

Выявление путей гибели клеток карциномы почки человека A498 под действием экстракта аврана лекарственного и флавоноидов зеленого чая с помощью флуоресцентных методов визуализации

© А.М. Мыльников¹, Н.В. Полуконова¹, Д.С. Исаев¹, А.А. Дорошенко², Р.А. Верховский¹,
Н.А. Николаева¹, Д.А. Мудрак¹, Н.А. Наволокин¹

¹ Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ,
440012 Саратов, Россия

² Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
440012 Саратов, Россия

e-mail: artyom-mylnikov@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2019 г.

В окончательной редакции 17.02.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

С использованием флуоресцентных методов визуализации апоптоза и некроза в опухолевых клетках человека *in vitro* сравнивались эффективности противоопухолевого воздействия на клетки карциномы почки человека A498 флавоноидсодержащих экстрактов: аврана лекарственного и зеленого чая в сверхнизких концентрациях через 24 и 48 h. Флуоресцентные красители (йодистый пропилий и акридиновый оранжевый) использовались в тесте „живые и мертвые“, что позволило выявлять общее количество погибших клеток путем некроза и апоптоза, а также клеток, в которых запустился апоптоз, при этом выявлялись апоптотические тельца или пикноз ядра. Наиболее выраженной цитостатической активностью через 48 h после воздействия обладал экстракт аврана, уменьшая количество клеток в поле зрения в 1.5 раза по сравнению с контролем. Наиболее выраженной цитотоксической активностью обладал экстракт зеленого чая в концентрации 0.0288 mg/ml, и выраженность ее нарастала через 48 h после воздействия. Экстракт аврана проявлял цитотоксическую активность при более низких концентрациях (0.0036 mg/ml).

Ключевые слова: флуоресцентные методы визуализации, противоопухолевая активность, клеточная культура, цитостатическая активность, флавоноиды, рак почки, авран лекарственный.

DOI: 10.21883/OS.2020.07.49569.72-20

Введение

Онкологические заболевания по данным ВОЗ в 2018 г. занимают второе место в структуре смертности в мире и РФ. Используемые в терапии опухолевых процессов химиопрепараты цитостатического действия на основе алкалоидов не обладают избирательной активностью и имеют множество побочных эффектов. Механизм воздействия цитостатиков на клетку основывается на двух точках приложения: они связываются с нитями веретена деления на стадии метафазы или на стадии подготовки к делению, разрушают топоизомеразу во время репликации ДНК, что приводит к остановке клеточного цикла, и клетка гибнет путем некроза. В результате гибели подвергаются любые пролиферирующие клетки организма. Одним из побочных эффектов такого воздействия является развитие интоксикации под влиянием продуктов распада (эндотоксинов) некротизированной клетки [1].

Для решения данной проблемы необходим поиск новых лекарственных средств, оказывающих целевое воздействие на опухолевые клетки и косвенно снижающих уровень эндогенной интоксикации в результате уменьшения некроза нормальных пролиферирую-

щих клеток организма. С точки зрения физиологии наиболее благоприятным и естественным для клетки является прекращение ее жизнедеятельности путем апоптоза, который является генетически запрограммированным вариантом клеточной гибели, таким образом обеспечивается тканевый гомеостаз. Однако на данный момент отсутствует широкое внедрение противоопухолевых препаратов с апоптотическим механизмом действия в терапию опухолевых процессов, поскольку возможность их применения была открыта относительно недавно, и на данный момент большинство из них находится на стадии доклинических и клинических исследований.

Существуют различные методики визуальной оценки клеток, находящихся на различных этапах своего развития. Основным преимуществом классических методов флуоресцентной микроскопии является возможность изучения не только фиксированных клеток, но и живых, а также исследование их микроструктуры. Несмотря на то что флуоресцентная микроскопия имеет более низкое разрешение по сравнению с электронной или атомно-силовой микроскопией, она в отличие от последних оказалась оптимальным методом для изучения меха-

низмов функционирования организмов на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях [2,3].

Разработка нового лекарственного средства начинается с исследований *in vitro*, что позволяет сделать более экономичным и эффективным первичный скрининг [4].

Кроме того, методы *in vitro* более гуманны, так как сокращают количество животных, используемых в исследованиях [5].

Возможность флуоресцентных методов визуализировать живые клетки и относительная простота применения в лабораторных условиях делают данные методы наиболее приемлемыми для исследований *in vitro* [6].

Одним из передовых направлений в клеточной биологии при разработке новых лекарственных препаратов является изучение программируемой клеточной гибели (ПКГ) — основного механизма элиминации клеток из организма как в нормальных условиях, так и при патологии. В настоящее время выделяют 12 видов ПКГ, однако наиболее распространенными являются апоптоз, аутофагия, кератинизация и некроз. Активация апоптоза считается одним из самых перспективных механизмов действия противоопухолевых препаратов.

