

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ АНТОЦИАНОВОЙ
КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Барбарян Азнив Мхитаровны

Научный руководитель

Доцент кафедры генетики, к.б.н

 10.05.19 Ю.А. Беляченко

Научный консультант

Профессор кафедры общей биологии,

фармакогнозии и ботаники СГМУ

им. В.И. Разумовского, д.б.н., профессор

 10.05.19 Н.В. Полуконова

Зав. кафедрой генетики, д.б.н., доцент

 10.05.19 О.И. Юдакова

Саратов 2019

Введение. Растительный мир представляет собой огромное царство автотрофных организмов, продуцирующих и поставляющих в среду природные органические соединения. Растения являются источником разнообразных биологически активных веществ, среди которых выделяют особую группу растительных метаболитов – флавоноиды.

Как и другие фенольные вещества, флавоноиды связывают свободные радикалы. Эти соединения обладают широким спектром физиологического и биохимического действия на живые организмы. Известны их антиоксидантные, противоопухолевые, антимутагенные и противовирусные свойства, а также Р-витаминная активность.

Флавоноиды являются постоянными компонентами продуктов питания человека. В связи с этим исследование их влияния на организм представляет огромный интерес. В частности, изучение терапевтических эффектов флавоноидов актуально для профилактической медицины.

Целью данной работы являлось изучение антикахексической и противоопухолевой активности экстрактов различных форм антоциановой кукурузы в условиях *in vivo* и *in vitro*. В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1) провести заготовку растительного сырья кукурузы диплоидных линий Пурпурная Саратовская (ПС), Зародышевый маркер Саратовский – Пурпурный (ЗМС-П), гаплоидной, тетраплоидной пурпурной и зеленой формы;

2) получить сухие экстракты по методу двойной спиртовой экстракции с последующим осаждением неполярных веществ хлороформом;

3) определить наличие антикахексической активности при действии экстрактов различных форм кукурузы в эксперименте на белых лабораторных крысах с перевиваемой опухолью печени РС-1;

4) исследовать динамику изменения массы тела крыс с перевиваемой опухолью печени РС-1 при внутрибрюшинном введении экстракта кукурузы ПС, цитостатического препарата Эндоксан и комбинированном введении экстракта и цитостатика;

5) провести сравнение относительных показателей массы внутренних органов в контроле и эксперименте при введении различных типов экстрактов;

6) изучить действие экстрактов антоциановых форм кукурузы в различных концентрациях в культуре клеток карциномы почки A498.

Структура и объем работы. Работа изложена на 86 страницах машинописного текста и включает 6 разделов: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, заключение, выводы, список использованных источников, содержащий 33 наименования.

Основное содержание работы. Сырьем для получения экстрактов служили кроющие листья оберток початков. Для извлечения биологически активных веществ применялась методика, основанная на спиртовой экстракции с последующим осаждением неполярных веществ хлороформом.

Исследование проводилось на 25 белых лабораторных крысах-самцах, массой 145 ± 60 г. Животные были разделены на 5 групп методом случайной выборки (по 5 крыс) – контроль, экспериментальные группы с внутримышечным введением экстракта кукурузы линии ПС, экстрактов тетраплоидной пурпурной и зеленой кукурузы и пероральным введением экстракта тетраплоидной пурпурной кукурузы.

Животным указанных групп проводилась подкожная имплантация (в области лопатки) 0,5 мл 25% опухолевой взвеси в растворе Хэнкса штамма альвеолярного рака печени – РС-1, полученного из банка опухолевых штаммов ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Экстракт вводили ежедневно внутримышечно и перорально через 72 ч после перевивки опухоли; также ежедневно оценивали объем опухоли и массу животных. Внутримышечное введение осуществлялось стерильными инсулиновыми шприцами поочередно в мышцы правых и левых задних лап животных.

Перед введением экстракта проводили его разведение стерильной дистиллированной водой (в соотношении 1 г экстракта на 1 мл воды). Дозу водного раствора экстракта рассчитывали ежедневно для каждого животного,

исходя из определения его массы. Таким образом, достигали постоянства концентрации действующего агента на грамм массы животного (из расчета 350 мг экстракта на 1 кг массы тела крысы).

По окончании опыта крыс выводили из эксперимента и для дальнейшего исследования проводили забор органов и опухоли.

