

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

Кафедра генетики

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ
АНТОЦИАНОВОЙ КУКУРУЗЫ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Кондратьевой Кристины Романовны

Научный руководитель

Доцент кафедры генетики, к.б.н

Ю.А. Беляченко

Научный консультант

Профессор кафедры общей биологии,
фармакогнозии и ботаники СГМУ

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

Н.В. Полуконова

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

О.И. Юдакова

Саратов 2019

Введение. Антоцианы – водорастворимые природные красители, принадлежащие к группе флавоноидов. По химической структуре основных пигментов это фенольные соединения, являющиеся моно- и дигликозидами. Натуральные красители содержат в своем составе, помимо пигментов, и другие биологически активные компоненты: витамины, гликозиды, органические кислоты, ароматические вещества, микроэлементы и другие соединения.

Антоциановая форма кукурузы *Zea mays* L. была получена как сырье для получения нового перспективного красителя для пищевой и косметической промышленности. Преимуществом сырья данной формы кукурузы является устойчивость получаемого красителя. Исследования водно-спиртового экстракта позволили выявить отсутствие токсичности, антимутагенные и антиканцерогенные свойства, а также antimикробную активность по отношению к тест-штаммам синегнойной палочки и стафилококка, что позволяет применять исходное сырье для получения биологически активных веществ в фармацевтической промышленности.

Перспективным направлением исследований является поиск возможностей применения экстракта антоциановой кукурузы в медицине для лечения различных болезней, и, в частности, онкологических заболеваний, которые являются одной из распространенных причин смертности населения.

Целью данной работы является изучение влияния экстрактов различных форм кукурузы обыкновенной на развитие опухолевых клеток в условиях *in vivo* и *in vitro*.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Исследование противоопухолевой активности экстрактов кукурузы в эксперименте на белых лабораторных крысах с перевиваемой альвеолярной опухолью печени PC-1.

2. Сравнительная оценка эффективности противоопухолевого действия экстрактов антоциановых форм тетрапloidной и диплоидной

кукурузы линии Пурпурная Саратовская между собой и с экстрактом зеленой тетрапloidной кукурузы.

3. Оценка эффективности действия экстракта кукурузы Пурпурная Саратовская в сравнении с цитостатическим препаратом Эндоксан при внутрибрюшинном способе введения в эксперименте на белых лабораторных крысах с перевиваемой альвеолярной опухолью печени РС-1.

4. Сравнение эффективности внутримышечного, перорального и внутрибрюшинного способов введения экстракта.

5. Исследование влияния экстрактов на культуры клеток карциномы почки А498 и фибробластов человека в сочетании с Эндоксаном в условиях *in vitro*.

Структура и объем работы. Дипломная работа состоит из введения, 2 глав (обзор литературы и экспериментальной части), заключения, выводов, списка используемых источников. Список литературы включает 38 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 75 страницах машинописного текста.

Основное содержание работы. Для изучения влияния экстрактов разных форм кукурузы на противоопухолевую активность были взяты 25 самцов белых лабораторных крыс массой 145 ± 60 грамм. Особей в произвольном порядке разделили на 5 групп по 5 крыс в каждой, соответствующих виду вводимого экстракта и способу введения:

1) экстракт антоциановой кукурузы линии ПС, внутримышечно (в дальнейшем – «2п пурпурный экстракт, в/м»);

2) экстракт антоциановой тетрапloidной кукурузы, внутримышечно («4п пурпурный экстракт, в/м»);

3) экстракт антоциановой тетрапloidной кукурузы, перорально («4п пурпурный экстракт, п/o»);

4) экстракт зеленой тетрапloidной кукурузы, внутримышечно («4п зеленый экстракт, в/м»);

5) контроль (без введения экстракта).

На рисунке 1 отражена динамика изменения средних значений объема опухоли в испытуемых группах на протяжении эксперимента. Объем опухоли представляет собой произведение линейных размеров. Наименьшие значения данного параметра регистрируются в двух вариантах эксперимента – при внутримышечном введении пурпурных экстрактов диплоидной и тетраплоидной кукурузы.