С морфологической точки зрения апоптоз — это форма гибели клетки, при которой происходит конденсация хроматина с последующим образованием отдельных апоптотических телец, покрытых мембраной, без выхода содержимого клетки в окружающую среду. Согласно биохимическому подходу — это каскад взаимодействия различных каспаз (ферментов) [7]. Одним из преимуществ апоптоза по сравнению с некрозом является тот факт, что при гибели путем апоптоза не развивается интоксикация, и клетка умирает без негативных последствий для организма.

Признаком ПКГ при использовании флуоресцентной микроскопии служит обнаружение ярко светящегося конденсированного хроматина. Применение флуоресцентных способов окраски с использованием двойного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием в тесте „живые и мертвые“ дает возможность выявлять общее количество погибших клеток, а также дифференцировать их в зависимости от механизма гибели. При этом подвергшиеся некрозу клетки окрашивались в красный цвет, с развившимся апоптозом — в зеленый цвет. При этом в клетках, в которых запустился апоптоз, выявлялись апоптотические тельца или пикноз ядра (также окрашенные в зеленый цвет). Следовательно, флуоресцентная микроскопия может служить одним из методов скрининговой оценки эффективности различных фармакологических препаратов [8].

Флавоноиды обладают широким спектром биологической активности, в том числе и способностью активировать апоптоз. Так, известно, что катехин (галлат-эпигаллокатехин) флавоноидов экстракта зеленого чая обладает тремя основными механизмами противоопухолевой активности: антипролиферативным, торможением фазы G1 подготовки клетки к делению и механизмом индукции апоптоза [9,10]. Экстракт зеленого чая получают

из измельченных листьев зеленого неферментированного чая *Camellia sinensis* — род вечнозеленых кустарников или деревьев семейства чайных. При изготовлении зеленого чая листья нагревают для инактивации ферментов, подвергают скручиванию, потом подсушивают до 50% влажности, затем еще раз скручивают и после этого высушивают. Для приготовления сухого экстракта зеленого чая листья измельчают, экстрагируют водой, полученный жидкий экстракт отстаивают, очищают и концентрируют, затем густой экстракт высушивают [11]. Многочисленными исследованиями доказана эффективность зеленого чая в комбинированном лечении рака молочной железы, рака предстательной железы, рака шейки матки, опухолей мочевого пузыря, рака печени [12]. Основными противоопухолевыми агентами зеленого чая в настоящее время признаны эпикатехин-3-галлат и эпигаллокатехин-3-галлат. Их действие реализуется на нескольких этапах канцерогенеза: они нарушают трансдукцию — передачу сигнала внутри опухолевой клетки, тормозят пролиферацию опухолевых клеток; активируют апоптоз опухолевых клеток; уменьшают экспрессию фактора роста эндотелия (VEGF) и блокируют ангиогенез в опухолевой ткани. Таким образом, катехины зеленого чая ингибируют рост опухоли, нарушают ее питание и распространение [12].

Экстракт аврана был получен способом, позволяющим снижать токсичность и повышать выход флавоноидов из растительного сырья, обладает противоопухолевым, антикахетическим и иммуномодулирующим действиями. Способ получения сухого экстракта из растительного сырья включает измельчение травы аврана лекарственного, экстракцию спиртом 96%, выпаривание экстракта, добавление хлороформа, удаление хлороформа. Экстракцию спиртом проводят на водяной бане до кипения и кипятят в течение 14–15 min, выпаривают при температуре 55–60°C, выпаренный экстракт разводят сначала дистиллированной водой 40–50°C, затем добавляют хлороформ в пропорции 4/5 части воды и 1/5 части хлороформа, охлаждают до комнатной температуры и центрифугируют со скоростью 1500 оборотов в минуту в течение 15 min, далее отделяют водную фракцию и высушивают ее [13]. Исследования противоопухолевой активности проводились на моделях перевиваемых опухолей крысам в экспериментах *in vivo* (рака печени, рака почки и саркомы [14–18]) и экспериментах *in vitro* [19–21] в отношении клеток эмбриона почки свиньи, рака шейки матки HeLa, рака почки и рака молочной железы человека. Результаты исследований позволили описать механизмы воздействия на опухоль и опухолевые клетки: остановка клеточного цикла на стадии G₀, запуск апоптоза, индуцированного геном p53 и подавление цитопротекторной аутофагии [22,23].

Несмотря на выявленные пути ингибирования канцерогенеза, ранее не было проведено расчетов оптимальных дозировок для данных веществ и не было исследовано влияние сверхнизких концентраций на ме-

ханизмы клеточной гибели клеток карциномы почки человека А498.