На основе расчетов определялись следующие параметры:

1. Объем опухоли $V = x \cdot y \cdot z$, где x, y, z – линейные размеры опухоли;
2. Плотность опухоли $\rho = m'_c / V'$, где m'_c и V' – масса и объем опухоли по результатам вскрытия;
3. Теоретическая масса опухоли $m_c = V \cdot \rho$, где V – объем опухоли, ρ – плотность опухоли;
4. Истинная масса тела животного $m_r = m_a - m_c$, где m_a – масса животного, m_c – масса опухоли;
5. Дельта истинной массы тела животного $\Delta m_r = m_r - m_b$, где m_r – истинная масса животного в определенный момент времени, m_b – масса тела животного на начало эксперимента.
6. Индекс массы органа $K = m_o / m_a \times 100\%$, где m_o – масса соответствующего органа (или органов, в случае их парности), m_a – масса тела животного.

Динамика изменения средней фактической массы тела животных (по группам) в ходе эксперимента показана на рисунке 1. Анализ приведенных на рисунке усредненных графиков показывает, что во всех группах наблюдается тенденция к увеличению средней массы тела животных. Наибольшие колебания средней массы тела животных заметны при внутримышечном введении диплоидного экстракта пурпурной кукурузы и в контрольной группе.

Следует отметить, что, поскольку фактическая масса тела складывается из так называемой истинной массы тела и массы опухоли, наблюдаемое нами увеличение данного показателя может быть связано не только с ростом животного, но и увеличением размера опухоли.

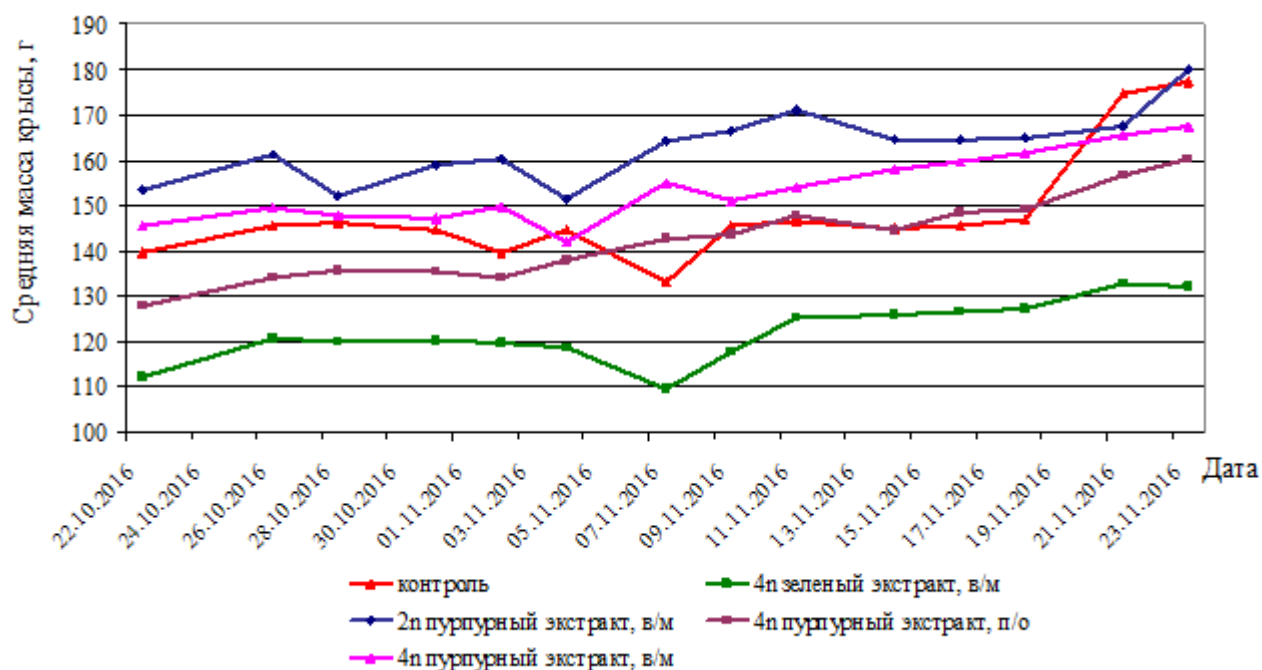


Рисунок 1 – Динамика изменения средней массы крыс с перевиваемой опухолью печени РС-1 в контроле и при введении различных типов экстрактов кукурузы

Для более адекватной оценки тенденций в изменении веса животных нами применялся показатель истинной массы тела, представляющий величину, отражающую скорректированную массу тела животного, за вычетом массы опухоли, для которой может быть характерна своя собственная динамика изменения размера веса, не совпадающая с таковой для массы тела крыс.

