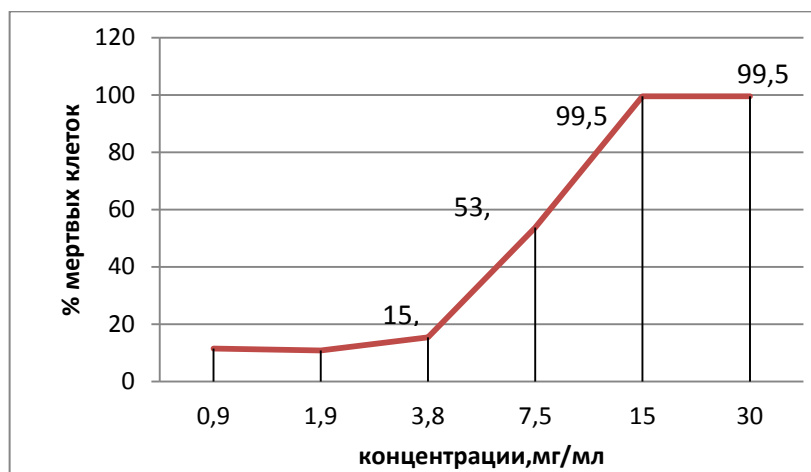


Рисунок 2– Зависимость количества (%) мертвых клеток от концентрации экстракта Кирказона ломоносовидного, нормированное на контроль.

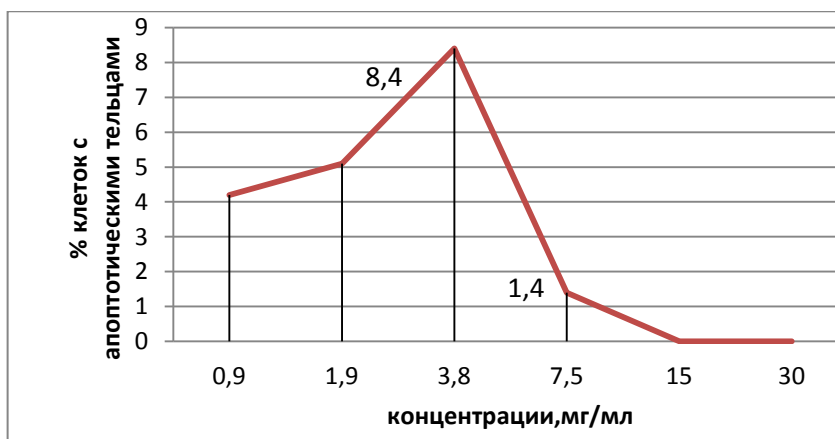


Рисунок 3 – Результаты исследования влияния концентрации экстракта Кирказона ломоносовидного (*A.clematitis*) на формирование в клетках опухоли апоптотических телец (%), нормированный на контроль – количество мертвых клеток).

Противоопухолевые процессы с апоптоз индуцирующим механизмом действия выражены при концентрациях экстракта Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) от 0,9 до 3,8 мг/мл. Максимальное

количество клеток, с апоптотическими тельцами наблюдается при концентрациях 3,8 и 1,9 мг/мл (Рисунок 3).

Полулетальная концентрация водной фракции экстракта травы Кирказона ломоносовидного (*A. clematitidis*), полученная пробит – анализом методом сравнения количества клеток в эксперименте и контрольной группе, составила 7,5 мг/мл (Рисунок 4).

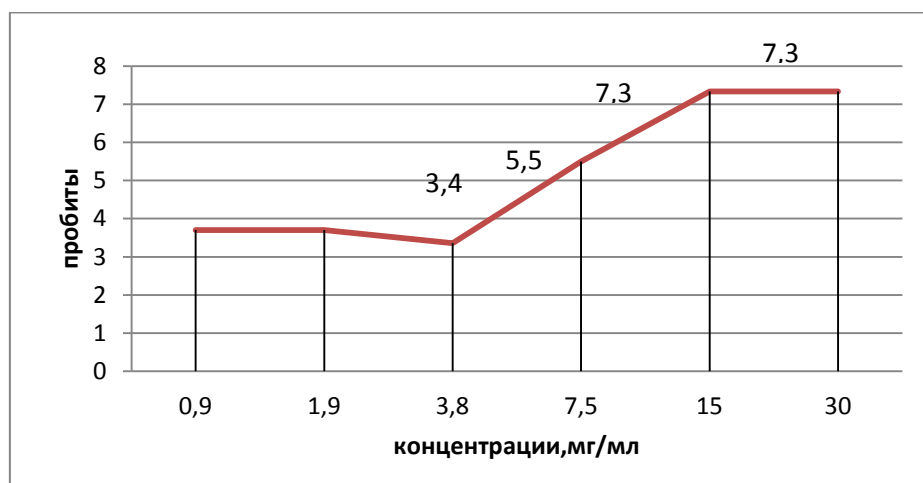


Рисунок 4 – Зависимость погибших клеток (%) (пробиты) от концентрации (определение LC_{50}).