Цель исследования — с использованием флуоресцентных методов визуализации апоптоза и некроза в опухолевых клетках человека *in vitro* выявить пути гибели клеток карциномы почки человека А498 под действием флавоноидсодержащих экстрактов аврана лекарственного и зеленого чая в сверхнизких концентрациях через 24 и 48 h.

Материал и методы

Объектом исследования послужили клетки карциномы почки А498, полученные из банка опухолевых культур РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва.

В исследовании использованы вещества с предполагаемой противоопухолевой активностью: экстракт зеленого чая (катехины и полифенолы), экстракт аврана лекарственного (флавоноиды) в следующих концентрациях (mg/ml): 0.0018, 0.0036, 0.0072, 0.0144, 0.0288, 0.0576, 0.1152 [11].

Культивирование клеток проводили в пластиковых флаконах в среде RPMI 4 (10% эмбриональной сыворотки, ампициллина, пирувата натрия, глутамин) в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 24 и 48 h. Затем клетки, находящиеся в пластиковых флаконах, рандомизированным способом были разделены на группы: контрольную группу (без воздействия) и экспериментальные группы (с воздействием сверхнизких концентраций экстрактов аврана лекарственного и зеленого чая). После этого клетки окрашивали. В качестве красителей использовали йодистый пропидий (проникающий в нежизнеспособные клетки за счет разрушения их мембраны) и акридиновый оранжевый для окрашивания живых клеток.

Для визуализации клеток использовали микроскоп Nikon (Токио, Япония). Захват и анализ изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры Nikon (разрешение 2560 × 1920). Для подсчета клеток использовали программное обеспечение FijiImageJ и NIS-ElementsBR 4.60.

Для анализа цитотоксической, цитостатической и апоптотической активностей сравнивали в контрольной и экспериментальной группах следующие показатели: количество клеток в поле зрения (СКК); количество мертвых клеток в поле зрения; количество живых клеток в поле зрения; количество делящихся клеток; количество клеток с признаками апоптоза (апоптотические тельца, пикноз ядра, хроматин в виде „серпов“).

Статистическую обработку проводили в программе SPSSStatistics 17.0. Нормальность распределения признака по группам оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Было выявлено, что распределение признаков не соответствует нормальному, в связи с чем для оценки достоверности отличий от контрольной группы был использован непараметрический критерий Манна–Уитни.

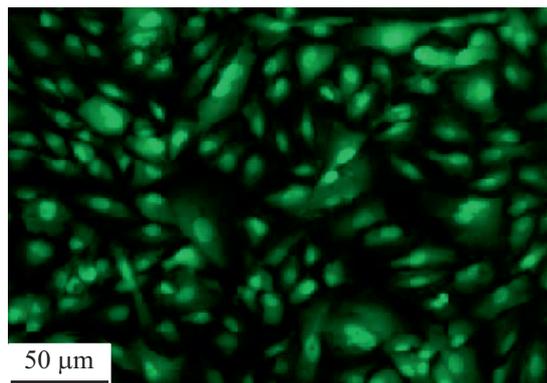


Рис. 1. Клетки культуры А498 через 24 h, окраска живых клеток акридиновым оранжевым. Объектив ×20.

В группах определяли медиану, 25-й и 75-й квартили, максимальное и минимальное значения. Различия принимали за достоверные на уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты

При воздействии на клетки карциномы почки А498 исследуемых экстрактов в сверхнизких концентрациях через 24 h наблюдалось большое количество клеток различной формы, что связано с развитием изменений в них. Через 48 h картина была аналогичной. Клетки в контрольной группе имели овальную форму, что свидетельствует о том, что клетки прикреплены к подложке и жизнеспособны (рис. 1).

В ходе проведения флуоресцентной микроскопии через 24 h установлено увеличение общего количества клеток по сравнению с контрольной группой при воздействии экстракта аврана лекарственного в концентрациях 0.0018, 0.0036, 0.0144, 0.0576 mg/ml. Экстракт зеленого чая оказывал такой же эффект только при наибольших концентрациях — 0.0036, 0.0576 mg/ml (табл. 1). Полученные данные напрямую взаимосвязаны с увеличением количества живых клеток, что свидетельствует об увеличении пролиферативной активности клеток рака почки под действием экстрактов в сверхнизких концентрациях через 24 h после воздействия.

При воздействии экстрактом аврана количество мертвых клеток достоверно увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем только при концентрации 0.0288 mg/ml.

Количество клеток рака почки с ядрами в виде серпов и апоптотическими тельцами увеличивалось под действием экстракта аврана по сравнению с контролем только при концентрации 0.0018 mg/ml. Однако количество клеток с пикнозом ядра, свидетельствующим о подготовке клеток к апоптозу, при всех концентрациях было выше контрольных значений, составляя до 30% от общего количества клеток в поле зрения (рис. 2).