Изменения указанного параметра в ходе эксперимента представлены на рисунке 2, где представлены не только графики изменения средней истинной массы крыс по группам, но и соответствующие линии тренда, позволяющие получить более четкое и обобщенное представление о тенденциях изменения истинной массы тела животных. Линии тренда были построены автоматически в программе MS Excel 2003.

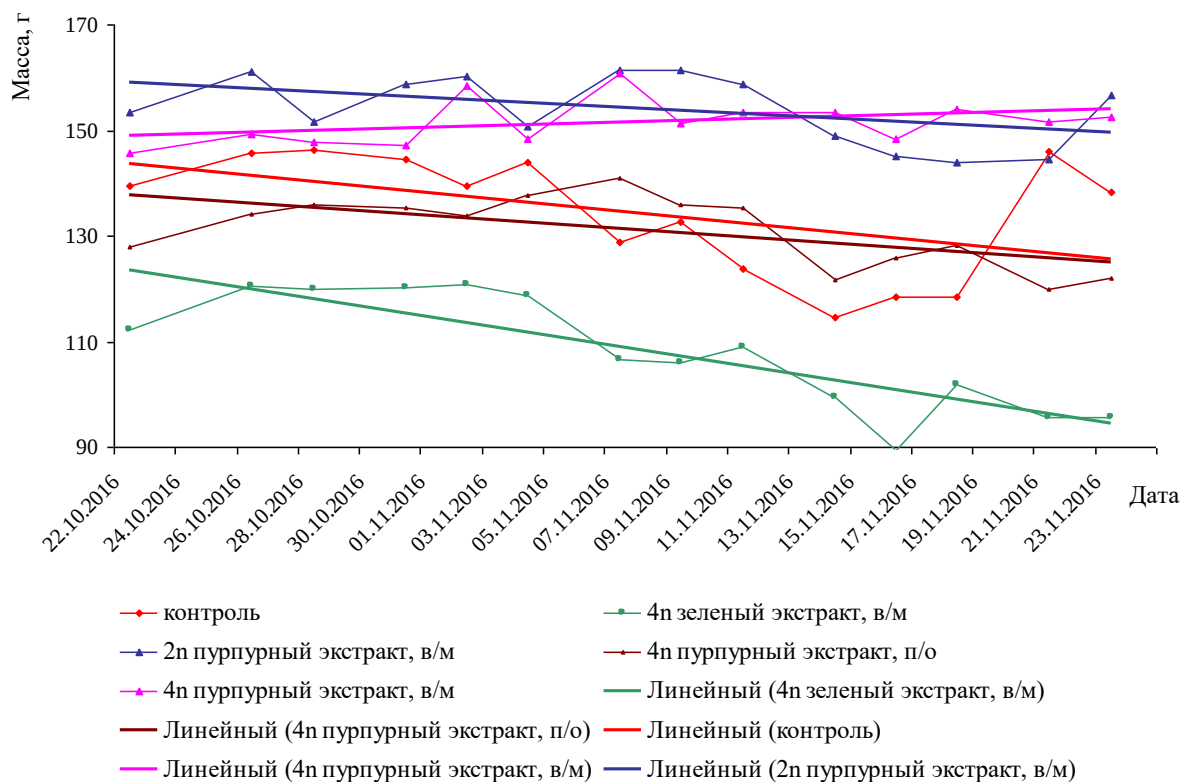


Рисунок 2 – Динамика изменения средней истинной массы крыс с перевиваемой опухолью печени РС-1 в контроле и при введении различных типов экстрактов кукурузы

Сопоставление угловых коэффициентов линий тренда, показывает, что крысы в контрольной группе, а также в случае внутримышечного введения экстракта зеленой тетраплоидной кукурузы значительно теряют в весе, при наблюдаемом увеличении массы опухоли.

Наименьшие колебания средней массы тела животных наблюдаются при внутримышечном введении экстракта тетраплоидной пурпурной кукурузы. Линия тренда в этом случае характеризует тенденцию к набору веса животными данной экспериментальной группы, что позволяет говорить о выраженном антиапоптозическом действии экстракта антоциановой тетраплоидной формы кукурузы при внутримышечном способе его введения.