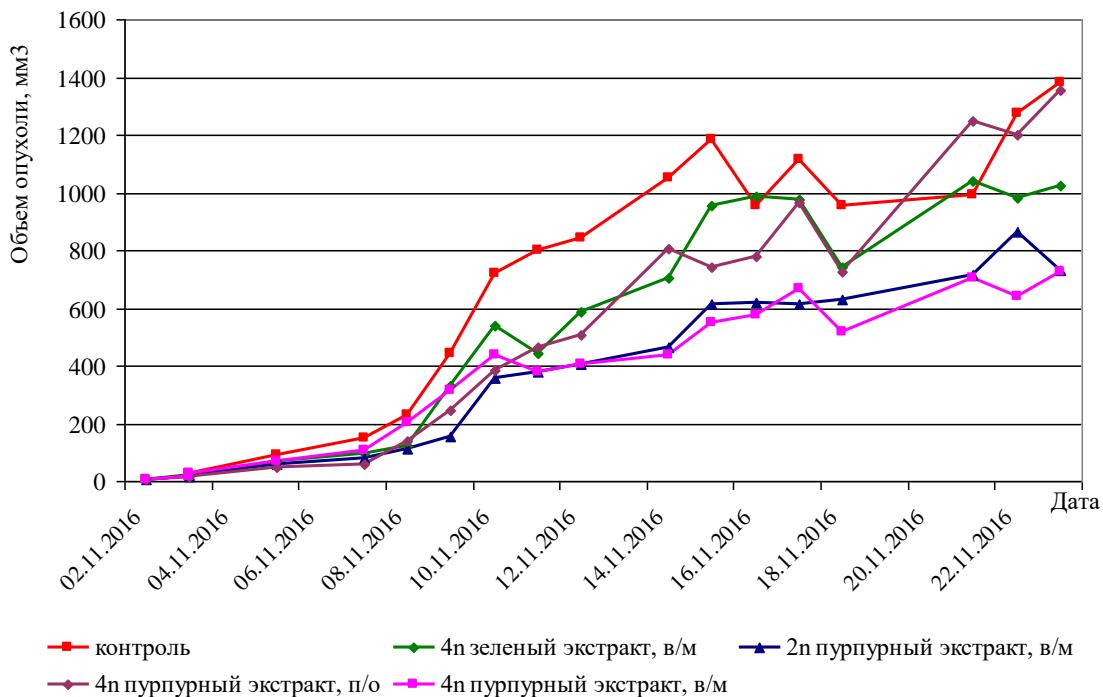


Рисунок 1 – Динамика изменения средних значений объема перевиваемой опухоли печени PC-1 у крыс в контроле и введении различных типов экстрактов кукурузы

Объем опухоли в варианте с экстрактом тетраплоидной пурпурной кукурузы, получаемым особями перорально, увеличивался более значительно. Это может быть связано с более низкой биодоступностью экстрагируемых веществ при их поступлении через пищеварительный тракт.

Близкими значениями данного параметра характеризуется группа крыс, получавших экстракт зеленой тетраплоидной кукурузы внутримышечно, что может быть следствием особенностей химического состава экстракта, не содержащего антоцианов.

Статистическая обработка данных по итоговым индивидуальным значениям объема опухоли у крыс с применением критерия Манна-Уитни показывает наличие различий между вариантом внутримышечного введения экстракта пурпурного диплоида ПС и контролем ($U = 1,00$, $Z = 2,02$, $p = 0,04$). Дисперсионный анализ подтверждает достоверность выявленных различий ($F=7,43$, $p=0,02$). По критерию Манна-Уитни достоверны различия варианта введения внутримышечно экстракта пурпурного тетраплоида с группами крыс, получавших экстракт зеленого тетраплоида внутримышечно ($U = 0,00$, $Z = 2,12$, $p = 0,03$) и экстракт пурпурного тетраплоида перорально ($U = 1,00$, $Z = -2,02$, $p = 0,04$).

Итоговые значения массы опухоли были получены после завершения эксперимента после забоя и вскрытия животных. На рисунке 2 представлены данные об изменении средней массы опухоли для каждой группы животных. Вариант с экстрактом зеленого тетраплоида характеризуется значением средней массы опухоли, близким к контрольному, что позволяет сделать вывод об отсутствии торможения опухолевого роста в данной группе животных.