При появлении злокачественных опухолей любой этиологии в раковых клетках чаще отмечается политения хромосом. Наиболее удобным объектом для ее изучения являются хромосомы клеток слюнных желез личинок хирономид (*Ch. plumosus*) с высокой степенью политении.

Всего в ходе эксперимента было исследовано 1000 личинок. До начала эксперимента их акклимировали в течение суток. Исследовали изменения функциональной и пуффинговой активности, политенных хромосом, отмечая изменение их морфотипа при воздействии на них экстрактом Кирказона ломоносовидного (*A. clematitidis*) в концентрациях $1/10LC_{50}$ и $1/100 LC_{50}$ через 1 и 24 часа. Результаты представлены в таблицах (Таблицы 1 – 3).

В результате обе исследованные концентрации экстракта оказывают воздействие на ФА ПХ. При этом ФА всех КБ наиболее подавлена при концентрации $1/10$ мг/мл, чем при $1/100$ мг/мл. В то время, как ФА NOR

более подавлена при концентрации 1/100 мг/мл. Размах варьирования показателя ФА BRB в контроле значительно выше, чем при низкой концентрации. Минимальный размах наблюдается при высокой концентрации, что подчеркивает значительное влияние этой концентрации на функциональное состояние ПХ.

Таблица 1 – Исследование временных и контрационных факторов (контроль)

Время экспозиции	1 час	24 часа
Функциональная активность	ФА BRB, BR1GR, BR2GR, NOR не меняется.	ФА BRB и BR1GR повышается. ФА BR2GR понижается. ФА NOR не меняется в течение суток
Пуффинговая активность	ПХ функционально активны за счет активности участков как внутри плеча с образованием пуфов de novo, так и распуффивании предтеломерных районов. Так, выявлено 15 пуфов de novo.	наблюдается тенденция увеличения четкости дисковой структуры за счет снижения ФА ПХ. Всего вместо 15 пуфов работают только восемь пуфов de novo.
Морфотип ПХ	нормальный	

Таблица 2 – Исследование временных и концентрационных факторов (1/10LC50)

Время экспозиции	1 час	24 часа
Функциональная активность	По сравнению с контролем ФА BRB и BR1GR не меняется. ФА BR2GR и NOR увеличивается.	ФА всех колец Бальбиани (BRB, BR1GR и BR2GR) и NOR понижается по отношению к контролю.
Пуффинговая активность	Активны пять пуфов de novo, из которых три были выявлены также и в контроле. Обнаружено два новых пуфа de novo. В целом пуффинговая активность ПХ подавлена	Новых пуфов по сравнению с контролем не выявлено. Наблюдается угнетение активности восьми пуфов de novo по сравнению с контролем, так же угнетается активность четырех пуфов de novo по сравнению с состоянием активности при концентрации через 1 ч:
Морфотип ПХ	нормальный	удлиненный

Таблица 3 – Исследование временных и контрационных факторов
(1/100 LC50)

Время экспозиции	1 час	24 часа
Функциональная активность	BRB не меняется. ФА BR2GR уменьшается. ФА BR1GR и NOR увеличивается	ФА колец Бальбиани – BRB, BR1GR и NOR понижается. ФА BR2GR не меняется.
Пуффинговая активность	Активны восемь пуфов de novo, из которых три были выявлены также и в контроле	Новых пуфов по сравнению с контролем не выявлено. Выявлено угнетение активности восьми пуфов de novo по сравнению с контролем
Морфотип ПХ	нормальный	

На фоне подавления функциональной активности ПХ возникновение мутаций маловероятно, в связи с чем, водный раствор сухого спиртового экстракта Кирказона ломоносовидного (*A.clematitidis*), полученный указанным в патенте способом, не оказывает генотоксического эффекта в отношении интерфазных хромосом эукариот. В то время, как экстракты, полученные какими – либо другими способами, не препятствующими выходу аристолохиевой кислоты, обладают канцерогенным свойством.

Заключение. Лекарственное растительное сырье, содержащее флавоноиды, является перспективой для получения производных этих веществ, обладающих лекарственным действием. На основе флавоноидов возможно создание новых высокоактивных лекарственных средств, обладающих различными видами активности. Испытываются новые антибиотики, а также вещества, способствующие усилению действия других лекарств, благодаря способности флавоноидов подавлять работу механизмов множественной лекарственной устойчивости. Флавоноиды и их производные обладают меньшей токсичностью и проявляют меньше побочных эффектов, чем аналогичные лекарственные средства, полученные из других источников. Аспекты негативного действия избытка флавоноидов исследованы мало.