С применением критерия Манна-Уитни на момент завершения эксперимента у животных, получавших экстракт зеленой тетраплоидной кукурузы внутримышечно, выявлены достоверно более низкие значения

истинной массы тела по сравнению с контрольной группой ($U = 1,00$, $Z = 2,02$, $p = 0,04$).

Было сделано заключение о том, что введение разных видов антоциановых экстрактов, полученных из растений разной ploидности и генетической конституции, внутримышечным и пероральным способом может сопровождаться изменением относительной массы различных органов (почек, печени, легких). При этом наибольшее число достоверных различий с контролем характеризует вариант внутримышечного введения экстракта антоциановой диплоидной кукурузы линии ПС.

Исследование проводилось на 16 белых лабораторных крысах-самцах, массой 119 ± 22 г. Животные были разделены на 4 группы методом случайной выборки (по 4 крыс).

Динамика изменения средней фактической массы тела животных (по группам) в ходе эксперимента показана на рисунке 3.

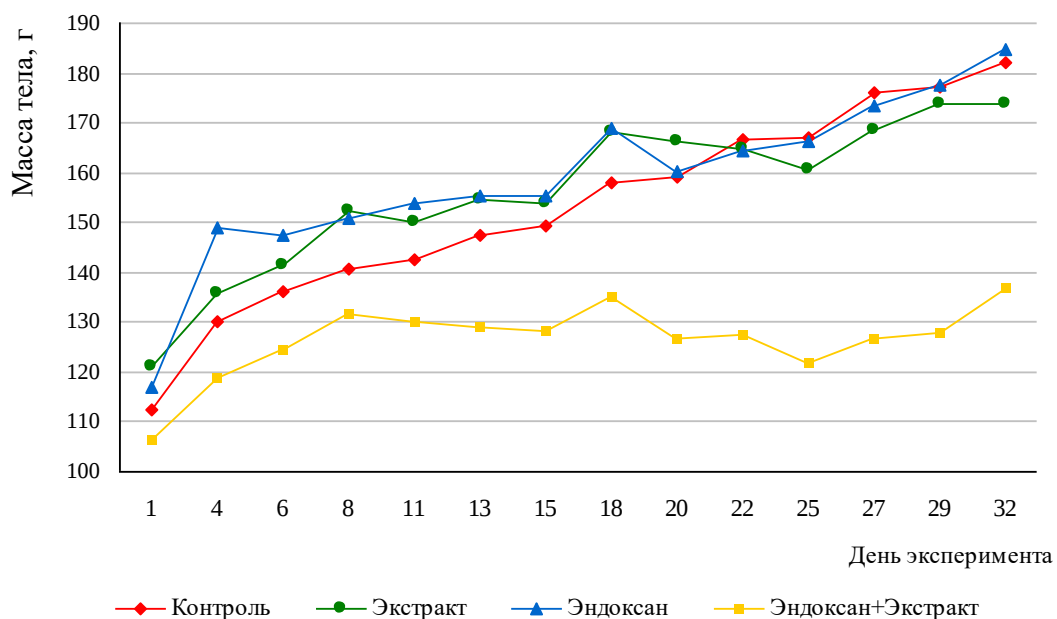


Рисунок 3 – Динамика изменения средней массы крыс с перевиваемой опухолью печени РС-1 в контроле и при введении экстракта антоциановой кукурузы ПС и цитостатического препарата

Анализ приведенных на рисунке усредненных графиков показывает, что во всех группах наблюдается тенденция к увеличению средней массы тела

животных. Наименьшее изменение средней массы тела отмечалось при внутрибрюшинном введении комплекса Эндоксан + Экстракт.

Значения массы тела крыс в варианте воздействия Эндоксана в сочетании с экстрактом кукурузы достоверно отличаются от контроля ($F=22,2$; $p<<0,01$) и экспериментальных групп с введением цитостатика ($F=44,9$; $p<<0,01$) и экстракта ($F=42,6$; $p<<0,01$) в отдельности.

Изменения истинной средней массы тела в ходе эксперимента представлены на рисунке 4.