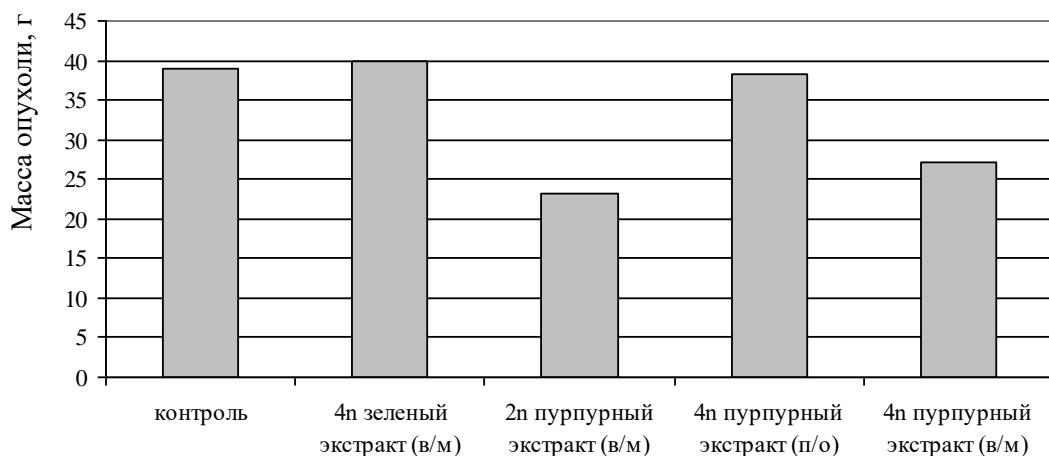


Рисунок 2 – Средние значения массы перевиваемой опухоли печени РС-1 у крыс после завершения эксперимента

Вариант эксперимента, перорального способа введения экстракта пурпурного тетраплоида также близок к контролю по итоговому значению массы опухоли, что согласуется с данными по динамике изменения объема

опухоли. Другие варианты эксперимента показали большую эффективность действия пурпурных экстрактов при внутримышечном их введении.

Итоговые значения массы опухоли у животных, получавших экстракт антоцианового диплоида внутримышечно отличаются от контроля по критерию Манна-Уитни ($U = 0,00$, $Z = 2,31$, $p = 0,02$), а также подтверждаются результатами дисперсионного анализа ($F=13,22$, $p = 0,01$).

Индекс торможения роста опухоли является относительным показателем изменения массы опухоли в опыте по сравнению с контрольной группой (рисунок 3). При этом он фактически показывает эффективность действия противоопухолевого препарата.

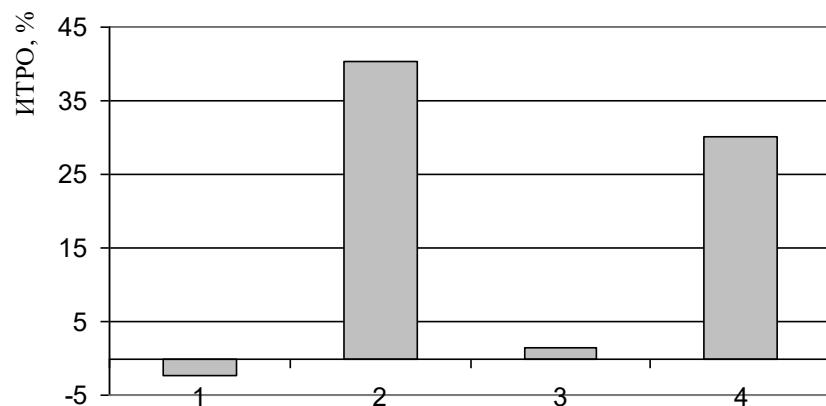


Рисунок 3 – Индекс торможения роста опухоли (ИТРО) при использовании различных видов экстракта кукурузы: тетраплоидной зеленой (1), диплоидной пурпурной линии ПС (2), тетраплоидной пурпурной при пероральном (3) и внутримышечном (4) способах введения

Наиболее высокие показатели ИТРО (40% и 30%) отмечаются при действии пурпурных экстрактов кукурузы диплоидной линии ПС и тетраплоида при внутримышечном введении соответственно. Это указывает на наличие противоопухолевых свойств данных экстрактов и эффективности внутримышечного способа их введения.