В последние годы появились сообщения о противоопухолевом действии флавоноидов. Однако препаратов, содержащих чистые флавоноиды, пока имеется немного. Чаще эти соединения находятся в растениях в комплексе с другими БАВ и используются суммарно.

Выводы. 1) Проведенные качественные реакции с извлечениями из надземной части Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) показали наличие в них дубильных веществ, алкалоидов и флавоноидов. Количественное содержание фенольных соединений в экстракте Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) было установлено методом Фолина–Чокольтеу, и составляет $8,0 \pm 0,2$ мг%. На основании данных высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено, что в водном экстракте Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) содержится большое количество полярных компонентов, обнаружены нарингин, прунин и нарингенин, в связи с чем, стандартизацию такой композиции предложено проводить по нарингину, прунину и нарингенину.

2) Противоопухолевые процессы с апоптоз индуцирующим механизмом действия выражены при концентрациях экстракта Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) от 0,9 до 3,8 мг/мл. Максимальное количество клеток, с апоптотическими тельцами наблюдается при концентрациях 3,8 и 1,9 мг/мл.

3) Экстракт Кирказона ломоносовидного (*A. clematitis*) в исследованных концентрациях (0,4 мкг/мл и 0,04 мкг/мл) подавляет функциональную активность политенных хромосом (наиболее действенной оказалась концентрация 0,4 мкг/мл) и не оказывает генотоксического эффекта в отношении интерфазных хромосом эукариот.

По результатам исследований опубликованы работы:

1. Андреева, А. А. **Шаркова, Е. А.** Полуконова, Н. В. "Сравнительный токсикологический анализ водной и хлороформной фракций экстрактов Кирказона ломоносовидного" / А. А. Андреева // Изд - во ИЦ Новосибирского ГАУ «Золотой колос», Новосибирск 2015. – 224 с. (Статья в сборнике Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: Материалы II Международной научной конференции 20–22 октября 2015 г., г. Новосибирск)
2. **Шаркова, Е.А.** Андреева, А.А. "Изучение химического состава Кирказона ломоносовидного и его влияние на культуру опухолевых клеток SPEV - 2." / Е.А. Шаркова, А.А. Андреева // Изд – во Саратов. ун – та. Саратов. 2016. № 14. 103 с. (Статья в сборнике Исследования молодых ученых в биологии и экологии: Сб. науч. тр.)
3. **Шаркова, Е.А.** Андреева, А.А. Полуконова, А.В. Прилепский, А.Ю., Полуконова, Н.В. "Воздействие водного экстракта кирказона ломоносовидного (*Aristolohia clematitidis* L.) на культуру клеток SPEV - 2." // Изд - во ООО " Ракурс". Саратов. 2016. 150 с (Тезисы в сборнике Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой: Материалы VIII всероссийской конференции молодых ученых
4. Андреева, А.А. **Шаркова, Е.А.** Полуконова, Н.В. "Показатели функциональной активности политенных хромосом *Chironomus* для цито - и генотоксического исследования растительных экстрактов" / А.А. Андреева // Изд- во СтГМУ. Ставрополь 2016. 536 с.(Статья в сборнике Неделя науки 2016 : Материалы Всероссийского молодежного форума с международным участием)
5. Андреева А. А., Гелевера Н.И., **Шаркова Е. А.**, Полуконова А.В., Прилепский А.Ю. "Сравнение активности экстрактов Кирказона ломоносовидного (*Aristolóchia clematítis*) и Кипрѐя узколистного (*Chamérion angustifolium*) на культуру клеток SPEV-2" // Саратовский научно – медицинский журнал. Т.12. №2. С 226.

6. Динамика роста перевиваемой опухоли крыс РС-1 под действием экстрактов Таволги вязолистной, Кипрея узколистного и Кирказона ломоносовидного в эксперименте *in vivo* // **Е.А. Шаркова**, А.К. Тарвердян, и др. // Бюллетень медицинских интернет – конференций. (ID: 2017-08-2467-A-15702 Оригинальная статья (свободная структура)

Исследования по теме представлялись на конференциях:

1. V Всероссийская неделя науки с международным участием (2016г.)
2. VI Региональная Научная Конференция «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (2016г.)
3. VIII Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (2016г., стендовый доклад)
4. VI Всероссийской недели науки с международным участием (2017г.)
5. IX Региональная Научная Конференция «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (2017 г.)