При воздействии экстрактом зеленого чая количество мертвых клеток увеличивается при concentra-

Таблица 1. Морфологические показатели клеток культуры рака почки A498, полученные с помощью флуоресцентных методов визуализации через 24 h после воздействия экстрактами аврана лекарственного и зеленого чая (медиана (квартиль 25–квартиль 75) [минимум–максимум])

Показатели	Контроль	Концентрации, mg/ml						
		0.0018	0.0036	0.0072	0.0144	0.0288	0.0576	0.1152
Экстракт Аврана лекарственного								
Количество клеток в поле зрения	133 (112–143.5) [112–148]	179.5* (160.5–192.5) [156–200]	151.5* (144.75–158.5) [141–172]	139 (126–176.5) [123–187]	154 (139–172) [133–179]	148 (138.75–183.75) [132–186]	167* (151–172) [150–173]	147.5 (139–159.75) [131–171]
Количество мертвых клеток в поле зрения	2 (0.75–4.25) [0–5]	3.5 (2–5.25) [2–9]	3.5 (0.75–6.75) [0–12]	3 (1–4) [1–4]	3.5 (2.75–5.75) [2–8]	4.5* (3.5–5.25) [2–6]	2.5 (1.75–7.25) [1–8]	1 (2–5.25) [0–3]
Количество живых клеток в поле зрения	130.5 (108.75–135) [108–148]	176* (156–189.75) [147–198]	137 (128.75–147) [128–153]	136.5 (124.25–173) [119–185]	151 (132–167) [130–176]	143 (136.25–179.5) [128–181]	162.5* (146–169) [143–172]	145 (136.75–159.5) [130–170]
Количество клеток с серпами	2 (1.75–4.25) [1–5]	7* (5.75–10.75) [5–16]	3.5 (2.75–7.25) [2–8]	2 (1–3.25) [1–4]	2 (0–3) [0.75–2.25]	2.5 (1.75–3.25) [1–4]	3.5 (2.75–5.25) [2–6]	2.5 (1.75–3.5) [0–5]
Количество клеток с пикнозом ядра	2.5 (0.75–4) [0–4]	8* (6.75–13) [6–16]	195* (14.25–28.25) [12–35]	25* (22.5–30.75) [21–33]	26* (22–28) [11–30]	23* (20.5–27.75) [19–30]	30* (26–39) [20–45]	29.5* (19.75–34) [19–40]
Количество клеток с апоптотическими тельцами	1 (0–3.5) [0–8]	5 (2.75–28.5) [2–45]	0.5 (0–2.75) [0–5]	2 (0.75–3.25) [0–4]	1 (0.75–2) [0–2]	1.5 (0–2.25) [0–3]	1 (1–1) [1–1]	1 (0–1) [1–1]
Экстракт зеленого чая								
Количество клеток в поле зрения (СКК)	133 (112–143.5) [112–148]	138 (117.5–170.5) [107–172]	160.5* (134.25–201.75) [129–207]	153 (115–166.75) [103–178]	160 (152–164.75) [146–170]	122.5 (82.25–167.75) [71–182]	162* (155.5–184.5) [154–201]	148 (141.75–162.25) [132–166]
Количество мертвых клеток в поле зрения	2 (0.75–4.25) [0–5]	3.5 (2.75–5.25) [2–6]	7.5* (6–13) [3–19]	4.5 (2.75–5) [2–5]	9* (6.75–10.5) [6–12]	4 (1.5–5) [0–5]	7.5* (4.5–11.25) [3–12]	5.5* (4.75–7.5) [4–9]
Количество живых клеток в поле зрения	130.5 (108.75–130.5) [108–148]	134 (113.75–167) [104–167]	145.5 (128.25–194) [126–200]	149.5 (110.5–162) [100–174]	152 (140.5–157) [136–163]	118 (77.5–167.25) [67–180]	155 (144.75–179.25) [144–195]	140.5 (131.25–157) [123–160]
Количество клеток с серпами клеток	2 (1.75–4.25) [1–5]	1.5* (0.75–5.5) [0–7]	3.5 (1.5–5.5) [0–7]	4.5* (2.75–6.75) [2–9]	5.5 (1.75–7.25) [1–8]	2 (0.75–4) [0–4]	3 (1–6.75) [1–9]	2 (1.75–3.75) [1–6]
Количество клеток с пикнозом ядра	2.5 (0.75–4) [0–4]	6.5* (4–8.75) [4–14]	2.5 (0–5) [0–5]	3.5 (3–4.25) [3–5]	4.5 (2.75–6) [2–6]	4 (2.25–5) [0–5]	5* (1.75–7.5) [1–9]	4 (3.75–5.25) [3–6]
Количество клеток с апоптотическими тельцами	1 (0–3.5) [0–8]	0 (0–0.25) [0–1]	0 (0–0) [0–0]	0 (0–0.25) [0–1]	0 (0–0.25) [0–1]	0 (0–0.25) [0–1]	0 (0–4.5) [0–6]	0.5 (0–4.5) [0–6]

Примечание. * Достоверность различий между контрольной и экспериментальной группами, рассчитанная при помощи критерия Манна-Уитни, $p < 0.05$.