В продолжении работы по изучению противоопухолевой активности экстракта антоциановой диплоидной кукурузы линии ПС для сравнения был выбран лекарственный препарат Эндоксан, действующим веществом которого

является циклофосфамид. Дизайн эксперимента был аналогичен, за исключением внутрибрюшинного способа введения всех веществ.

Шестнадцать самцов белых лабораторных крыс массой 119 ± 22 грамм произвольно разделили на 4 группы:

- 1) экстракт антоциановой кукурузы диплоидной линии ПС, внутрибрюшинно (в дальнейшем – «Кукуруза»);
- 2) цитостатический препарат Эндоксан, внутрибрюшинно («Эндоксан»);
- 3) комплексное взаимодействие экстракта антоциановой кукурузы линии ПС и цитостатик Эндоксан (вариант «Кукуруза/Эндоксан»);
- 4) контроль.

На рисунке 4 отражена динамика изменения средних значений объема опухоли в испытуемых группах на протяжении эксперимента.

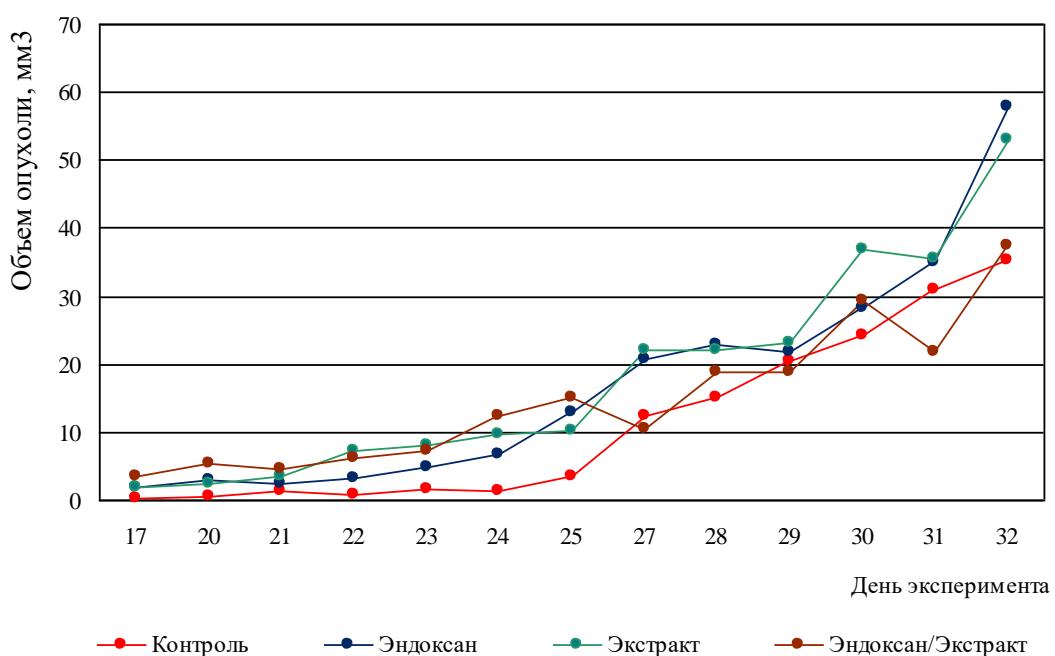


Рисунок 4 – Динамика изменения средних значений объема перевиваемой опухоли печени PC-1 у крыс в контроле и при внутрибрюшинном введении Эндоксана и экстракта кукурузы ПС

Наименьшие значения данного параметра регистрируются в двух вариантах эксперимента – группе контроля и комбинации препаратов Эндоксан/Экстракт.

Во всех опытных группах также наблюдается тенденция к увеличению объема опухоли. С 27-го дня эксперимента к контрольным показателям наиболее близкие значения объема опухоли отмечаются в варианте комбинированного воздействия. Согласно дисперсионному анализу, различия между группами сравнения недостоверны.

На рисунке 5 представлены данные об изменении средней массы опухоли для каждой группы животных.