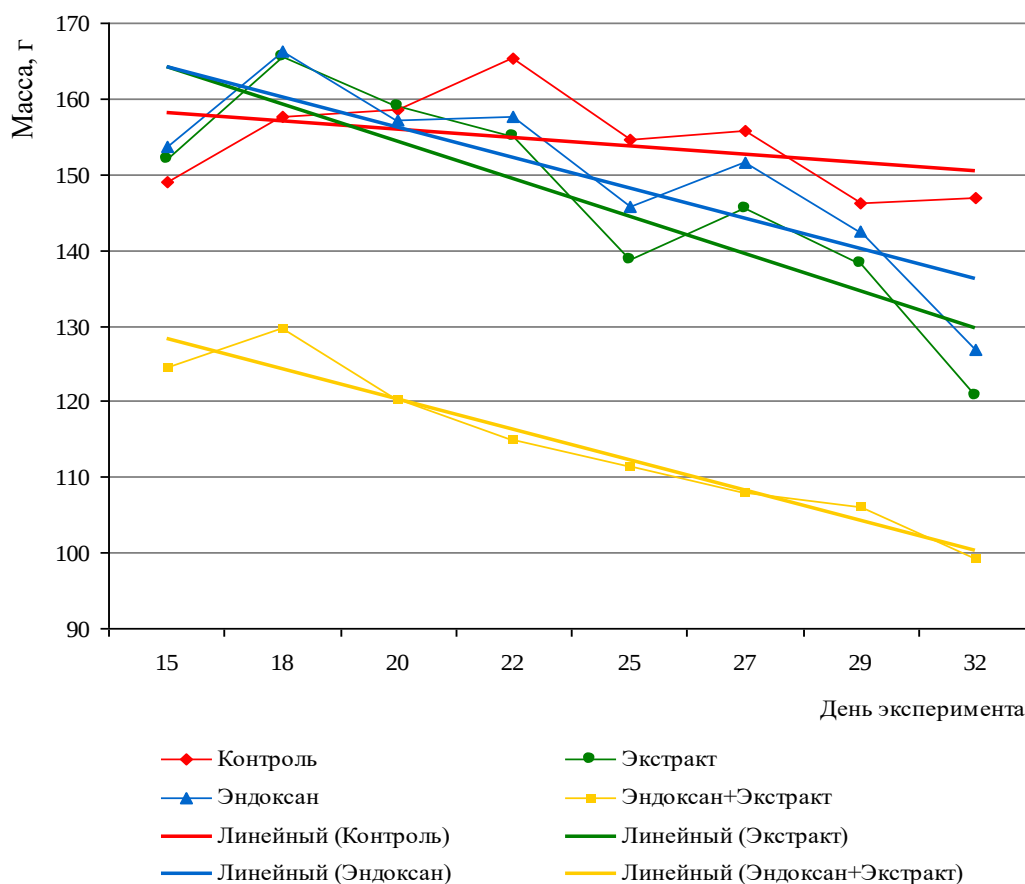


Рисунок 4 – Динамика изменения средней расчетной истинной массы крыс с перевиваемой опухолью печени РС-1 в контроле и при введении экстракта антоциановой кукурузы ПС и цитостатического препарата

Сопоставление угловых коэффициентов линий тренда, показывает, что крысы в контрольной группе, а также во всех группах внутрибрюшинного введения экстракта антоциановой кукурузы и цитостатика значительно теряют в весе, при наблюдаемом увеличении массы опухоли. Данная тенденция

особенно ярко выражена в опытных группах. В группе комбинированного воздействия Эндоксана и экстракта динамика изменения рассматриваемого показателя во времени близка к линейной зависимости.

Средние значения расчетной истинной массы тела крыс в варианте воздействия Эндоксана в сочетании с экстрактом кукурузы достоверно отличаются от контроля ($F=87,9$; $p<<0,01$) и экспериментальных групп с введением цитостатика ($F=41,9$; $p<<0,01$) и экстракта ($F=27,9$; $p<<0,01$) в отдельности.

Также было сделано заключение о том, что введение диплоидного антоцианового экстракта и цитостатического препарата внутрибрюшинным способом может сопровождаться изменением относительной массы различных органов (почек, печени, селезенки, сердца). При этом наибольшее число достоверных различий с контролем характеризует вариант внутрибрюшинного введения комплекса Эндоксан+Экстракт.