Таблица 2. Морфологические показатели клеток культуры рака почки А498, полученные с помощью флуоресцентных методов визуализации через 48 h после воздействия экстрактами аврана лекарственного и зеленого чая (медиана (квартиль 25–квартиль 75) [минимум–максимум])

Показатели	Контроль	Концентрации, mg/ml						
		0.0018	0.0036	0.0072	0.0144	0.0288	0.0576	0.1152
Экстракт Аврана лекарственного								
Количество клеток в поле зрения	155.5 (137.5–167.5) [133–169]	123* (102.75–132.25) [102–136]	133.5 (125.75–138.75) [119–141]	112* (82.25–118.75) [77–124]	91.5* (73.75–107.25) [61–117]	103* (96.75–130) [93–139]	84* (74–103) [65–112]	101.5* (87.25–111) [70–114]
Количество мертвых клеток в поле зрения	5.5 (3.5–6.75) [2–9]	4 (1.75–7.5) [1–9]	10.5* (4.75–21.75) [4–27]	6* (4.75–7.25) [4–8]	10* (8.5–18) [7–21]	18 (4.75–25.5) [4–33]	4 (1.75–9.75) [1–12]	4.5 (2–13.5) [2–18]
Количество живых клеток в поле зрения	149.5 (136.25–165) [128–165]	118.5* (96.75–118.5) [96–135]	122* (107–133) [92–136]	104.5* (77–114.25) [71–118]	83.5* (53.75–96.75) [44–108]	86 (78.5–120.5) [65–122]	68* (59–101.25) [50–111]	98.5* (70.75–106.75) [58–112]
Количество клеток с серпами	7 (4.75–8.5) [4–10]	7 (4.75–9) [4–9]	4.5* (3.5–5.5) [2–7]	2* (1.75–2) [1–2]	2* (0.75–2.25) [0–3]	1* (0–1) [1–1]	1.5* (1–2.25) [1–3]	2* (1.5–2.5) [0–4]
Количество клеток с пикнозом ядра	4 (2.75–10.25) [2–11]	10 (6.13–13.5) [6–15]	30* (29.5–32.75) [28–35]	23.5* (17.5–29) [16–32]	15* (10.25–18) [8–18]	21* (17.75–23.25) [17–24]	16.5* (12.5–18) [11–18]	24* (20.75–30.5) [20–32]
Количество клеток с апоптотическими тельцами	4.5 (1.75–7.5) [1–9]	1.5 (1–2.25) [1–3]	1* (0.75–2.25) [0–3]	0.5* (0–1) [0–1]	1* (0–1) [1–1]	0.5* (0–1.25) [0–2]	0.5* (0–1.25) [0–2]	1 (0.75–3.25) [0–4]
Экстракт зеленого чая								
Количество клеток в поле зрения (СКК)	155.5 (137.5–167.5) [133–169]	152.5 (136–162.75) [133–165]	149 (141–153) [138–156]	121 (121–136.75) [95–139]	110* (106.25–127.25) [104–137]	128 (109–136) [106–139]	124.5 (117.75–131.75) [114–137]	116* (109.25–122.25) [104–129]
Количество мертвых клеток в поле зрения	5.5 (3.5–6.75) [2–9]	13.5 (10–15.5) [4–17]	9.5 (2.75–14) [2–17]	10* (7.75–12.25) [4–15]	5.5 (4–8.25) [4–12]	13* (10–17.25) [10–18]	4 (3–7.25) [3–11]	6.5 (5.75–8.25) [5–9]
Количество живых клеток в поле зрения	149.5 (136.25–165) [128–165]	136.5 (121.25–154.25) [116–158]	135.5 (130.75–150.25) [130–154]	107.5 (90–127.75) [84–130]	104.5 (99.25–116.75) [97–131]	113.5 (99–119.5) [96–124]	119 (114.75–126.25) [111–127]	120 (107.25–123) [95–123]
Количество клеток с серпами	7 (4.75–8.5) [4–10]	3 (2–3.25) [2–4]	1* (0–2.25) [0–3]	1* (0–1.25) [0–2]	2.5* (1.75–4) [1–4]	3.5 (2–4.5) [2–6]	4 (3–5) [3–5]	3 (2.75–4) [2–4]
Количество клеток с пикнозом ядра	4 (2.75–10.25) [2–11]	4.5 (3.75–5.25) [3–6]	3.5 (0.75–4.25) [0–5]	2* (0–3) [0–3]	2.5 (1–3.5) [1–5]	3 (2.75–4) [2–4]	5.5 (3.5–6.5) [2–8]	3.5 (2.75–4.5) [2–5]
Количество клеток с апоптотическими тельцами	4.5 (1.75–7.5) [1–9]	0 (0–0.25) [0–1]	0 (0–0.25) [0–1]	0 (0–0) [0–0]	0 (0–0.25) [0–1]	2.5 (0–4.25) [0–5]	1.5 (0–4.5) [0–6]	0* (0–0.25) [0–1]