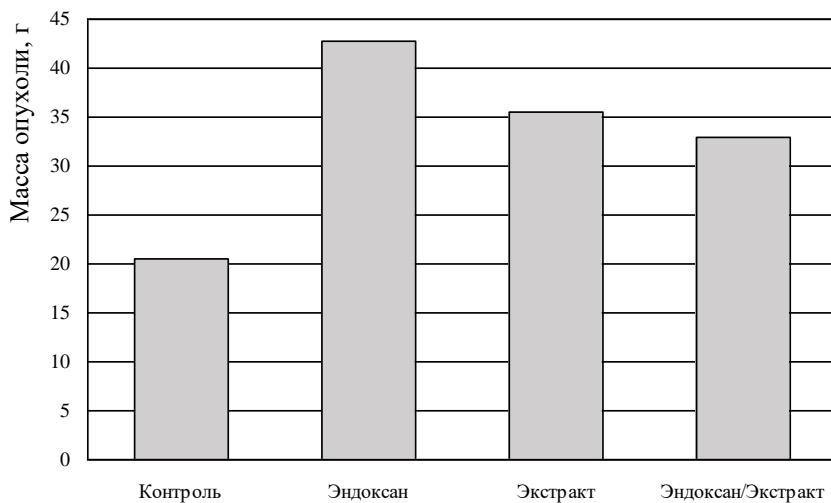


Рисунок 5 – Средние значения массы перевиваемой опухоли печени РС-1 у крыс после завершения эксперимента с внутрибрюшинным введением Эндоксана и экстракта кукурузы ПС

Вариант с цитостатиком характеризуется наибольшим значением средней массы опухоли. Значения для других экспериментальных групп также превышают контрольный показатель, что свидетельствует о неэффективности противоопухолевой терапии при всех исследуемых видах воздействий. Согласно результатам дисперсионного анализа, различия между опытными и контрольной группами недостоверны. В результате, можно сделать вывод о неэффективности внутрибрюшинного способа введения экстракта антоциановой кукурузы ПС, в отличие от внутримышечного способа, рассмотренного ранее. При этом цитостатический препарат Эндоксан также оказался неэффективным способом терапии при внутрибрюшинном варианте введения.

В эксперименте на культуре клеток карциномы почки A498 человека и фибробластах кожи эмбриона человека были изучены цитостатическая и цитотоксическая активности.

В исследовании проводилась оценка эффективности действия цитостатика Эндоксана и экстрактов различных антоциановых форм кукурузы – гаплоидной формы, происходящей от линии ПС, диплоидной линии ПС, тетраплоидной формы и диплоидной линии ЗМС-П. Оценивался также эффект комбинированного воздействия цитостатика и экстракта в соотношении 1:1 с концентрацией каждого из компонентов, равной 0,03 мг/мл.

Цитостатическая активность. Общее количество клеток карциномы почки представлено на рисунке 6.

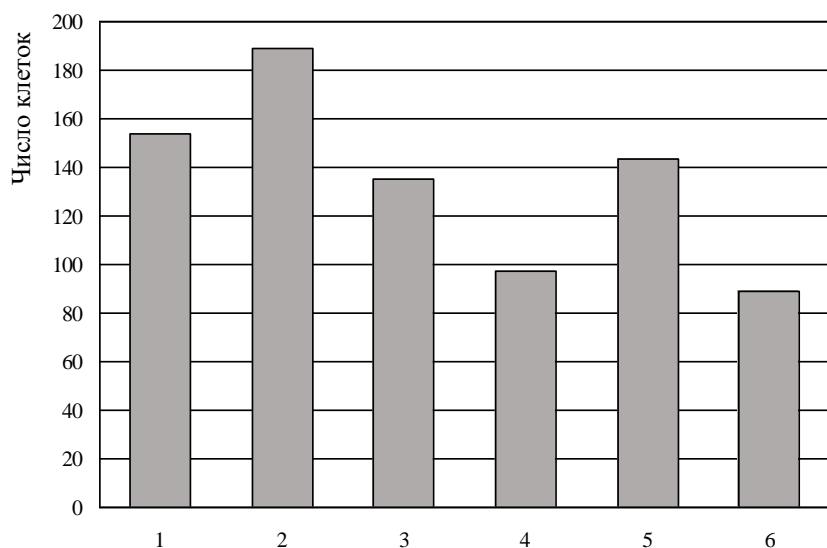


Рисунок 6 – Среднее количество клеток карциномы почки человека А498 в контроле (1) и при добавлении цитостатика (2), цитостатика в сочетании с экстрактами гаплоидной формы кукурузы (3), диплоидной кукурузы ПС (4), тетраплоидной кукурузы (5), диплоидной кукурузы ЗМС-П (6) через 24 часа культивирования