Исследовалось противоопухолевое действие экстрактов антоциановой кукурузы разной плоидности на клетки карциномы почки человека A498, полученные из банка опухолевых культур РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Культивирование проводили в пластиковых флаконах в среде RPMI 4 (10% эмбриональной сыворотки, ампициллина, пирувата натрия, глутамина). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 и 48 часов, после чего окрашивали. В качестве красителей использовали йодистый пропидий (проникающий в нежизнеспособные клетки, за счет разрушения их мембраны) и акридиновый оранжевый для окрашивания живых клеток. Применение одновременно двух флуоресцентных красителей – акридинового оранжевого и йодистого пропидия в тесте «живые и мертвые» позволяло выявлять общее количество погибших клеток, как путем некроза (окрашивались в красный цвет), так и путем апоптоза (зеленый цвет), а также клеток, в которых запустился апоптоз, при этом выявлялись апоптотические тельца или пикнотические ядра, также окрашенные в зеленый цвет.

Эксперименты проводили в культуральных 96-ти луночных планшетах: по три лунки для контроля и для каждого экстракта. Для анализа цитотоксической и цитостатической активностей сравнивали в контрольной и экспериментальной группах следующие показатели (по полям зрения): общее количество клеток, абсолютное и относительное количество мертвых и живых клеток; количество делящихся клеток на стадиях мета-, ана- и телофазы, мета- и ана-телофазный индексы; количество клеток с ядрами в форме серпов и с пикнозом ядер; количество клеток с признаками апоптоза.

На рисунке 5 представлено среднее значение количества клеток в поле зрения. При воздействии экстрактов кукурузы в разных концентрациях по сравнению с контролем наблюдалось заметное уменьшение количества клеток. Наиболее выраженное уменьшение количества клеток карциномы наблюдалось под действием экстракта кукурузы при концентрации 0,45 мг/мл.

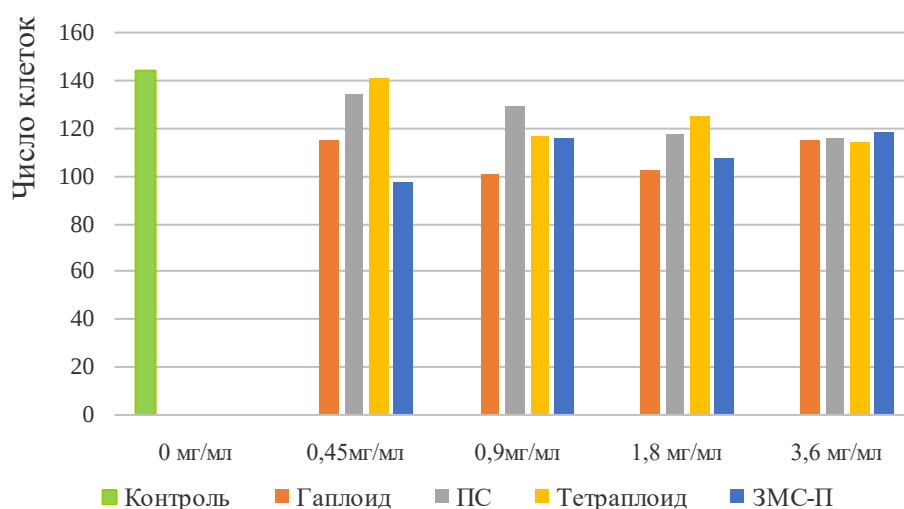


Рисунок 5 – Среднее общее количество клеток в поле зрения при микроскопировании препаратов культур клеток карциномы почки A498, содержащихся на средах с различными концентрациями экстрактов антоциановых форм кукурузы

Достоверные различия по рассматриваемому признаку показаны при сравнении с контролем всех вариантов концентраций экстракта гаплоидной формы: $F = 6,5$, $p = 0,02$ (0,45 мг/мл); $F = 13,0$, $p < 0,001$ (0,9 мг/мл); $F = 11,1$,

$p < 0,001$ (1,8 мг/мл); $F = 10,0$, $p < 0,001$ (3,6 мг/мл). Аналогичные выводы можно сделать при сравнении контроля с экстрактом ЗМС-П: $F = 40,9$, $p < 0,001$ (0,45 мг/мл); $F = 6,6$, $p = 0,02$ (0,9 мг/мл); $F = 6,5$, $p = 0,02$ (1,8 мг/мл); $F = 4,3$, $p = 0,05$ (3,6 мг/мл). Воздействие экстрактов кукурузы ПС достоверно отличалось от контроля при концентрациях 1,8 ($F = 5,8$, $p = 0,02$) и 3,6 мг/мл ($F = 7,1$, $p = 0,01$). Для экстракта тетраплоидной кукурузы достоверные различия с контролем отмечены при концентрации 3,6 мг/мл ($F = 5,9$, $p = 0,02$).