Примечание. * Достоверность различий между контрольной и экспериментальной группами, рассчитанная при помощи критерия Манна–Уитни, $p < 0.05$.

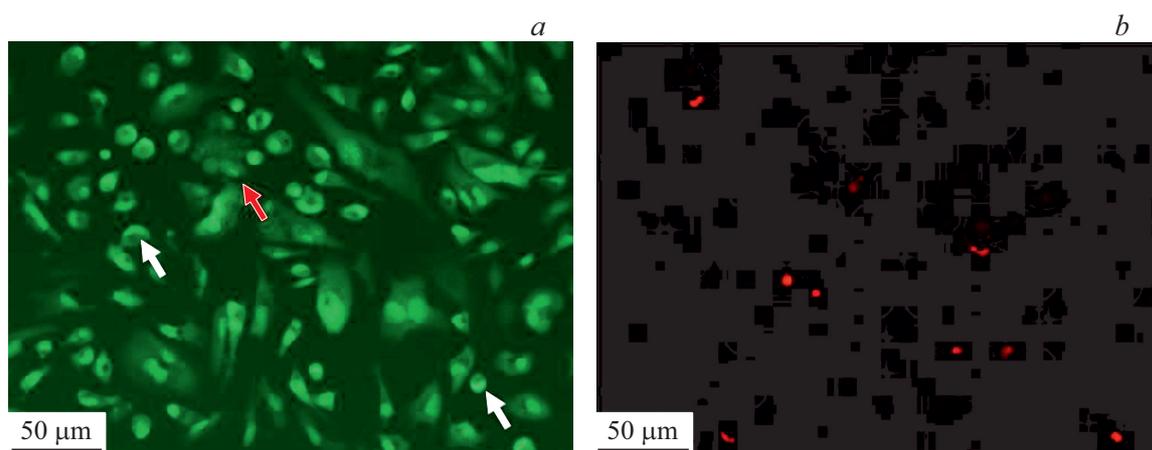


Рис. 2. Клетки культуры A498 через 24 h после инкубации с экстрактом аврана лекарственным в концентрации 0.0018 mg/ml: *a* — окраска акридиновым оранжевым хроматина ядер живых клеток (белой стрелкой указаны ядра по типу серпов, красной стрелкой — апоптотические тельца), *b* — окраска мертвых клеток йодистым пропидием. Объектив $\times 20$.

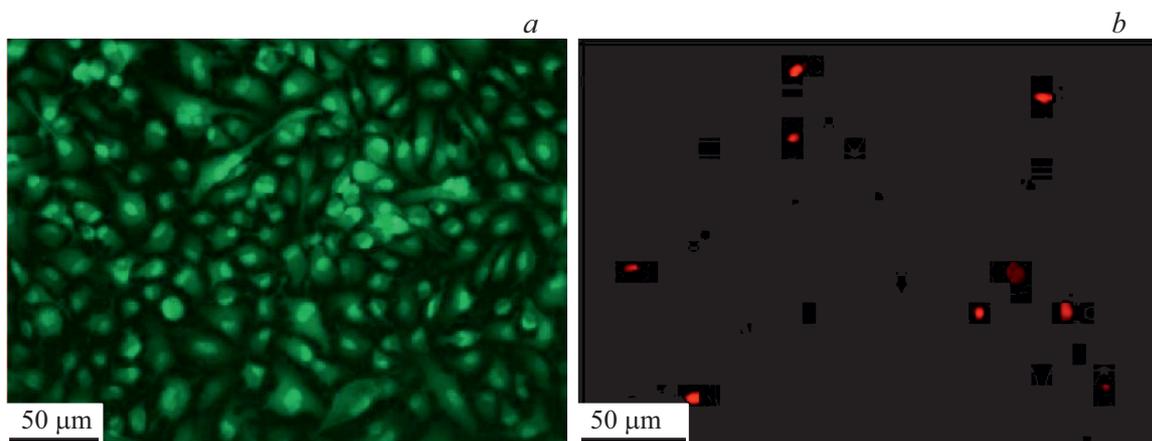


Рис. 3. Клетки культуры A498 через 24 h после инкубации с экстрактом аврана лекарственным в концентрации 0.0018 mg/ml: *a* — окраска акридиновым оранжевым хроматина ядер живых клеток, *b* — окраска мертвых клеток йодистым пропидием. Объектив $\times 20$.