Значения данного параметра достоверно ниже контрольного уровня в вариантах с добавлением экстракта кукурузы ПС ($F=4,9$; $p<0,01$) и экстракта ЗМС-П ($F=3,1$; $p=0,02$) в сочетании с цитостатиком, что может

свидетельствовать о наличии цитостатической активности данных видов экстрактов. При этом также следует отметить, что добавление к цитостатику экстрактов кукурузы ЗМС-П и ПС приводит к достоверному снижению рассматриваемого показателя (для ЗМС-П – $F=13,1$; $p=0,001$; для ПС – $F=17,1$; $p=0,001$).

Цитотоксическая активность. На рисунке 7 показана доля мертвых клеток во всех исследуемых группах. Можно заметить, что процент мертвых клеток значительно снижен во всех экспериментальных группах, относительно контроля.

Достоверность различий между всеми экспериментальными вариантами и контролем подтверждаются дисперсионным анализом: $F=33,4$; $p<0,01$ (вариант с цитостатиком); $F=13,8$; $p<0,01$ (экстракт гаплоидной кукурузы и цитостатик); $F=9,5$; $p<0,01$ (экстракт ПС и цитостатик); $F=11,2$; $p<0,01$ (экстракт тетраплоидной кукурузы и цитостатик); $F=8,2$; $p<0,01$ (экстракт ЗМС-П и цитостатик).

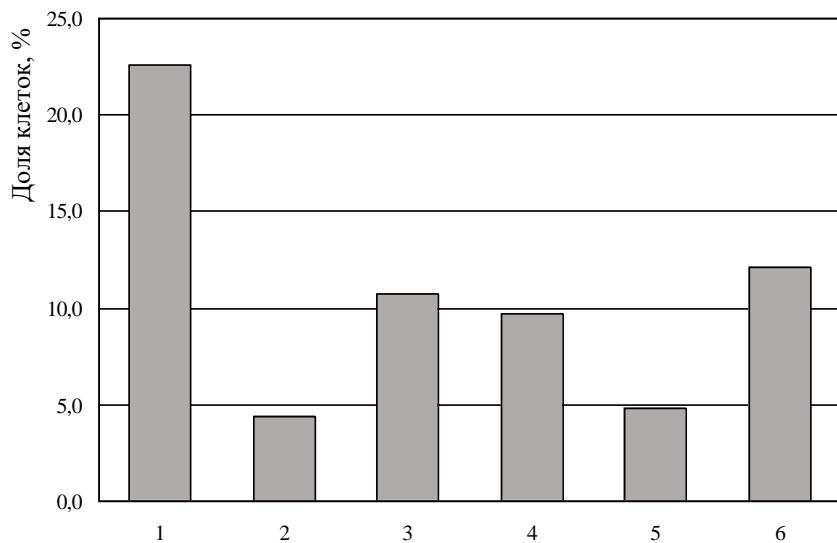


Рисунок 7 – Средние значения доли мертвых клеток карциномы почки человека А498 в контроле (1) и при добавлении цитостатика (2), цитостатика в сочетании с экстрактами гаплоидной формы кукурузы (3), диплоидной кукурузы ПС (4), тетраплоидной кукурузы (5), диплоидной кукурузы ЗМС-П (6) через 24 часа культивирования

Тестирование экстрактов кукурузы и цитостатика на культуре фибробластов. Для оценки безопасности и реакции нормальных (не опухолевых) клеток на воздействия Эндоксана и экстрактов кукурузы использовалась культура клеток фибробластов кожи эмбриона человека. Проводился подсчет общего количества клеток, доли мертвых клеток. Средние значения общего количества фибробластов в поле зрения представлены на рисунке 30.