На рисунке 6 показаны средние значения доли мертвых клеток. Под воздействием экстракта по сравнению с контролем во многих случаях отмечается увеличение процента мертвых клеток.

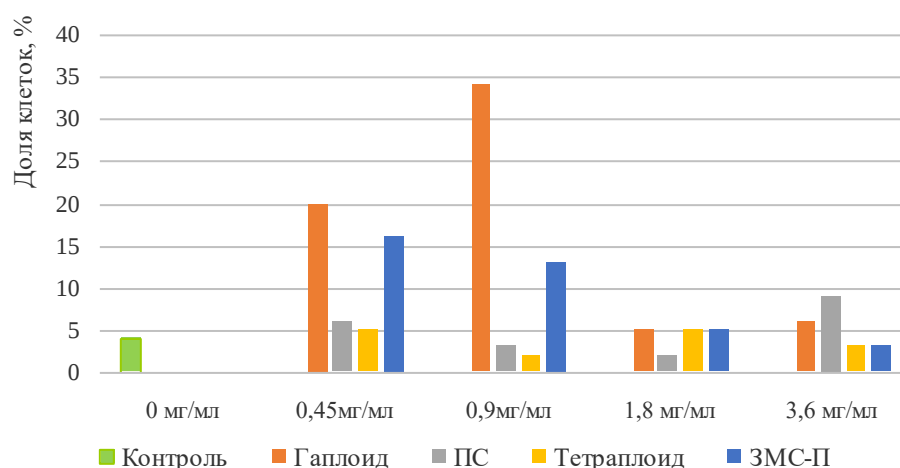
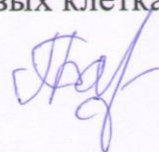


Рисунок 6 – Средние значения доли мертвых клеток в культурах клеток карциномы почки А498 под действием экстрактов антоциановых форм кукурузы при разных концентрациях

По результатам дисперсионного анализа различия по данному параметру достоверны между контролем и вариантами экстрактов гаплоида ($F = 24,43$, $p < 0,001$ (0,45 мг/мл); $F = 8,22$, $p < 0,001$ (0,9 мг/мл)) и ЗМС-П ($F = 15,02$, $p < 0,001$ (0,45 мг/мл); $F = 4,83$, $p = 0,04$ (0,9 мг/мл)). Следовательно, можно сделать вывод о том, что эти два вида экстракта обладают цитотоксическим действием в концентрациях 0,45 и 0,9 мг/мл.

Выводы:

1. Экстракт тетраплоидной антоциановой кукурузы при внутримышечном введении проявляет в эксперименте на белых лабораторных крысах с перевиваемой опухолью печени РС-1 антикахексическое действие.
2. Экстракты тетраплоидной зеленой формы кукурузы и пурпурной диплоидной линии ПС при внутримышечном введении, а также экстракт антоциановой тетраплоидной кукурузы при пероральном введении не оказывают антикахексического действия.
3. Внутримышечное и пероральное введение экстрактов антоциановых форм кукурузы крысам с перевиваемой опухолью печени РС-1 может сопровождаться изменениями относительных показателей (индекса) массы различных внутренних органов, в частности, почек, печени и легких.
4. При внутрибрюшинном введении цитостатический препарат «Эндоксан» и экстракт антоциановой кукурузы ПС не оказывают антикахексического действия, при этом в варианте эксперимента с комбинированным действием двух препаратов тенденция к снижению прироста истинной массы крыс проявляется наиболее стабильно.
5. Введение диплоидного антоцианового экстракта и цитостатического препарата внутрибрюшинным способом может сопровождаться изменением относительной массы различных органов (почек, печени, селезенки, сердца).
6. При исследовании влияния экстрактов на культуру клеток карциномы почки человека А498 через 24 и 48 часов при разных концентрациях *in vitro* впервые установлена противоопухолевая активность экстрактов диплоидных форм кукурузы линий ПС и ЗМСП, реализуемая, по-видимому, через механизм активации апоптоза в раковых клетках.

 10.05.19,