ях 0.0036, 0.0144, 0.0576, 0.1152 mg/ml. При концентрации 0.0144 mg/ml количество клеток максимально увеличивается по сравнению с контролем в 4.5 раза.

Под действием экстракта зеленого чая количество клеток с ядрами по типу серпа увеличиваются по сравнению с контролем достоверно только при концентрациях 0.0018 и 0.0072 mg/ml, а ядра в состоянии пикноза — при концентрациях 0.0018 и 0.0576 mg/ml. Апоптотические тельца не выявлены при действии экстракта из зеленого чая (табл. 1, рис. 3).

В ходе проведения флуоресцентной микроскопии через 48 h воздействия экстрактом аврана установлено уменьшение общего количества клеток при концентрациях выше 0.0018 mg/ml по сравнению с контрольной группой. Максимальное уменьшение общего количества клеток в 2 раза наблюдали при концентрации 0.0576 mg/ml по сравнению с контролем (табл. 2).

Также уменьшение общего числа клеток наблюдалось при воздействии экстракта зеленого чая, но только при двух концентрациях 0.0144 и 0.1152 mg/ml (табл. 2).

При воздействии экстракта аврана лекарственного в концентрациях 0.0036–0.0144 mg/ml наблюдали увеличение в 2 раза количества мертвых клеток по сравнению с контролем, тоже при действии экстракта зеленого чая (0.0144, 0.1152 mg/ml), что свидетельствует о появлении цитотоксической активности данных веществ на вторые сутки исследования (табл. 2).

Количество клеток рака почки с ядрами в виде серпов, пикнозом ядер и апоптотическими тельцами достоверно увеличивалось через 48 h под действием экстракта аврана по сравнению с контролем, начиная с концентрации 0.0036 mg/ml. Однако преобладали клетки с пикнозом ядра до 20% от общего количества (табл. 2).

Под действием флавоноидов зеленого чая количество клеток рака почки с ядрами в виде серпов, пикнозом

ядер достоверно увеличивалось через 48 h только при единичных концентрациях 0.0018, 0.0072 и 0.0576 mg/ml. Апоптотические тельца под действием экстракта зеленого чая не образовывались и через 48 h (табл. 2).

Обсуждение

Наиболее выраженной цитостатической активностью обладал экстракт аврана через 48 h после воздействия на опухолевые клетки по сравнению с контрольной группой, уменьшая количество клеток в поле зрения в 1.5 раза по сравнению с контролем. Появление цитостатической активности только через 48 h и отсутствие через 24 h после воздействия могло свидетельствовать о медленном процессе воздействия активных веществ экстракта на регуляцию клеточного цикла.

Наиболее выраженной цитотоксической активностью обладал экстракт зеленого чая в концентрации 0.0288 mg/ml, причем выраженность этой активности нарастала через 48 h после воздействия. Экстракт аврана проявлял такую активность при более низких концентрациях, начиная с концентрации 0.0036 mg/ml.

Наибольшей апоптотической активностью обладал экстракт аврана, вызывая в значительной степени пикноз ядер клеток рака почки при всех концентрациях как через 24, так и 48 h после воздействия. Это свидетельствует об активации ранних стадий апоптоза. Однако при воздействии экстрактом аврана наблюдали и клетки с ядрами в виде серпов и более позднюю стадию апоптоза — апоптотические тельца. Экстракт зеленого чая проявлял очень слабую апоптотическую активность через 24 h и совсем не проявлял ее через 48 h.

Полученные данные свидетельствуют о том, что катехины зеленого чая в сверхнизких концентрациях не оказывают существенного влияния на клеточный цикл и активацию путей апоптоза опухолевых клеток рака почки, что показало их неэффективность в эксперименте *in vitro*. Однако в литературных данных отражены результаты исследований *in vivo*, где под влиянием катехинов наблюдается замедление развития опухоли в результате снижения васкуляризации и соответственно питания клеток, что способствует их деградации и гибели. В более высоких концентрациях (0.5 mg/ml) начинают проявляться и реализовываться механизмы блокировки канцерогенеза, описанные ранее [12]. Экстракт аврана показал свою эффективность при сверхнизких концентрациях.

Выводы

Таким образом, использование флуоресцентных методов в тесте „живые и мертвые“ позволило визуализировать клетки с различными механизмами гибели и выявить пути гибели клеток карциномы почки человека А498 под действием экстракта аврана лекарственного и флавоноидов зеленого чая. Так, у экстракта аврана

преобладающим путем гибели клеток культуры рака почки А498 является апоптоз через 24 h и апоптоз и некроз через 48 h. У флавоноидов зеленого чая как через 24 h, так и 48 h преобладающим путем гибели клеток рака почки является некроз.