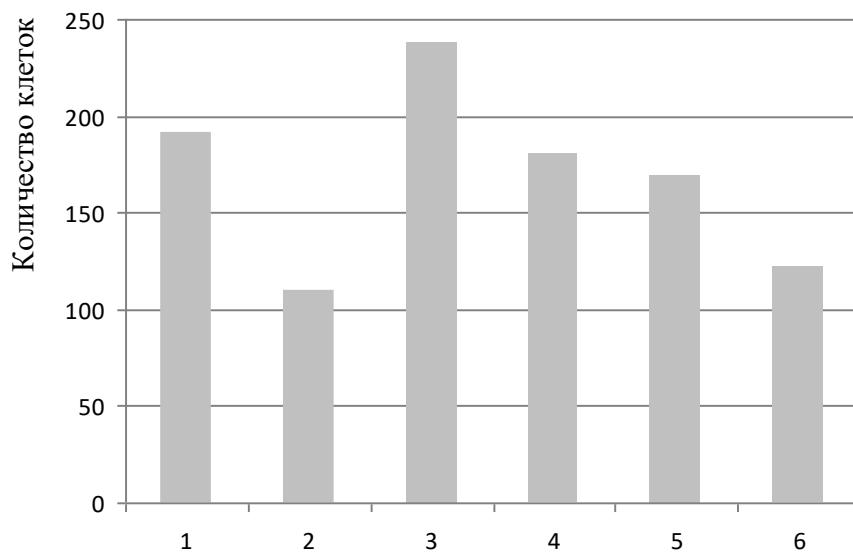


Рисунок 30 – Среднее количество фибробластов в контроле (1) и при добавлении цитостатика (2), цитостатика в сочетании с экстрактами гаплоидной формы кукурузы (3), диплоидной кукурузы ПС (4), тетрапloidной кукурузы (5), диплоидной кукурузы ЗМС-П (6) через 24 часа культивирования

Согласно результатам дисперсионного анализа, общее количество клеток относительно контроля достоверно снижалось в вариантах с добавлением цитостатика ($F=16,1$; $p<0,001$) и экстракта кукурузы ЗМС-П ($F=13,7$; $p<0,001$). Остальные варианты эксперимента были сходны с контрольной группой по данному параметру.

Выводы

1. Экстракт диплоидной антоциановой кукурузы ПС при внутримышечном введении характеризуется наиболее эффективным противоопухолевым действием и приводит к торможению роста опухоли

печени PC-1 крыс на 40% по сравнению с контролем. При этом по своей эффективности он превосходит экстракт тетрапloidной антоциановой формы, действие которого характеризуется 30% индексом торможения роста опухоли.

2. Экстракты зеленой формы тетрапloidной кукурузы при внутримышечном введении и пурпурной формы при пероральном введении не оказывают противоопухолевого действия.

3. При введении экстрактов пурпурной и зеленой форм кукурузы могут наблюдаться изменения (по сравнению с контролем) массы различных органов, в частности, печени и сердца.

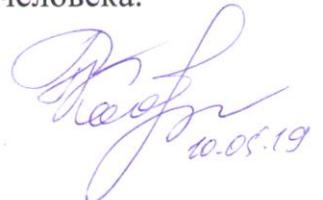
4. Экстракт диплоидной антоциановой кукурузы ПС и цитостатик Эндоксан при внутрибрюшинном способе введения не оказывают противоопухолевого действия по отношению к опухоли печени PC-1.

5. При введении комплекса экстракта антоциановой диплоидной кукурузы и Эндоксана внутрибрюшинно наблюдается изменение массы селезенки и почек крыс.

6. Экстракты диплоидной кукурудзы линии ПС и диплоидной кукурузы линии ЗМС-П обладают цитостатическим действием по отношению к культуре клеток карциномы почки A498 человека.

7. Исследуемые экстракты антоциановых форм кукурузы (гаплоидной кукурузы, диплоидной ПС, тетрапloidной кукурузы и линии ЗМС-П) различаются по своему действию на опухолевые клетки и при комбинированном воздействии с цитостатиком Эндоксаном существенно модифицируют его терапевтический эффект в культуре *in vitro*.

8. Экстракты антоциановой гаплоидной и тетрапloidной кукурузы нивелируют цитостатическое действие Эндоксана и оказывают антицитотоксическое действие в культуре клеток фибробластов человека.



10.05.19