Финансирование работы

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00298, а также в рамках государственного задания Минздрава России „Исследование экстрактов лекарственных растений, содержащих флавоноиды, и их фракций с целью создания препаратов, обладающих противоопухолевой, антиоксидантной, антикахекической и другой активностью“.

Соблюдение этических стандартов

Настоящая работа не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] *Kharkevich D.A.* Pharmacology: Textbook. 10th ed. M.: GEOTAR-Media, 2008. 750 p.; *Харкевич Д.А.* Фармакология: Учебник. 10-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 750 с.
- [2] *Векшин Н.Л.* Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. Пушино: Фотон-век, 2009. 168 с.
- [3] *Stepanenko O.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Verkhusha V.V.* // Cytology. 2007. V. 49. N 5. P. 395.
- [4] *Cassimeris L., Lingappa V.R., Plopper G.* Lewin's Cells. Jones and Bartlett Publishers, 2011. 1056 p.; *Кассимерис Л., Линганна В.Р., Плоннер Дж.* Клетки по Льюину. М.: Лаборатория знаний, 2016. 1056 с.
- [5] *Drummen G.P.C.* // Molecules. 2012. V. 17. P. 14067. doi 10.3390/molecules171214067
- [6] *Udenfriend S.* // Pr. Sc. 2015. V. 4. N 3. P. 542. doi 10.1002/pro.5560040321
- [7] *Galluzzi L., Vitale I., Abrams J M. et al.* // Cell Death Differ. 2012. V. 19. N 1. P. 107. doi 10.5167/uzh-4928
- [8] *Navolokin N.A., Polukonova N.V., Mudrak D.A. et al.* // Opt. Spectrosc. 2019. V. 126. N 6. P. 773.
- [9] *Korman D.B.* Basics of Antitumor Therapy. M.: Practical medicine, 2006. 512 p.; *Корман Д.Б.* Основы противоопухолевой терапии. М.: Практическая медицина, 2006. 512 с.
- [10] *Du G.J, Zhang Z., Wen X.D.* // Nutr. 2012. V. 4. N 11. P. 1679.
- [11] *Поверим А.Д.* // Пищевая промышленность. 2008. № 7. С. 36.
- [12] *Pan M.H., Chiou Y.S., Wang Y.J.* // Food Funct. 2011. N 2. P. 101.
- [13] *Полуконова А.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г.* // Химия растительного сырья. 2013. № 4. С. 165. doi 10.14258/jcprm.1304165
- [14] *Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N.* // ROMJ. 2012. V. 1. N 2. P. 203.

- [15] Navolokin N.A., Mudrak D.A., Polukonova N.V. // Exp. And Clin. Pharm. 2017. V. 80. N 6. P. 19. doi 10.30906/0869-2092-2017-80-6-19-23
- [16] Navolokin N.A., Mudrak D.A., Bucharskaya A.B., Matveeva O.V., Tychina S.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N. // ROMJ. 2017. V. 6. N 3. P. 304.
- [17] Navolokin N.A., Ivlichev A.V., Mydrak D.A., Afanasjeva G.A. // Eksp. and Klin. Farm. 2017. V. 80. N 10. P. 40. doi 10.30906/0869-2092-2017-80- 10-40-43
- [18] Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaja A.B., Durnova N.A., Maslyarkova G.N. // ROMJ. 2014. V. 3. P. 0304. doi 10.15275/rusomj.2014.0304
- [19] Tkachenko N., Pravdin A., Terentjuk G., Navolokin N., Kurchatova M., Polukonova N.V. // Proc. SPIE. 2015. V. 9448. P. 94480. doi 10.1117/12.2179862
- [20] Tkachenko N.V., Bykova E.V., Pravdin A.B., Navolokin N.A., Polukonova N.V., Bucharskaja A.B. // Proc. SPIE. 2016. V. 9917. P. 99170. doi 10.1117/12.2228291, doi 10.15275/rusomj.2017.0304
- [21] Navolokin N.A., Skvortsova V.V., Polukonova N.V., Manaenkova E.V., Pankratova L.E., Kurchatova M.N., Maslyakova G.N., Durnova N.A. // Eksp. and Klin. Farm. 2015. V. 78. P. 10. doi 10.30906/0869-2092-2015-78-4-10-13
- [22] Polukonova N.V., Navolokin N.A., Raykova S.V. // Eksp. and Klin. Farm. 2015. V. 78. N 1. P. 34. doi 10.30906/0869-2092-2015-78-1-34-38
- [23] Navolokin N.A., Maslyakova G.N., Polukonova N.V. // Arch. of Path. 2019. V. 81. N 1. P. 24.